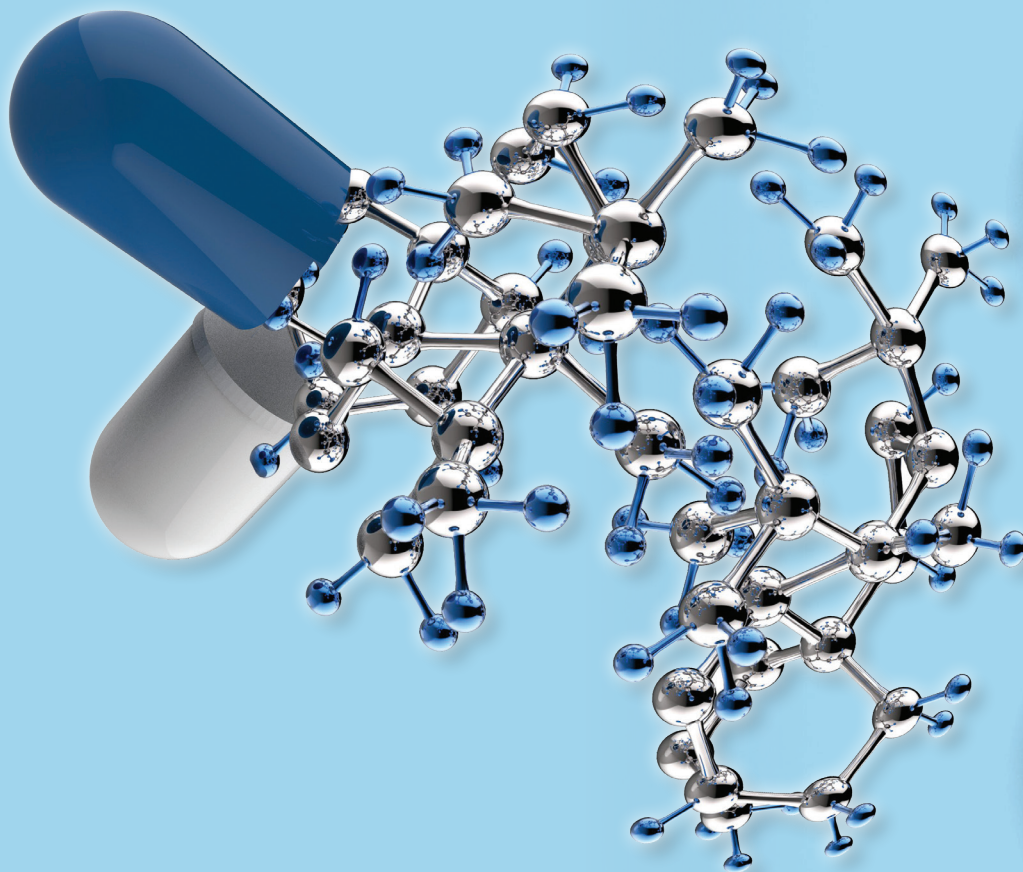




ISSN 1105-4999

# ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ PHARMAKEFTIKI

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ ΜΕ ΘΕΜΑΤΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
A QUARTERLY EDITION ON PHARMACEUTICAL SCIENCES' TOPICS



ΤΟΜΟΣ 35 • ΤΕΥΧΟΣ I  
VOLUME 35 • ISSUE I

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ - ΜΑΡΤΙΟΣ 2023  
JANUARY - MARCH 2023

## ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ ΜΕ ΘΕΜΑΤΑ  
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΟΜΟΣ 35, ΤΕΥΧΟΣ Ι,  
ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ - ΜΑΡΤΙΟΣ 2023  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΣΥΝΤΑΞΗΣ

**A. Τσαντίλη**

Ομοτ. Καθηγήτρια, Εθνικό και Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ)  
tsantili@pharm.uoa.gr

**ΑΡΧΙΣΥΝΤΑΚΤΗΣ**

**Γ.Α. Καρίκας**

Ομότιμος καθηγητής, Πανεπιστήμιο  
Δυτικής Αττικής, karikasg@uniwa.gr

**ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Κ. Δεμέτζος**

Καθηγητής, ΕΚΠΑ

**B. Δημόπουλος**

Ομοτ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης,  
ΑΠΘ

**N. Κόλμαν**

Galenica SA

**X. Κοντογιώργης,**

Επ. Καθηγητής, Δ.Π.Θ.

**Π. Κουρουνάκης**

Ομοτ. Καθηγητής,

Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, ΑΠΘ

**Π. Μαχαίρας**

Ομοτ. Καθηγητής, ΕΚΠΑ

**Σ. Νικολαρόπουλος**

Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

**Γ. Πάιρας**

Αναπλ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

**E. Παντερή**

Καθηγήτρια, ΕΚΠΑ

**Δ. Ρέκκας**

Αναπλ. Καθηγητής, ΕΚΠΑ

## PHARMAKEFTIKI

A QUARTERLY EDITION  
ON PHARMACEUTICAL SCIENCES' TOPICS  
VOLUME 35, ISSUE I,  
JANUARY - MARCH 2023

**EDITOR**

**A. Tsantili**

Emeritus Professor, National and Kapodistrian  
University of Athens (NKUA)  
tsantili@pharm.uoa.gr

**CO EDITOR**

**G.A. Karikas**

Emeritus professor, University of West Attica,  
Greece, karikasg@uniwa.gr

**EDITORIAL BOARD**

**C. Demetzos**

Professor, NKUA

**V.J. Demopoulos**

Emeritus Professor, University of Thessaloniki,  
AUTH

**N. Kolman**

Galenica SA

**Ch. Kontogiorgis**

Assistant Professor, D.U.Th.

**P. Kourounakis**

Emeritus Professor,

University of Thessaloniki, AUTH

**P. Macheras**

Emeritus Professor, NKUA

**S. Nikolaropoulos**

Professor, University of Patras

**G. Pairas**

Associate Professor, University of Patras

**I. Panderi**

Professor, NKUA

**D. Rekkas**

Associate Professor, NKUA

Οδηγίες προς συγγραφείς/Authors guidelines: <https://www.hsmc.gr/author-guidelines/>

E-mail για υποβολή εργασιών:

tsantili@pharm.uoa.gr, karikasg@uniwa.gr

Για την ηλεκτρονική έκδοση της «Φαρμακευτικής»  
και οδηγίες προς συγγραφείς  
επισκεφτείτε την διεύθυνση: [www.hsmc.gr](http://www.hsmc.gr)

E-mail for manuscript submission:

tsantili@pharm.uoa.gr, karikasg@uniwa.gr

For "Pharmakeftiki" electronic edition  
and instructions to authors  
please visit [www.hsmc.gr](http://www.hsmc.gr)

Τα άρθρα που δημοσιεύονται  
στην «Φαρμακευτική» καταχωρούνται  
στα Chemical Abstracts, EMBASE,  
SCOPUS και EBSCO

Articles published in "Pharmakeftiki"  
are indexed in Chemical Abstracts,  
EMBASE, SCOPUS and EBSCO

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ / CONTENTS

## Φαρμακοεπιδημιολογία – Η Αγνωστη Πλευρά μιας πολύ Γνωστής Επιστήμης

Φωτεινή Δερμίκη-Γκάνα, Έλενα Δεληγιάννη,  
Παναγιώτης-Νικόλαος Λαλαγκάς, Γεώργιος Πουλέντζας,  
Σπύρος Πολυζώης, Θεόδωρος Κωνσταντινίδης,  
Χρήστος Κοντογιώργης..... 2-17

## Preparation and Evaluation of Dispersed Systems of Topical Anesthetic Drugs. The Example of a Benzocaine Galenic Formulation

Costas Demetzos, Nikolaos Naziris ..... 18-25

## Molecular docking, Molecular dynamics, and ADMET investigation of selected phytochemicals as promising inhibitors of SARS-CoV-19 targets

Veerachamy Alagarsamy, Viswas Raja Solomon,  
Bandi Narendhar, Mohaideen Thasthagir Sulthana,  
P Shyam Sundar, Alagarsamy Dharshini Aishwarya. 26-47

## A 3D 'lego-like' Atomic Model Represents Viruses and/or m-RNA Vaccines. An Educational Multitasking Tool.

Costas Demetzos ..... 55-59

## The commodity analysis of the basic dental care product

Tatyana Diadiun, Olexandr Kukhtenko, Bohdana Pavliuk,  
Iryna Herasymets, Dmytro Soldatov..... 48-54

Εκδηλώσεις ..... 60

## Pharmacoepidemiology - The Unknown Aspect of a Well-known Scientific Field

Foteini Dermiki-Gkana, Elena Deligianni, Panagiotis Nikolaos Lalagkas, Georgios Poulentzas, Spyros Polyzois, Theodoros Constantinidis, Christos Kontogiorgis ..... 2-17

## Παρασκευή και αξιολόγηση κολλοειδών συστημάτων διασποράς τοπικής χρήσης αναισθητικών φαρμάκων. Το παράδειγμα ενός γαληνικού σκευάσματος βενζοκαΐνης

Κωσταντίνος Δεμέτζος, Νικόλαος Ναζίρης ..... 18-25

## Molecular docking, Molecular dynamics, and ADMET investigation of selected phytochemicals as promising inhibitors of SARS-CoV-19 targets

Veerachamy Alagarsamy, Viswas Raja Solomon, Bandi Narendhar, Mohaideen Thasthagir Sulthana, P Shyam Sundar, Alagarsamy Dharshini Aishwarya. 26-47

## A 3D 'lego-like' Atomic Model Represents Viruses and/or m-RNA Vaccines. An Educational Multitasking Tool.

Costas Demetzos ..... 55-59

## The commodity analysis of the basic dental care product

Tatyana Diadiun, Olexandr Kukhtenko, Bohdana Pavliuk, Iryna Herasymets, Dmytro Soldatov..... 48-54

Meetings ..... 60

## ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ  
ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΧΗΜΕΙΑΣ  
& ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ  
ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

## PHARMAKEFTIKI

A QUARTERLY JOINT EDITION OF  
THE HELLENIC SOCIETY OF  
MEDICINAL CHEMISTRY &  
THE HELLENIC PHARMACEUTICAL SOCIETY



ZITA MEDICAL MANAGEMENT, Ομήρου 29Α, Πέτα Σαρωνικού, Ελλάδα  
Τηλ.: + 30 22994 40962, E-mail: g.kouloumpis@zitamanagement.com

# Φαρμακοεπιδημιολογία – Η Αγνώστη Πλευρά μιας πολύ Γνωστής Επιστήμης

Φωτεινή Δερμική-Γκάνα\*, Έλενα Δεληγιάννη\*, Παναγιώτης-Νικόλαος Λαλαγκάς\*, Γεώργιος Πουλέντζας\*, Σπύρος Πολυζώης, Θεόδωρος Κωνσταντινίδης, Χρήστος Κοντογιώργης\*\*  
Εργαστήριο Υγιεινής και Προστασίας Περιβάλλοντος, Τμήμα Ιατρικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, 68100, Αλεξανδρούπολη, Ελλάδα

## KEYWORDS:

Φαρμακοεπιδημιολογία,  
Φαρμακοεπαγρύπνηση,  
Covid-19, Κλινική  
Έρευνα, Επιδημιολογία,  
Φαρμακευτική, Κλινικές  
Μελέτες

## ARTICLE INFO:

Received: November 18, 2022

Revised: January 18, 2023

Accepted: January 22, 2023

Available on line: March 23, 2023

## CORRESPONDING

### AUTHORS:

\* Εξίσου συνεισφορά

\*\* Συγγραφέας

αλληλογραφίας:

Δρ. Χρήστος Κοντογιώργης,

Email:

ckontogi@med.duth.gr

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Εισαγωγή:** Η Φαρμακοεπιδημιολογία ως επιστήμη μελετά τη χρήση και τις δράσεις των φαρμάκων σε μεγάλη πληθυσμιακή κλίμακα με κύριο εργαλείο την εφαρμογή επιδημιολογικών μεθόδων σε δεδομένα κλινικής έρευνας. Σκοπός της παρούσας ανασκόπησης είναι να αναδείξει τον ρόλο της φαρμακοεπιδημιολογίας και την ερευνητική της υπόσταση στην Ελλάδα.

**Μεθοδολογία:** Για τη συγκεκριμένη βιβλιογραφική ανασκόπηση έγινε εξαγωγή πληροφοριών από τις μηχανές αναζήτησης Google Scholar, PubMed, Scopus και Science Direct. Η ανασκόπηση εκτείνεται χρονικά από το 1972 έως το 2021 και οι λέξεις - κλειδιά που χρησιμοποιήθηκαν είναι “Φαρμακοεπιδημιολογία”, “κλινική έρευνα”, “κλινικές μελέτες”, “Φαρμακοεπαγρύπνηση”.

**Αποτελέσματα - Συζήτηση:** Βασικοί στόχοι της Φαρμακοεπιδημιολογίας είναι η ανάπτυξη της κλινικής έρευνας με τη συλλογή και ανάλυση δεδομένων πραγματικού κόσμου, η ανίχνευση πιθανών ανεπιθύμητων ενεργειών και η διερεύνηση δράσεων των φαρμακευτικών προϊόντων πέρα της κύριας θεραπευτικής τους. Λόγοι διεξαγωγής μιας φαρμακοεπιδημιολογικής μελέτης αποτελούν ρυθμιστικά, νομικά, προωθητικά και κλινικά ζητήματα. Ο ορθός σχεδιασμός φαρμακοεπιδημιολογικών μελετών απαιτεί τη σωστή επιλογή τύπου έρευνας. Οι τύποι μελετών διακρίνονται σε i) περιγραφικές μελέτες (αναφορές/σειρές περιστατικών και οικολογικές ή συγχρονικές μελέτες) με στόχο την ενίσχυση του προφίλ ασφαλείας των φαρμάκων και τις αναλυτικές μελέτες (μελέτες ασθενών-μαρτύρων και μελέτες κοορτής) με στόχο την ανάδειξη συσχετίσεων αιτίας-αποτελέσματος και κινδύνου-ασθένειας. Ωστόσο, ο σχεδιασμός μιας φαρμακοεπιδημιολογικής μελέτης παρουσιάζει περιρισμούς, σχετικούς με την ποιότητα των δεδομένων και το πληθυσμιακό δείγμα. Το σφάλμα μεροληπτικότητας και ανάκλησης, ο παράγοντας σύγχυσης και η έλλειψη δεδομένων αποτελούν εμπόδια. Επίσης, η αξιοπιστία αυτών των μελετών βασίζεται στη στατιστική ισχύ τους και

στα προκαθορισμένα όρια εμπιστοσύνης. Τέλος, ιδιαίτερα σημαντική αναδείχθηκε η συνεισφορά της φαρμακοεπιδημιολογίας στην πανδημία Covid-19, αποτελώντας βασικό εργαλείο φαρμακοεπαγρύπνησης για τον εντοπισμό και καταγραφή παρενεργειών των εμβολίων έναντι του κορονοϊού.

**Συμπέρασμα:** Οι μελέτες φαρμακοεπιδημιολογίας πλεονεκτούν καθώς μπορούν να δράσουν συμπληρωματικά στον καθορισμό και επανεξέταση κλινικών κατευθυντήριων οδηγιών. Στην Ελλάδα, η φαρμακοεπιδημιολογία βρίσκεται σε πρώιμα στάδια, ωστόσο Έλληνες ερευνητές επιδιώκουν την εξέλιξη αυτής της σημαντικής επιστήμης.

## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Ορισμός - Ιστορική Αναδρομή

Η επιστήμη της Φαρμακοεπιδημιολογίας αποτελεί την τομή δύο επιστημονικών κλάδων, της Κλινικής Φαρμακολογίας και της Επιδημιολογίας. Από τον τομέα της Κλινικής Φαρμακολογίας χρησιμοποιείται το ερευνητικό ερώτημα, με στόχο την παροχή χρήσιμων πληροφοριών για τους επαγγελματίες υγείας όσον αφορά τις θεραπευτικές και ανεπιθύμητες ενέργειες φαρμάκων. Αντίστοιχα από την Επιδημιολογία χρησιμοποιείται η μεθοδολογία, καθώς η φαρμακοεπιδημιολογική έρευνα αφορά μεγάλες ομάδες πληθυσμού. Συνοπτικά, η Φαρμακοεπιδημιολογία χρησιμοποιεί επιδημιολογικές μεθόδους σε δεδομένα Κλινικής Φαρμακολογίας με τη χρήση σημαντικών εργαλείων από επιστήμες όπως η Ιατρική Πληροφορική και η Βιοστατιστική.<sup>1</sup>

Η εξέλιξη της πληροφορικής και η καθιέρωση χρήσης ηλεκτρονικών υπολογιστών στην καθημερινή ιατρική πράξη βοήθησε ιδιαίτερα την περαιτέρω ανάπτυξη της Φαρμακοεπιδημιολογίας με τη δημιουργία των πρώτων μεγάλων βάσεων αποθήκευσης δεδομένων.<sup>2</sup>

Κάνοντας μια ιστορική αναδρομή, ο όρος Φαρμακοεπιδημιολογία εμφανίζεται πρώτη φορά στη βιβλιογραφία το 1984, ενώ νωρίτερα, μελέτες που ενέπιπταν σε αυτό το ερευνητικό πεδίο χαρακτηρίζονταν ως φαρμακευτική επιδημιολογία.<sup>3</sup> Υπάρχουν αρκετοί ορισμοί για τη Φαρμακοεπιδημιολογία που

παρουσιάζουν ομοιότητες μεταξύ τους. Σύμφωνα με τον ορισμό του Brian L. Strom, ενός από τους πρωταγωνιστές αυτής της επιστήμης, η Φαρμακοεπιδημιολογία είναι η μελέτη της χρήσης και των επιδράσεων φαρμάκων αλλά και ιατρικών συσκευών σε μεγάλο αριθμό ανθρώπων.<sup>1</sup> Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας ορίζει τη Φαρμακοεπιδημιολογία ως την επιστήμη που μελετά τη χρήση και τις δράσεις (ευεργετικές και ανεπιθύμητες) των φαρμάκων σε μεγάλο αριθμό ατόμων με σκοπό την ορθολογική και αποδοτική χρήση τους στον πληθυσμό και τη βελτίωση της δημόσιας υγείας.<sup>4</sup>

Παράλληλα, σύμφωνα με τον Evans, η Φαρμακοεπιδημιολογία μπορεί να οριστεί ως η εφαρμογή επιδημιολογικών μεθόδων και αναλύσεων όσον αφορά τις επιδράσεις φαρμάκων, εμβολίων και κυτταρικών θεραπειών<sup>3</sup>, ενώ σύμφωνα με τον Shader, η Φαρμακοεπιδημιολογία αναφέρεται στη μελέτη της χρήσης, της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας φαρμακευτικών ουσιών (φαρμάκων, βιολογικών θεραπειών, εμβολίων) σε μεγάλους και καλά καθορισμένους πληθυσμούς.<sup>5</sup>

Η πρώτη οργανωμένη φαρμακοεπιδημιολογική μελέτη παρατήρησης πραγματοποιήθηκε στη Γερμανία το 1895, όπου αξιολογήθηκε στην καθημερινή ιατρική πράξη η ασφάλεια διαφόρων φαρμάκων για γενική αναισθησία.<sup>2</sup>

Από τότε η επιστήμη αυτή αναπτύχθηκε αισθητά, κυρίως εξαιτίας των παρακάτω παραγόντων: (α) για να ενισχύσει αδυναμίες των κλινικών δοκιμών, (β) τα φάρμακα εκτός από θεραπευτικές επιδράσεις

έχουν και σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες που πρέπει να διερευνώνται (σημαντικό ρόλο έπαιξαν η περίπτωση της χλωραμφενικόλης και της θαλιδομίδης το 1950 και 1961 αντίστοιχα) και (γ) διαφορετικά μοτίβα χρήσης φαρμάκων μεταξύ πληθυσμών που οδήγησαν στην ανάγκη πραγματοποίησης σχετικών ερευνών στα μέσα της δεκαετίας του 1960.<sup>1,2,5</sup> Το 1966 άρχισαν να γίνονται στις Η.Π.Α. τα πρώτα βήματα προς την ανάπτυξη της Φαρμακοεπιδημιολογίας, που οδήγησαν στην πραγματοποίηση της πρώτης διεθνούς συνόδου με επίκεντρο τη Φαρμακοεπιδημιολογία το 1985 και στην ίδρυση της Διεθνούς Εταιρείας Φαρμακοεπιδημιολογίας το 1989.<sup>2</sup>

## 1.2 Λόγοι πραγματοποίησης Φαρμακοεπιδημιολογικών μελετών

Οι λόγοι πραγματοποίησης φαρμακοεπιδημιολογικών μελετών ποικίλουν και μπορούν να διαχωριστούν σε ρυθμιστικούς, προωθητικούς, νομικούς και κλινικούς.<sup>1</sup> Παρακάτω, γίνεται αναφορά στον καθένα χωριστά.

### 1.2.1 Ρυθμιστικοί λόγοι

Τη στιγμή της έναρξης της εμπορικής διάθεσης των φαρμάκων δεν είναι γνωστές όλες οι πληροφορίες ασφαλείας και οι δράσεις τους. Ως εκ τούτου, οι ρυθμιστικοί φορείς συχνά λαμβάνουν γνωστοποιήσεις περιπτώσεων εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών από τη χρήση των φαρμάκων και ιδιαίτερα των νεοκυκλοφορούντων. Για την απάντηση των ερωτημάτων που προκύπτουν, οι ρυθμιστικοί φορείς μπορεί να ζητήσουν την πραγματοποίηση μιας φαρμακοεπιδημιολογικής μελέτης με σκοπό τη μελέτη της χρήσης, της αποτελεσματικότητας και των βραχυπρόθεσμων και μακροπρόθεσμων επιδράσεων του φαρμάκου σε ευρύτερο πληθυσμό από αυτόν που εξετάστηκε στις κλινικές δοκιμές.<sup>6</sup> Επιπρόσθετα, η έναρξη της κυκλοφορίας ενός φαρμάκου σε κάθε χώρα μπορεί να διαφέρει χρονολογικά. Το γεγονός αυτό μπορούν να το εκμεταλλευτούν οι ρυθμιστικοί φορείς της εκάστοτε χώρας, οι οποίοι εξετάζουν την αίτηση κυκλοφορίας του φαρμάκου. Τα αποτελέσματα φαρμακοεπιδημιολογικών με-

λετών από χώρες στις οποίες ήδη κυκλοφορεί ένα φαρμακευτικό σκεύασμα μπορούν να λειτουργήσουν ως σημεία αναφοράς και να επιταχύνουν τις διαδικασίες έγκρισης του.<sup>1</sup>

### 1.2.2 Προωθητικοί λόγοι

Η τεκμηρίωση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας ενός φαρμάκου μέσω μιας φαρμακοεπιδημιολογικής μελέτης, μπορεί να μειώσει την αρχική επιφυλακτικότητα των ιατρών ως προς τη συνταγογράφηση του. Τα αποτελέσματα μιας φαρμακοεπιδημιολογικής μελέτης μπορούν να οδηγήσουν στην εύρεση νέων ενδείξεων/αντενδείξεων χρήσης του φαρμάκου, επηρεάζοντας και καθορίζοντας τα πλαίσια συνταγογράφησης του.<sup>1</sup>

### 1.2.3 Νομικοί λόγοι

Σε περιπτώσεις αγωγής ευθύνης του προϊόντος, η πραγματοποίηση κατάλληλης φαρμακοεπιδημιολογικής μελέτης από την αρμόδια εταιρεία μπορεί να διασφαλίσει την πραγματοποίηση κάθε δυνατής διαδικασίας για τον εντοπισμό της τοξικότητας ενός φαρμάκου όσο το δυνατόν γρηγορότερα.<sup>1</sup>

### 1.2.4 Κλινικοί λόγοι

Στην περίπτωση φαρμάκων για χρήση σε χρόνιες ή συχνές παθήσεις ή για αυτοφαρμακοθεραπεία, η πραγματοποίηση μιας φαρμακοεπιδημιολογικής μελέτης είναι απαραίτητη, καθώς η έκθεση των ασθενών σ' αυτό θα είναι μεγάλη και για μεγάλο χρονικό διάστημα. Επιπλέον, έλεγχος ασφαλείας των φαρμάκων πρέπει να πραγματοποιείται, όταν η χημική δομή τους ή η κατηγορία στην οποία ανήκουν σχετίζεται με ανεπιθύμητες ενέργειες ή τοξικότητα. Σε περίπτωση που η χημική δομή τους είναι νέας χημικής υποκατηγορίας, τότε πρέπει να γίνεται έλεγχος του προφίλ ασφαλείας της θεραπευτικής υποκατηγορίας στην οποία ανήκουν, καθώς και της μορφοποίησης και της χρήσης για την οποία ενδείκνυται.<sup>1</sup>

Συνοπτικά, η πραγματοποίηση μιας φαρμακοεπιδημιολογικής μελέτης συμβάλλει στην καλύτερη ποσοτικοποίηση της συχνότητας εμφάνισης ανεπι-

θύμητων ενεργειών αλλά και στην αξιολόγηση και προσδιορισμό ευεργετικότητας ενός φαρμακευτικού σκευάσματος, όπως επίσης στη σύγκριση νέων φαρμάκων με τα ήδη κυκλοφορούντα όσον αφορά τη θεραπεία της ίδιας ασθένειας.<sup>1</sup>

### 1.3 Η συμβολή της φαρμακοεπιδημιολογίας στη Δημόσια Υγεία

Είναι ευρέως γνωστό πως η αξιολόγηση των επιδράσεων των φαρμάκων, θετικών και αρνητικών βασίζεται στην εδραιωμένη μεθοδολογία των τυχαιοποιημένων ελεγχόμενων κλινικών δοκιμών, όπου οι υπό εξέταση φαρμακευτικές ουσίες συγκρίνονται είτε με εικονικά φάρμακα (placebo) είτε με ήδη υπάρχοντα στην αγορά φάρμακα.<sup>4,7</sup> Ωστόσο, οι κλινικές δοκιμές δεν απεικονίζουν απόλυτα τις συνθήκες που επικρατούν στον πραγματικό κόσμο.<sup>8</sup> Χαρακτηριστικοί περιορισμοί των κλινικών δοκιμών είναι ο μικρός σχετικά αριθμός συμμετεχόντων, η σύντομη διάρκειά τους, καθώς και η εφαρμογή κριτηρίων για την επιλογή συμμετεχόντων (κατά κύριο λόγο άτομα μέσης ηλικίας, υγιείς - χωρίς ιστορικό πολλών νοσημάτων και χωρίς να ακολουθούν σύνθετες φαρμακευτικές αγωγές).<sup>9</sup>

Στην πραγματικότητα, βέβαια με αυτούς τους περιορισμούς είναι αδύνατον να εντοπιστούν κάποιες σπάνιες ανεπιθύμητες ενέργειες (π.χ. συχνότητα εμφάνισης 1 περιστατικό ανά 25,000 άτομα). Συνεπώς η ανάγκη για τη μελέτη των φαρμάκων σε συνθήκες πραγματικού κόσμου δημιούργησε γόνιμο έδαφος για την ανάπτυξη της επιστήμης της Φαρμακοεπιδημιολογίας,<sup>4,7</sup> καθώς δόθηκε η δυνατότητα να εξαχθούν αποτελέσματα και να ερμηνευθούν τόσο από κλινικής όσο και από στατιστικής άποψης.<sup>10</sup> Οι φαρμακοεπιδημιολόγοι μέσω της ανάλυσης πληθώρας δεδομένων πραγματικού κόσμου (Real World Data), προσπαθούν να εξαγάγουν την κλινική απόδειξη του πραγματικού κόσμου (Real World Evidence) σχετικά με τη χρήση και τα πιθανά οφέλη ή κινδύνους ενός φαρμακευτικού προϊόντος. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί πως φαρμακοεπιδημιολογικές μακροχρόνιες μελέτες κοόρτης, οι οποίες πραγματοποιούνται για τη διερεύνηση πιθανών κινδύνων και οφελών φαρμάκων αποτελούν μια γέφυρα για τη συσχέτιση

προυπάρχοντων και νέων δεδομένων που αφορούν την υγεία, τα δημογραφικά και νοσοκομειακά πραγματικά δεδομένα.<sup>11</sup> Χαρακτηριστικές πηγές πραγματικών δεδομένων αποτελούν τα ηλεκτρονικά αρχεία υγείας με δεδομένα συνταγογράφησης και κόστους, δεδομένα από ασφαλιστικούς φορείς, καθώς και δεδομένα από κυβερνητικές πηγές, που ασχολούνται με τη Δημόσια Υγεία.

Επομένως, η Φαρμακοεπιδημιολογία προσφέρει πληροφορίες συμπληρωματικές σε αυτές που προέκυψαν κατά τη διενέργεια των κλινικών δοκιμών, αλλά και νέες πληροφορίες σχετικά με τα φαρμακευτικά σκευάσματα (π.χ. ανεπιθύμητες ενέργειες αρκετά σπάνιες που δεν εντοπίστηκαν στην κλινική δοκιμή). Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί πως ακόμη και αν μία φαρμακοεπιδημιολογική μελέτη δεν αναδείξει μία νέα ανεπιθύμητη ενέργεια, τα αποτελέσματά της είναι σημαντικά, καθώς υποστηρίζουν περαιτέρω την ασφάλεια του υπό εξέταση φαρμάκου.<sup>1</sup>

Μερικά παραδείγματα σημαντικών αποτελεσμάτων φαρμακοεπιδημιολογικών μελετών αποτελούν: η αποσαφήνιση της επίδρασης της θεραπείας ορμονικής υποκατάστασης στην εμφάνιση καρκίνου του ενδομητρίου,<sup>12,13</sup> ο ρόλος του φυλλικού οξέος στην πρόληψη νευρολογικών διαταραχών,<sup>14</sup> ο προστατευτικός ρόλος της ασπιρίνης στα καρδιαγγειακά νοσήματα<sup>15</sup> και η προστατευτική δράση των εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών στο άσθμα.<sup>16</sup>

### 1.4 Φαρμακοεπιδημιολογία - Φαρμακοεπαγρύπνηση

#### 1.4.1 Η Φαρμακοεπιδημιολογία και η Φαρμακοεπαγρύπνηση

Η φαρμακοεπιδημιολογία εμπεριέχει και το αντικείμενο της φαρμακοεπαγρύπνησης, όπου υπάρχει η στόχευση για να αξιολογεί ανεπιθύμητες ενέργειες και να εντοπίζει επιβλαβείς συνέπειες φαρμακευτικών προϊόντων που είναι διαθέσιμα στο κοινό μέσω καταγραφής δεδομένων. Ο ρόλος λοιπόν του φαρμακοεπιδημιολόγου είναι να διερευνά τον αντίκτυπο που μπορεί να έχει στη δημόσια υγεία ένα φαρμακευτικό προϊόν διαθέσιμο στην κυκλοφορία λαμβάνοντας υπόψη πραγματικές αναφορές ανεπι-

θύμητων παρενεργειών από ασθενείς.<sup>17</sup>

#### 1.4.2 Ο ρόλος της Φαρμακοεπιδημιολογίας και Φαρμακοεπαγρύπνησης στην αντιμετώπιση της πανδημίας (Covid-19)

Η Φαρμακοεπιδημιολογία και Φαρμακοεπαγρύπνηση έπαιξαν σημαντικό ρόλο στη διαχείριση και αντιμετώπιση της πανδημίας (νόσου Covid-19). Ήταν καθοριστική η συμβολή της καταγραφής και ανάλυσης μεγάλων βάσεων δεδομένων υγείας, καθώς κατέστη εφικτό να εντοπιστούν πολύ γρήγορα σοβαρές αλλά και σπάνιες παρενέργειες των νέων εμβολίων έναντι του κορονοϊού. Το 2020 και 2021 δόθηκε άδεια κυκλοφορίας των νέων εμβολίων με σκοπό την πρόληψη και αντιμετώπιση της λοίμωξης αλλά και τον περιορισμό της διασποράς μόλυνσης από τον νέο κορονοϊό SARS-CoV-2. Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιούνταν αρκετές κλινικές δοκιμές σχετικές με εμβόλια έναντι κορονοϊών, ωστόσο το ξέσπασμα της πανδημίας Covid-19 δημιούργησε πολλά “κλινικά” ερωτήματα που ήταν ανάγκη να απαντηθούν άμεσα και αποτελεσματικά. Τα πραγματικά φαρμακοεπιδημιολογικά δεδομένα ήρθαν να απαντήσουν αυτά τα ερωτήματα που αφορούσαν την αποτελεσματικότητα των εμβολίων πριν, κατά τη διάρκεια και μετά την νόσηση από covid-19 στον γενικό πληθυσμό.<sup>18,19</sup> Έτσι, στην Ευρώπη ακολουθήθηκε ένα σύστημα επιτήρησης του προγράμματος εμβολιασμού, το οποίο στηρίχθηκε σε 2 βασικούς πυλώνες στην Φαρμακοεπιδημιολογία και Φαρμακοεπαγρύπνηση.<sup>20</sup> Επιπλέον, στις Ηνωμένες Πολιτείες διεξήχθη μελέτη για την κατανόηση και αξιολόγηση αποτελεσματικότητας θεραπευτικών σχημάτων, τα οποία στόχευαν σε νοσηλευόμενους ασθενείς με κορονοϊό.<sup>21</sup>

Επιπλέον, απαιτούνταν η κατανόηση και αξιολόγηση των θεραπευτικών σχημάτων, τα οποία έδειξαν αποτελεσματικότητα σε νοσηλευόμενους ασθενείς με κορονοϊό. Ο περιορισμένος χρόνος και η τυχαιοποίηση περιορισμένου αριθμού ασθενών στις κλινικές μελέτες όσον αφορά την αποτελεσματικότητα και ασφάλεια των εμβολίων ανέδειξε την υπεροχή και αξιοπιστία πραγματικών δεδομένων του γενικού πληθυσμού για τη λήψη σημαντικών

αποφάσεων και διαμόρφωση κλινικών οδηγιών.<sup>18,19</sup>

#### 1.5 Σκοπός

Σκοπός του άρθρου είναι να κάνει μία εισαγωγή στην επιστήμη της Φαρμακοεπιδημιολογίας αλλά και να αναδείξει την ανάγκη για διεύρυνση του ερευνητικού έργου, που μπορεί να διεξαχθεί στην Ελλάδα.

#### 2. Μεθοδολογία

Για τη συγκεκριμένη βιβλιογραφική ανασκόπηση έγινε αναζήτηση στην σχετική διεθνή και ελληνική βιβλιογραφία. Η εξαγωγή πληροφοριών έγινε από τις αναγνωρισμένες και έγκυρες μηχανές αναζήτησης και βάσεις δεδομένων Google Scholar, PubMed, Scopus και Science Direct. Η ανασκόπηση βασίστηκε σε μελέτες, άρθρα και κεφάλαια βιβλίων σχετικών με τη φαρμακοεπιδημιολογία και εκτείνεται χρονικά από το 1972 έως το 2021. Οι λέξεις - κλειδιά που χρησιμοποιήθηκαν είναι “pharmacoepidemiology (Φαρμακοεπιδημιολογία)”, “clinical research (κλινική έρευνα)”, “clinical trials (κλινικές μελέτες)”, “pharmacovigilance (Φαρμακοεπαγρύπνηση)” και αφορούσαν την αναζήτηση για τίτλο/περίληψη (title/abstract related keywords) μεμονωμένα είτε σε διάφορους συνδυασμούς. Αρχικά από την ανασκόπηση επιλέχθηκαν 125 άρθρα, από τα οποία αποκλείστηκαν τα 55 σύμφωνα με τα κριτήρια επιλογής (ήταν βιβλιογραφικές ανασκοπήσεις, οι περιλήψεις δεν συμφωνούσαν με τα ζητούμενα της ανασκόπησης, κ.α). Στη συνέχεια απορρίφθηκαν 10 άρθρα κατόπιν ανάγνωσης όλου του κειμένου που δεν ήταν σχετικό με τους στόχους της βιβλιογραφικής ανασκόπησης. Τέλος αποκλείστηκαν 3 άρθρα διότι ήταν γραμμένα σε γλώσσες πέρα της γνώσης των συγγραφέων (Γαλλικά/Ισπανικά). Η διαχείριση και οργάνωση της βιβλιογραφίας έγινε με τη χρήση λογισμικού Mendeley.

#### 3. Αποτελέσματα - Συζήτηση

##### 3.1 Τύποι Φαρμακοεπιδημιολογικών μελετών

Οι φαρμακοεπιδημιολογικές μελέτες διακρίνονται



σε περιγραφικές και αναλυτικές. Οι περιγραφικές μελέτες, και πιο συγκεκριμένα οι αναφορές περιστατικών, σειρές περιστατικών και οικολογικές ή συγχρονικές μελέτες, συνεισφέρουν στην εύρεση πιθανών κενών ασφάλειας και στη διατύπωση υποθέσεων, ενώ οι αναλυτικές μελέτες, όπως είναι οι μελέτες ασθενών-μαρτύρων και μελέτες κοορτής (cohort), καθορίζουν εάν υπάρχει πραγματική συσχέτιση αιτιατού και αποτελέσματος.<sup>6</sup>

### 3.1.1 Περιγραφικές Μελέτες

#### A) Αναφορά περιστατικού (Case report)

Είναι η καταγραφή ενός συμβάντος που παρατηρήθηκε σε έναν ασθενή ο οποίος εκτέθηκε σε ένα φαρμακευτικό σκεύασμα και παρουσίασε ένα συγκεκριμένο και κυρίως ανεπιθύμητο, αποτέλεσμα. Στην αναφορά περιστατικού αναγράφονται και τα χαρακτηριστικά του ασθενούς (ηλικία, φύλο, ιατρικό ιστορικό, κτλ). Ωστόσο, μία αναφορά περιστατικού δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για γενίκευση και αποσαφήνιση της αιτιολογίας του αποτελέσματος.<sup>22,23</sup>

#### B) Αναφορά σειράς περιστατικών (Case series)

Πρόκειται είτε για την αξιολόγηση και την περιγραφή μιας ομάδας ασθενών οι οποίοι έχουν εκτεθεί σε έναν παράγοντα είτε για την εξέταση της προηγούμενης έκθεσης μιας ομάδας ασθενών που παρουσιάζουν ένα συγκεκριμένο αποτέλεσμα. Οι σειρές περιστατικών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να προσδιοριστεί η επίπτωση μιας ανεπιθύμητης ενέργειας ενός φαρμάκου όπως επίσης μπορεί να διασφαλιστεί ότι οι ήδη γνωστές ανεπιθύμητες ενέργειες δεν εμφανίζονται σε πληθυσμό διαφορετικό από αυτόν που μελετήθηκε (Φάση IV εποπτείας μετά την κυκλοφορία του σκευάσματος).<sup>23</sup>

#### Γ) Συγχρονικές ή Οικολογικές Μελέτες

Η συγχρονική μελέτη είναι μια μη παρεμβατική μέθοδος παρατήρησης ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος, όπου ο ερευνητής καταγράφει κάποιον

συγκεκριμένο παράγοντα όπως ένα πρόβλημα υγείας, μία συμπεριφορά ή τρόπο ζωής κ.α σε συγκεκριμένο χρόνο. Ο συγκεκριμένος τύπος μελέτης επικεντρώνεται στην ανάλυση δεδομένων σε συλλογικό επίπεδο (πληθυσμιακή ομάδα) παρά σε ατομικό (ένας ασθενής). Ο ερευνητής μέσω αναλύσεων συσχέτισης ενός παράγοντα και ενός αποτελέσματος προσπαθεί να δημιουργήσει την υπόθεση και όχι να καταλήξει σε συμπεράσματα συσχέτισης παράγοντα - αποτελέσματος.<sup>24</sup> Χαρακτηριστικό παράδειγμα συγχρονικής μελέτης είναι η σύγκριση του αριθμού των συνταγών εισπνεόμενων β-αδρενεργικών αγωνιστών μιας χώρας και ο αριθμός θανάτων από άσθμα. Μπορεί να βρεθεί συσχέτιση μεταξύ αύξησης χρήσης των συγκεκριμένων φαρμάκων και αύξησης των σοβαρών περιστατικών αλλά σε καμία περίπτωση δεν μπορεί να καταλήξει ο ερευνητής σε συμπεράσματα διότι δεν γνωρίζει τι ποσοστό ασθενών με άσθμα έλαβε την αγωγή.<sup>25</sup>

### 3.1.2 Αναλυτικές μελέτες

#### A) Μελέτες ασθενών-μαρτύρων (Case-control studies)

Οι μελέτες αυτού του τύπου είναι συγκριτικές και μελέτες παρατήρησης. Συγκρίνονται άτομα με μία ασθένεια ή ένα αποτέλεσμα ενδιαφέροντος με άτομα παρόμοιας κατάστασης χωρίς την ασθένεια ή το αποτέλεσμα ενδιαφέροντος (μάρτυρες).<sup>26</sup> Μέσω χρήσης ιατρικών ιστορικών, συμπλήρωσης ερωτηματολογίων και προσωπικών συνεντεύξεων γίνεται λήψη σημαντικών πληροφοριών για το πώς κάποια έκθεση (παράγοντας) μπορεί να σχετίζεται με την εμφάνιση του αποτελέσματος. Η μελέτη ασθενών-μαρτύρων θεωρείται αναδρομική ως προς τον σχεδιασμό, καθώς η πιθανότητα έκθεσης σε έναν παράγοντα προηγείται της ημερομηνίας καταγραφής του αποτελέσματος. Οι συγκεκριμένες μελέτες μπορούν να φανούν ιδιαίτερα χρήσιμες για τη μελέτη πολλών πιθανών αιτιών μιας ασθένειας, καθώς το ίδιο δείγμα ατόμων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξέταση ενός μεγάλου αριθμού εκθέσεων ως πιθανοί παράγοντες κινδύνου. Επίσης, είναι γρήγορες, φθηνές και εύκολες στη διεξαγωγή.<sup>27</sup> Η

πιο κατάλληλη εφαρμογή τους αφορά τη διερεύνηση παραγόντων κινδύνου, οι οποίοι σχετίζονται με κάποια σπάνια ασθένεια ή κατάσταση. Ωστόσο, αυτές οι μελέτες εμφανίζουν ένα σημαντικό μειονέκτημα, το οποίο είναι η πιθανότητα ανάκλησης ενός συστηματικού σφάλματος (recall bias), εξαιτίας της υποκειμενικότητας που μπορεί να εμφανίζει ο σχεδιασμός της μελέτης. Έτσι, οι μελέτες ασθενών-μαρτύρων χρησιμοποιούνται για να εντοπίσουν πιθανές συσχετίσεις παραγόντων έκθεσης με κάποια ασθένεια αλλά σε καμία περίπτωση δεν μπορούν να δηλώσουν αποδεδειγμένη αιτιακή σχέση. Η πιο κατάλληλη εφαρμογή τους αφορά στη διερεύνηση παραγόντων κινδύνου, οι οποίοι σχετίζονται με κάποια σπάνια ασθένεια ή κατάσταση. Εμφανίζουν βέβαια ένα σημαντικό μειονέκτημα τέτοιου είδους μελέτες, το οποίο είναι η πιθανότητα ανάκλησης συστηματικού σφάλματος (recall bias), εξαιτίας της υποκειμενικότητας που μπορεί να εμφανίζει ο σχεδιασμός της μελέτης. Έτσι, οι μελέτες ασθενών-μαρτύρων χρησιμοποιούνται για να εντοπίσουν πιθανές συσχετίσεις παραγόντων έκθεσης με κάποια ασθένεια αλλά σε καμία περίπτωση δεν μπορούν να δηλώσουν αποδεδειγμένη αιτιακή σχέση.<sup>28</sup>

## **B) Μελέτες κοορτής (cohort- Μελέτες στατιστικών ομάδων)**

Οι συγκεκριμένες μελέτες πραγματοποιούνται με σκοπό την ταυτοποίηση και παρακολούθηση δύο υποομάδων ενός συγκεκριμένου πληθυσμού σε βάθος χρόνου. Η μία ομάδα πρόκειται να εκτεθεί σε έναν παράγοντα ενώ η δεύτερη ομάδα όχι. Έτσι, γίνονται συγκριτικές μελέτες αναζητώντας διαφορές στην πορεία/εξέλιξη μιας νόσου ή ενός βιολογικού παράγοντα, όπως επίσης και της κατάστασης της υγείας ή των θανάτων. Οι μελέτες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε προοπτικά, δηλαδή η μελέτη να πραγματοποιείται ταυτόχρονα με την υπό μελέτη έκθεση, είτε αναδρομικά, δηλαδή μετά την ολοκλήρωση της υπό μελέτης έκθεσης, χρησιμοποιώντας δεδομένα από ιατρικά ιστορικά ατόμων, συμπληρωμένα ερωτηματολόγια ή από προσωπικές συνεντεύξεις.<sup>29,30</sup> Ο συγκεκριμένος τύπος μελέτης προτιμάται διότι είναι απαλλαγμένος από τη δυσκο-

λία της διαδικασίας επιλογής μιας ομάδας ελέγχου. Επίσης, οι προοπτικές μελέτες κοορτής είναι απαλλαγμένες από το πρόβλημα της αμφισβητήσιμης εγκυρότητας των αναδρομικά συλλεγόμενων δεδομένων (recall bias). Για τους παραπάνω λόγους μία συσχέτιση που αποδεικνύεται από μία μελέτη κοορτής είναι πιθανό να είναι η πραγματική αιτιώδης συσχέτιση. Επιπρόσθετα, δίνει τη δυνατότητα να εξετάζονται περισσότερα από ένα αποτελέσματα όταν αυτά προκύπτουν από έναν παράγοντα έκθεσης. Τέλος, οι μελέτες κοορτής επιτρέπουν την εξαγωγή στατιστικών αποτελεσμάτων όπως είναι το ποσοστό της ασθένειας, ο αριθμός νέων περιστατικών και ο σχετικός κίνδυνος. Ωστόσο, χαρακτηρίζονται και από ορισμένα μειονεκτήματα. Η μελέτη σχετικά ασυνήθιστων αποτελεσμάτων απαιτεί εξαιρετικά μεγάλα δείγματα. Από την άλλη πλευρά, οι προοπτικές μελέτες κοορτής απαιτούν μεγάλο χρονικό διάστημα για την ολοκλήρωσή τους και ο κίνδυνος εγκατάλειψης της μελέτης από τους συμμετέχοντες αυξάνεται σημαντικά. Επιπλέον, υπάρχει και ο κίνδυνος σφάλματος επιλογής (selection bias), διότι μπορεί η μελέτη να επικεντρώνεται σε έναν παράγοντα έκθεσης χωρίς να υπολογίζει τους παράγοντες σύγχυσης (confounders) και με αυτό τον τρόπο μπορεί να χαθεί η εγκυρότητα της μελέτης.<sup>31,32</sup>

## **3.2 Δυσκολίες και περιορισμοί στον σχεδιασμό και στην υλοποίηση Φαρμακοεπιδημιολογικών μελετών**

Κάθε σχεδιασμός φαρμακοεπιδημιολογικής μελέτης, εκτός από πλεονεκτήματα, έχει και μειονεκτήματα. Παρακάτω, αναφέρονται μερικές από τις δυσκολίες και τα προβλήματα στην πραγματοποίηση φαρμακοεπιδημιολογικών μελετών.

### **3.2.1 Βάσεις δεδομένων**

Ένα από τα πλεονεκτήματα των φαρμακοεπιδημιολογικών μελετών είναι η διαχείριση και επεξεργασία μεγάλου όγκου δεδομένων. Τα δεδομένα μπορεί να είναι είτε πρωτογενή, τα οποία συλλέγονται από την παρακολούθηση μιας κοορτής ασθενών και τη

συλλογή συγκεκριμένων πληροφοριών, είτε δευτερογενή, τα οποία παραλαμβάνονται από προϋπάρχουσες βάσεις δεδομένων, π.χ. ηλεκτρονικής συνταγογράφησης, δεδομένα που διατηρούνται από ασφαλιστικές εταιρείες, κ.ο.κ.<sup>33</sup>

### A) Συλλογή πρωτογενών δεδομένων

Μία μέθοδος συλλογής πρωτογενών δεδομένων είναι μέσω ερωτηματολογίων ή προσωπικών συνεντεύξεων. Ωστόσο, η συλλογή ερωτηματολογίων είναι επιρρεπής σε σφάλματα, διότι οι συμμετέχοντες δεν είναι πάντα σε θέση να ανακαλούν ακριβείς πληροφορίες ή μπορεί η ανάκληση να είναι εσφαλμένη (recall bias). Συνεπώς, οι σχεδιασμοί φαρμακοεπιδημιολογικών μελετών οι οποίοι βασίζονται σε μνήμες των συμμετεχόντων, μπορεί να προσθέτουν σφάλματα στα αποτελέσματα, για τα οποία δεν υπάρχει ακριβής τρόπος μέτρησης. Ωστόσο, έχουν αναπτυχθεί προσεγγίσεις με τις οποίες η συλλογή τέτοιων δεδομένων μπορεί να γίνει ακριβέστερα.

### B) Χρήση δευτερογενών δεδομένων

Παρόμοια, η χρήση δευτερογενών δεδομένων υπόκειται σε σημαντικούς περιορισμούς, γεγονός το οποίο έχει τονιστεί από πολλούς ερευνητές, οι οποίοι προειδοποιούν για τον υψηλό κίνδυνο ύπαρξης σφαλμάτων κατά τη χρήση δευτερογενών δεδομένων.<sup>34-38</sup>

Το γεγονός ότι η δημιουργία τέτοιων βάσεων δεδομένων δεν αποσκοπεί στη συλλογή δεδομένων για ερευνητικούς σκοπούς, αποτελεί σημαντικό περιορισμό στη χρήση τους.<sup>33</sup>

Μελέτες που βασίζονται σε βάσεις δεδομένων ηλεκτρονικής συνταγογράφησης μπορεί να οδηγηθούν σε εσφαλμένα συμπεράσματα χρήσης φαρμάκων, επειδή είναι αβέβαιο το κατά πόσο ο ασθενής έχει πράγματι λάβει το φάρμακο. Μάλιστα, ορισμένα συνταγογραφούμενα φάρμακα αγοράζονται χωρίς ιατρική συνταγή, κάτι που δεν καταγράφεται στις εν λόγω βάσεις δεδομένων. Τέλος, υπάρχουν περιπτώσεις όπου ο τρόπος κωδικοποίησης της βάσης δεδομένων εισάγει περιορισμούς στην ορθή τελική καταγραφή.<sup>39</sup> Αξίζει να σημειωθεί ότι σε πε-

ριπτώσεις όπου ο χρόνος λήψης του φαρμάκου είναι καθοριστικός παράγοντας εμφάνισης ανεπιθύμητης ενέργειας (π.χ. βραχυπρόθεσμες υπερτασικές κρίσεις), τέτοιες βάσεις δεδομένων δεν είναι κατάλληλες, διότι δε διαθέτουν ακριβή στοιχεία χρόνου.

Επιπρόσθετα, ενδέχεται να απουσιάζουν σημαντικές πληροφορίες ή να μην εκπροσωπούνται όλες οι κατηγορίες του ευρύτερου πληθυσμού τους οποίους αφορά το ερευνητικό ερώτημα. Για παράδειγμα, οι βάσεις δεδομένων που διατηρούνται από ασφαλιστικές εταιρείες, μπορεί να περιορίζονται σε άτομα με λιγότερες υποκείμενες σοβαρές ασθένειες ή κυρίως σε εργαζόμενα άτομα. Κατά συνέπεια, τέτοιες βάσεις δεδομένων ενδέχεται να μην αντικατοπτρίζουν το εύρος της υπό μελέτη έκθεσης στον πληθυσμό-στόχο, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε μη ακριβή εντοπισμό πιθανών ανεπιθύμητων ενεργειών.<sup>33</sup>

### 3.2.2 Ασυμφωνία μεταξύ των φαρμακοεπιδημιολογικών μελετών

Υπάρχουν περιπτώσεις μελετών οι οποίες διαπραγματεύονται το ίδιο ερώτημα, ωστόσο καταλήγουν σε διαφορετικά συμπεράσματα. Η ασυμφωνία αυτή των αποτελεσμάτων υπονομεύει την εγκυρότητα των φαρμακοεπιδημιολογικών μελετών. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η εξέταση της συσχέτισης της λήψης ροφεκοξίμπης με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου. Το 2003, ο Mamdani et al., κατέληξαν στο αποτέλεσμα ότι η χρήση ροφεκοξίμπης δε σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου.<sup>40</sup> Ωστόσο, το 2004, ο Ray et al., συμπέρανε ότι υπάρχει συσχέτιση η οποία δείχνει ότι ο κίνδυνος εμφράγματος του μυοκαρδίου αυξάνεται με τη χρήση υψηλών δόσεων ροφεκοξίμπης (25mg ή υψηλότερες) και όχι χαμηλότερων.<sup>41</sup> Η διαφορά των δύο μελετών ήταν ότι η δεύτερη εξέτασε την επίδραση διαφορετικών δόσεων του φαρμάκου.

Από το παραπάνω παράδειγμα, γίνεται σαφές ότι οι διαφορές στον σχεδιασμό της μελέτης, μπορεί να οδηγήσουν τους ερευνητές σε διαφορετικά συμπεράσματα, γεγονός που επισημαίνει τη σημαντικότητα τόσο του σωστού σχεδιασμού όσο και

τη δυσκολία του ορθού σχεδιασμού και πραγματοποίησης μιας φαρμακοεπιδημιολογικής μελέτης, λαμβάνοντας υπόψιν κάθε πιθανό παράγοντα που μπορεί να επηρεάσει το τελικό αποτέλεσμα.

### 3.2.3 Μεροληπτικότητα (bias) και σύγχυση (confounding)

Μεροληπτικότητα (bias) είναι η συστηματική ροπή προς το λάθος αποτέλεσμα και οδηγεί σε εσφαλμένη εκτίμηση της πραγματικής επίδρασης μιας έκθεσης στο αποτέλεσμα ενδιαφέροντος. Η σύγχυση (confounding) είναι τα λανθασμένα συμπεράσματα εξαιτίας της επίδρασης μίας μεταβλητής που σχετίζεται τόσο με την έκθεση όσο και με την υπό μελέτη ασθένεια, χωρίς ωστόσο να είναι αιτιατός παράγοντας.<sup>42,43</sup> Παράδειγμα σύγχυσης αποτελεί μία μελέτη του Miettinen, όπου έδειξε ότι οι από του στόματος κουμαρίνες αυξάνουν τον κίνδυνο φλεβικής θρόμβωσης.<sup>44</sup> Ωστόσο, καλά σχεδιασμένες τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες έδειχναν το αντίθετο. Η αιτία αυτής της διαφοράς είναι ότι παρόλο που ο Miettinen προσάρμοσε τον σχεδιασμό της μελέτης του για να μειώσει την επίδραση των παραγόντων σύγχυσης στο τελικό αποτέλεσμα, δεν κατάφερε να περιορίσει όλους αυτούς, με αποτέλεσμα η συσχέτιση να παραμένει θετική, χωρίς πραγματικά να είναι.

Από τα παραπάνω παραδείγματα φαίνεται καθαρά ότι η παρατηρησιακή φύση της Φαρμακοεπιδημιολογίας την καθιστά επιρρεπή σε σφάλματα της μεροληπτικότητας (bias) και της σύγχυσης (confounding), καθώς οι επιδημιολόγοι δε μπορούν να καθορίσουν το ποιος θα δεχθεί ή όχι την έκθεση και σε μερικές περιπτώσεις, δε μπορούν να εξαλείψουν την επίδραση συγχυτικών παραγόντων.<sup>45</sup>

### 3.2.4 Στατιστική ισχύς

Στατιστική ισχύς μιας φαρμακοεπιδημιολογικής μελέτης είναι η πιθανότητα να απορρίψει ή να δεχθεί ορθώς την αρχική ερευνητική υπόθεση, βασισμένη σε έναν συγκεκριμένο βαθμό αξιοπιστίας. Η αξιοπιστία μιας μελέτης μπορεί να προσδιοριστεί από το εύρος του διαστήματος εμπιστοσύνης (Confidence interval) για την εκτιμώμενη επίδραση. Για να έχει

μεγάλη στατιστική ισχύς μία μελέτη, θα πρέπει να διαθέτει μεγάλο δείγμα. Οι συσχετισμοί που μπορεί να προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση του δείγματος μπορεί να μην έχουν αιτιακή σχέση στην πραγματικότητα. Ωστόσο, χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή διότι όσο πιο ασθενής είναι μία συσχέτιση μεταξύ έκθεσης και ασθένειας, τόσο μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος απαιτείται, και το αντίστροφο. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν είναι πάντα εφικτό να επιτυγχάνεται υψηλή στατιστική ισχύς στις μελέτες, καθώς δεν είναι πάντα δυνατή η εύρεση μεγάλου δείγματος του υπό μελέτη πληθυσμού. Έτσι, ορισμένες μελέτες μπορεί να οδηγηθούν σε εσφαλμένα συμπεράσματα, παρόλο που η διεξαγωγή της στατιστικής ανάλυσης ήταν ορθή.<sup>46</sup>

### 3.2.5 Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Η παρατηρησιακή φύση της επιδημιολογίας δημιουργεί δυσκολία στο να εξαχθούν συμπεράσματα για αιτιολογικές σχέσεις βασισμένες αποκλειστικά στις επιδημιολογικές μελέτες. Όμως, σε συνδυασμό με πληροφορίες από άλλες πηγές (π.χ. βασισμένες σε προ-και κλινικά δεδομένα), οι επιδημιολογικές μελέτες μπορούν να συνεισφέρουν στην επαλήθευση μιας αιτιώδους συνάφειας. Επομένως, τα επιδημιολογικά πορίσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διαμόρφωση και καθορισμό κλινικών οδηγιών που περιορίζουν την έκθεση, αν και πρέπει να σημειωθεί η σημασία των πληροφοριών, οι οποίες προέρχονται και από άλλες πηγές και συμβάλλουν στην ολιστική προσέγγιση και διαμόρφωση τελικών συμπερασμάτων.

### 3.3. Η Φαρμακοεπιδημιολογία στην Ελλάδα

Αν και ο κλάδος της Φαρμακοεπιδημιολογίας είναι εξαιρετικά ανεπτυγμένος στις περισσότερες χώρες της Δυτικής Ευρώπης αλλά και της Βόρειας Αμερικής, όπου σε τομείς όπως η φαρμακοεπαγρύπνηση και η φαρμακοοικονομία γίνεται προσπάθεια αξιοποίησης των διαθέσιμων δεδομένων, η Ελλάδα έχει μείνει πίσω, τόσο στο σχεδιασμό όσο και στην υλοποίηση φαρμακοεπιδημιολογικών μελετών. Παρόλα αυτά έχουν γίνει προσπάθειες για την αξιοποι-

ηση φαρμακοεπιδημιολογικών δεδομένων, ορισμένες από τις οποίες θα παρατεθούν παρακάτω.

Μία από τις πρώτες φαρμακοεπιδημιολογικές μελέτες στην Ελλάδα πραγματοποιήθηκε το 1972 από την ερευνητική ομάδα του κ. Λυμπεράτου σχετικά με τη χρήση αντιβιοτικών στα ελληνικά νοσοκομεία.<sup>47</sup> Επίσης, όπως φαίνεται στο άρθρο που δημοσιεύτηκε από τον κ. Τζίμη το 2001, η κατάσταση όσον αφορά τη διενέργεια έρευνας από τα νοσοκομεία είναι αρκετά δυσμενής, με σημαντικές δυσκολίες για τους ερευνητές επαγγελματιών υγείας και απουσία χρηματοδοτήσεων.<sup>48</sup>

Η ερευνητική ομάδα του κ. Κονταξάκη πραγματοποίησε μελέτη σχετικά με τη χρήση άτυπων αντιψυχωσικών σε ασθενείς με σχιζοφρένεια,<sup>49</sup> ενώ η ομάδα της κας. Καπάκη διερεύνησε την επίδραση των αναστολέων χολινεστεράσης στη νοητική ικανότητα ασθενών.<sup>50</sup> Παράλληλα, η κα. Σκουρολιάκιου ηγήθηκε μελέτης για την κατανάλωση φαρμακευτικών σκευασμάτων κατά τη διάρκεια των Ολυμπιακών Αγώνων του 2004<sup>51</sup> και η ομάδα του κ. Κακουλίδη αξιολόγησε τη γλυκαιμική εικόνα γυναικών με διαβήτη της κύησης που λάμβαναν βιταμειοπληρωμένα.<sup>52</sup> Τέλος, η κα. Μαλτέζου έχει συνεισφέρει στην πρόωση της φαρμακοεπιδημιολογικής έρευνας στη χώρα με το ερευνητικό της έργο να επικεντρώνεται στην εμβολιαστική κάλυψη επαγγελματιών υγείας και στην κατανάλωση και συνταγογράφηση αντιβιοτικών.<sup>53-55</sup>

Η πρώτη συντονισμένη προσπάθεια για τη δημιουργία μιας Ερευνητικής Ομάδας με αντικείμενο τη Φαρμακοεπιδημιολογία έγινε από το Τμήμα Ιατρικής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης και συγκεκριμένα, στο Εργαστήριο Υγιεινής και Προστασίας Περιβάλλοντος του Τμήματος Ιατρικής του Δ.Π.Θ. με διευθυντή τον Καθηγητή κ. Θεόδωρο Κωνσταντινίδη. Το Τμήμα Ιατρικής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης ήταν το πρώτο τμήμα, που εισήγαγε το μάθημα «Φαρμακοεπιδημιολογία» στο Προπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών, ενώ παράλληλα ξεκίνησε την πραγματοποίηση διαλέξεων Φαρμακοεπιδημιολογίας στα Μεταπτυχιακά Προγράμματα Σπουδών αλλά και την εκπόνηση διδακτορικών διατριβών με θέμα τη φαρμακοεπιδημιολογική ανάλυση δεδομένων.

Τα ερευνητικά ενδιαφέροντα της Ερευνητικής ομάδας Φαρμακοεπιδημιολογίας της Ιατρικής Δ.Π.Θ. επικεντρώνονται στη χρήση Μη Συνταγογραφούμενων Φαρμάκων,<sup>56</sup> στην αξιολόγηση των γνώσεων του πληθυσμού όσον αφορά τη χρήση αναλγητικών φαρμακευτικών σκευασμάτων, στη χρήση βιταμινών και συμπληρωμάτων διατροφής, στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ φαρμάκων,<sup>57,58</sup> στην πολυφαρμακία (ιδίως σε άτομα τρίτης ηλικίας), καθώς και στα χαρακτηριστικά συνταγογράφησης σε ασθενείς στην Ελλάδα με συχνά νοσήματα (υπερχοληστερολαιμία, αρθρίτιδες<sup>59</sup> και καρδιαγγειακές παθήσεις<sup>60</sup>), ενώ έχουν πραγματοποιηθεί και άλλες δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά<sup>61, 62</sup>. Ακολουθώντας τις εξελίξεις στον τομέα της Φαρμακοεπιδημιολογίας, το εργαστήριο έχει επικεντρωθεί ερευνητικά σε μελέτες, οι οποίες αφορούν μεγάλους πληθυσμούς και δεδομένα πραγματικού κόσμου.<sup>63</sup> Παράλληλα, μέλη του εργαστηρίου είναι ενεργά σε ερευνητικά προγράμματα που υποστηρίζονται από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων<sup>64</sup> (European Medicines Agency),<sup>65</sup> αλλά και σε δράσεις του Ευρωπαϊκού Δικτύου Κέντρων για τη Φαρμακοεπιδημιολογία και τη Φαρμακοεπαγρύπνηση (European Network for Centres for Pharmacoepidemiology and Pharmacovigilance) όπως επίσης Διεθνής συνεργασίες με διακεκριμένα Φαρμακοεπιδημιολογικά ερευνητικά κέντρα (Rutgers University, USA).

Περιλήψεις (Scientific Abstracts) των υπό εξέλιξη ή ολοκληρωμένων εργασιών στο αντικείμενο της Φαρμακοεπιδημιολογίας παρουσιάζονται σε Πανελλήνια συνέδρια όπως τα “Υπηρεσιών Υγείας Φαρμακείου”, “Φόρουμ Δημόσιας Υγείας & Κοινωνικής Ιατρικής” και “Οικονομικά και Πολιτικές της Υγείας”, με στόχο την πρόωση της Φαρμακοεπιδημιολογικής έρευνας στην Ελλάδα. Στην Αλεξανδρούπολη φιλοξενείται το Πανελλήνιο Συμπόσιο Φαρμακοεπιδημιολογίας, το οποίο διοργανώνεται από το Εργαστήριο Υγιεινής και Προστασίας Περιβάλλοντος του Τμήματος Ιατρικής Δ.Π.Θ. σε συνεργασία με τον Φαρμακευτικό Σύλλογο Έβρου. Έως σήμερα έχουν διεξαχθεί τέσσερα συμπόσια, το 2016, 2017, 2018 και 2021 με τη συμμετοχή διακεκριμένων Ελλήνων και ξένων επιστημόνων. Επίσης, το Εργαστήριο συμμετέχει στη διοργάνωση training

schools σε επαγγελματίες υγείας αλλά και στελέχη φαρμακευτικών επιχειρήσεων σχετικά με το ρόλο και το αντικείμενο της Φαρμακοεπιδημιολογίας, καθώς και τη χρησιμότητα της

Διαπιστώνεται λοιπόν πως ο τομέας της Φαρμακοεπιδημιολογίας στην Ελλάδα βρίσκεται σε πολύ πρώιμα στάδια, συντονισμένες όμως ερευνητικές μελέτες μπορούν να αποφέρουν σημαντικές αλλαγές και βελτιώσεις στον χώρο του φαρμάκου. Η έλλειψη ωστόσο πρόσβασης σε επαρκείς κι ορ-

γανωμένες βάσεις δεδομένων όσον αφορά εθνικά δεδομένα ηλεκτρονικής συνταγογράφησης και δεδομένων μεγάλων ασφαλιστικών φορέων στο ελληνικό κράτος αποτελεί εμπόδιο που θα πρέπει να ξεπεραστεί. Παραπάνω παρουσιάστηκαν σημαντικές προσπάθειες ως προς την προώθηση και την ανάπτυξη της Φαρμακοεπιδημιολογίας αλλά επιτακτική είναι η ανάγκη και περαιτέρω ερευνητικής ενασχόλησης για την ανάπτυξη αυτής της σπουδαίας επιστήμης. □

## Pharmacoepidemiology - The Unknown Aspect of a Well-known Scientific Field

Foteini Dermiki-Gkana\*, Elena Deligianni\*, Panagiotis-Nikolaos Lalagkas\*, Georgios Poulentzas\*, Spyros Polyzois, Theodoros Constantinidis, Christos Kontogiorgis, \*\*

*Laboratory of Hygiene and Environmental Protection, Department of Medicine, Democritus University of Thrace, Alexandroupolis, Greece*

### KEYWORDS:

**Pharmacoepidemiology,  
Pharmacovigilance,  
Covid-19, Clinical  
Research, Epidemiology,  
Pharmaceutics,  
Clinical Trials**

### CORRESPONDING AUTHORS:

*\*Equally contributed*

*\*\*Author for correspondence:*

*Christos Kontogiorgis\*\**

*Email: ckontogi@med.duth.gr*

*Tel +302551030601*

*Fax: +302551030546*

### ABSTRACT

**Introduction:** Pharmacoepidemiology is defined as “the science that investigates the use and action of drugs on a large population scale” according to the World Health Organization. The aim of this review is to highlight the important role of pharmacoepidemiology and its research standing in Greece.

**Methodology:** For this literature review, articles and relative information was extracted using the academic search engines and databases Google Scholar, PubMed, Scopus and Science Direct. The review includes literature content from 1972 to 2021 and the keywords that were used for the literature search are “Pharmacoepidemiology”, “clinical research”, “clinical studies”, and “Pharmacovigilance”.

**Results - Discussion:** Fundamental aims of Pharmacoepidemiology are: a) the enhancement of clinical research with the collection and analysis of Real-World Data, b) the detection of potential side effects of pharmaceutical products and c) the study/investigation of new therapeutic actions of pharmaceutical products for their beneficial use beyond their main known action. Additional reasons that make it crucial to conduct pharmacoepidemiologic studies nowadays are related to regulatory, legal, marketing, and clinical research evolution factors. The

main tools of Pharmacoepidemiology are: (i) advanced epidemiological methods which are applied to clinical research data and (ii) databases that have been developed significantly in recent years due to the progress of computer science and big data analytics. Some of the main resources of real-world data used in pharmacoepidemiologic science are drug prescription-cost related data, health insurance databases, and government related resources. The types of the studies that are used to conduct a pharmacoepidemiologic research are: i) descriptive studies (reports/case series and ecological or cross-sectional studies) aiming to enhance drug safety and pharmaceutical risk assessment and ii) analytical studies (case control and cohort studies) aiming to highlight the cause-effect relationships and detect risk-disease factors. However, despite the excellent design of a pharmacoepidemiologic research study, there are limitations related to the quality of data (primary/secondary) obtained and analyzed but also the population group size studied. There are also further limitations such as bias and recall bias, confounding factors, lack of organized valid large databases for research purposes that may pose an important burden to the proper design of a study. Finally, the reliability of a pharmacoepidemiologic study is very crucial based on its statistical power as defined by the confidence intervals and the large and well-defined/represented population sample. It is worth mentioning that the contribution of pharmacoepidemiology was highlighted significantly during the Covid-19 pandemic as a key pharmacovigilance tool that has identified and recorded serious and rare side effects of the new, innovative vaccines against the coronavirus disease.

**Conclusion:** Pharmacoepidemiology studies are truly valuable since they can also act as a complementary assessment tool to the formation and updates of clinical guidelines. In Greece, the scientific field of pharmacoepidemiology is still in very early foundation stage, although there are groups of Greek scientists -researchers in recent decades that they have been trying through their work to develop and evolve this fascinating scientific field.

## Βιβλιογραφία

1. Strom B.L., Kimmel S.E., Hennessy S, eds. (2013) *Textbook of Pharmacoepidemiology*. 2nd edition. Wiley-Blackwell. doi:10.1016/j.therap.2018.10.003
3. Evans S.J.W. An agenda for UK clinical pharmacology: Pharmacoepidemiology. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 73(6):973-978, 2012 . doi:10.1111/j.1365-2125.2012.04248.x
4. Montastruc J.L., Benevent J., Montastruc F. et al. What is pharmacoepidemiology? Definition, methods, interest and clinical applications. *Therapies* 74(2),169-174, 2019. doi:10.1016/j.therap.2018.08.001
5. Shader RI. Pharmacoepidemiology. *Clin Ther.* 41(11):2199-2201, 2019. doi:10.1016/j.clinthera.2019.10.007
6. Noe M.H., Gelfand J.M. Research Techniques Made Simple: Pharmacoepidemiology Research Methods in Dermatology. *J. Invest. Dermatol.*138(2):e13-e18, 2018. doi:10.1016/j.jid.2017.10.026
7. Moore N., Blin P., Droz C. Pharmacoepidemiology *Handb. Exp. Pharmacol.* . 433-451, 2019 . doi:10.1007/164\_2019\_318
8. Martin K., Bégaud B., Latry P., Miremont-Salamé G., Fourrier A., Moore N. Differences between clinical trials and postmarketing use. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 57(1), 86-92, 2003. doi:10.1046/j.1365-2125.2003.01953.x
9. Hartzema A.G., Porta M.S., Tilson H.H., Rogers A.S. Adverse Drug Events: Identification and Attribution. *Drug Intell. Clin. Pharm.* 21(11), 915-920, 1987. doi:10.1177/106002808702101114
10. Harrington D., D'Agostino R.B., Gatsonis C., et al. New Guidelines for Statistical Reporting in the *Journal. N. Engl. J. Med.* 381(3), 285-286, 2019. doi:10.1056/NEJMe1906559
11. Bérard A. Pharmacoepidemiology Research-Real-World Evidence for Decision Making. *Front Pharmacol.* 12, 2021. doi:10.3389/fphar.2021.723427
12. Schottenfeld D. Epidemiology of endometrial neoplasia. *J. Cell Biochem.* 59(S23, 151-159, 1995. doi:10.1002/jcb.240590920
13. Jyotsna V. Postmenopausal hormonal therapy: Current status. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 17(7),45, 2013. doi:10.4103/2230-8210.119504
14. Czeizel A.E. Primary Prevention of Neural-Tube Defects and Some Other Major Congenital Abnormalities. *Paediatr Drugs.* 2(6), 437-449, 2000. doi:10.2165/00128072-200002060-00003
15. Jick H., Miettinen OS. Regular aspirin use and myocardial infarction. *B.M.J.* 1(6017), 1057-1057, 1976. doi:10.1136/bmj.1.6017.1057
16. Suissa S., Ernst P., Benayoun S., Baltzan M., Cai B. Low-Dose Inhaled Corticosteroids and the Prevention of Death from Asthma. *N. Engl. J. Med.* 343(5), 332-336, 2000. doi:10.1056/NEJM200008033430504
17. Delcher C., Chen G., Wang Y., Slavova S., Goldberger B.A. Fatal poisonings involving propoxyphene before and after voluntary withdrawal from the United States' market: An analysis from the state of Florida. *Forensic Sci. Int.* 280, 228-232, 2017. doi:10.1016/j.forsciint.2017.10.008
18. Vasileiou E., Simpson C.R., Shi T., et al. Interim findings from first-dose mass COVID-19 vaccination roll-out and COVID-19 hospital admissions in Scotland: a national prospective cohort study. *The Lancet.* 397(10285), 1646-1657, 2021. doi:10.1016/S0140-6736(21)00677-2
19. Kuehn B.M. Israel's Real-life Evidence That Vaccine Can Prevent Severe COVID-19. *JAMA.* 325(16), 1603, 2021. doi:10.1001/jama.2021.5617
20. Pariente A., Bezin J. Evaluation of Covid-19 vaccines: Pharmacoepidemiological aspects. *Therapies.* 76(4), 305-309, 2021. doi:10.1016/j.therap.2021.05.002
21. Gerlovin H., Posner D.C., Ho Y.L, et al. Pharmacoepidemiology, Machine Learning, and COVID-19: An Intent-to-Treat Analysis of Hydroxy-



- chloroquine, With or Without Azithromycin, and COVID-19 Outcomes Among Hospitalized US Veterans. *Am. J. Epidemiol.* 190(11), 2405-2419, 2021. doi:10.1093/aje/kwab183
22. Wertheimer A.I., Andrews K.B. An overview of pharmacoepidemiology. *Pharmacy World & Science.* 17(3), 61-66, 1995. doi:10.1007/BF01875433
  23. Strom B.L. The Promise of Pharmacoepidemiology. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 27(1), 71-86, 1987. doi:10.1146/annurev.pa.27.040187.000443
  24. Sedgwick P. Ecological studies: advantages and disadvantages. *B.M.J.* 348(may02 4):g2979-g2979, 2014. doi:10.1136/bmj.g2979
  25. Delcher C., Moga D., Li Y., Muñoz M., Sohn M., Bae J. (2021) In: Pharmacoepidemiology and pharmacovigilance. *Remington (Twentythree Edition)*. Elsevier. p.p. 899-913. doi:10.1016/B978-0-12-820007-0.00051-9
  26. Setia M. Methodology series module 2: Case-control studies. *Indian J. Dermatol.* 61(2),146, 2016. doi:10.4103/0019-5154.177773
  27. Sedgwick P. Case-control studies: advantages and disadvantages. *B.M.J.* 348, f7707-f7707, 2014. doi:10.1136/bmj.f7707
  28. Tenny S., Kerndt C.C., Hoffman M.R. *Case Control Studies*, (2022). In StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. PMID: 28846237.
  29. Morrow B. An overview of cohort study designs and their advantages and disadvantages. *Int. J. Ther. Rehabil.* 17(10), 518-523, 2010. doi:10.12968/ijtr.2010.17.10.78810
  30. Grimes D.A., Schulz K.F. An overview of clinical research: the lay of the land. *The Lancet.* 359(9300), 57-61, 2002. doi:10.1016/S0140-6736(02)07283-5
  31. Grimes D.A., Schulz K.F. Cohort studies: marching towards outcomes. *The Lancet.* 359(9303), :341-345, 2002. doi:10.1016/S0140-6736(02)07500-1
  32. Song J.W., Chung K.C. Observational Studies: Cohort and Case-Control Studies. *Plast. Reconstr. Surg.* 126(6), 2234-2242, 2010. doi:10.1097/PRS.0b013e3181f44abc
  33. Wise L. Risks and benefits of (pharmaco)epidemiology. *Ther. Adv. Drug Saf.* 2(3), 95-102, 2011. doi:10.1177/2042098611404920
  34. Schneeweiss S., Avorn J. A review of uses of health care utilization databases for epidemiologic research on therapeutics. *J. Clin. Epidemiol.* 58(4), 323-337, 2005. doi:10.1016/j.jclinepi.2004.10.012
  35. Moore T.J., Furberg C.D. Electronic Health Data for Postmarket Surveillance: A Vision Not Realized. *Drug Saf.* 38(7), 601-610, 2015. doi:10.1007/s40264-015-0305-9
  36. van Walraven C., Austin P. Administrative database research has unique characteristics that can risk biased results. *J. Clin. Epidemiol.* 65(2),126-131, 2012. doi:10.1016/j.jclinepi.2011.08.002
  37. Weiss N.S. The New World of Data Linkages in Clinical Epidemiology. *Epidemiology.* 22(3), 292-294, 2011. doi:10.1097/EDE.0b013e318210aca5
  38. Gagne J.J. Restrictive Reimbursement Policies: Bias Implications for Claims-Based Drug Safety Studies. *Drug Saf.* 37(10), 771-776, 2014. doi:10.1007/s40264-014-0220-5
  39. Hallas J. Pharmacoepidemiology – current opportunities and challenges. *Norsk Epidemiologi.* 11(1), 2009. doi:10.5324/nje.v11i1.527
  40. Mamdani M., Rochon P., Juurlink D.N, et al. Effect of Selective Cyclooxygenase 2 Inhibitors and Naproxen on Short-term Risk of Acute Myocardial Infarction in the Elderly. *Arch. Intern. Med.* 163(4), 481, 2003. doi:10.1001/archinte.163.4.481
  41. Ray W.A, Stein C.M, Daugherty J.R., Hall K., Arbogast P.G., Griffin M.R. COX-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of serious coronary heart disease. *The Lancet.* 360(9339):1071-1073, 2002. doi:10.1016/S0140-6736(02)11131-7
  42. Hennekens C.H. Buring J.E (1987) *Epidemiology in Medicine* 1st edition. Little, Brown, and Company. Boston/Toronto.
  43. Carneiro I., Howard N. (2011) *Introduction to Epidemiology (EBook) [WorldCat.Org]*. 2nd edi-

- tion. Open University Press. Accessed March 30, 2022. <https://www.worldcat.org/title/introduction-to-epidemiology/oclc/773348873>
44. Miettinen O.S. The need for randomization in the study of intended effects. *Stat. Med.* 2(2),267-271, 1983. doi:10.1002/sim.4780020222
  45. ENCePP Home Page. (n.d.). Accessed March 30, 2022. [http://www.encepp.eu/standards\\_and\\_guidances/methodologicalGuide5\\_2.shtml](http://www.encepp.eu/standards_and_guidances/methodologicalGuide5_2.shtml)
  46. Suissa S. Statistical Methods in Pharmacoepidemiology. *Drug Saf.* 6(5), 381-389, 1991. doi:10.2165/00002018-199106050-00008
  47. Lyberatos C., Lyberatos E., Arapakis G., et al. A Survey on the Use of Antibiotics in Greek Hospitals. *Chemotherapy.* 17(5), 364-367, 1972. doi:10.1159/000220869
  48. Tzimis L. Ethical issues arising in pharmacoepidemiologic research in a community hospital in Crete, Greece. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 10(7), 631, 2001. doi:10.1002/pds.636
  49. Kontaxakis V.P., Havaki-Kontaxaki B.J., Kollias C.T., Margariti M.M., Stamouli S.S., Christodoulou G.N. Atypical Antipsychotic Use Among Acute Schizophrenic Inpatients. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 15(1),118-a-119, 2003. doi:10.1176/jnp.15.1.118-a
  50. Kapaki E., Paraskevas G.P. The cognitive effects of cholinesterase inhibitor treatment in everyday practice. *Curr. Med. Res. Opin.* 21(6), 871-875, 2005. doi:10.1185/030079905X46359
  51. Skouroliakou M., Kani C, Kompogiorgas S., Kontozamanis V. Drug Consumption During the 2004 Olympics: The Special Olympic Pharmacy. *Pharmacy World & Science.* 27(6), 478-479, 2005. doi:10.1007/s11096-005-2223-x
  52. Kakoulidis I., Ilias I., Linardi A., Milionis C., Michou A., Koukkou E. Glycemic profile assessment during betamethasone administration in women with gestational diabetes mellitus. *Diabetes & Metabolic Syndr.: Clin. Res. Rev.* 13(1):214-215, 2019. doi:10.1016/j.dsx.2018.08.001
  53. Maltezou H.C., Gargalianos P, Nikolaidis P, et al. Attitudes towards mandatory vaccination and vaccination coverage against vaccine-preventable diseases among health-care workers in tertiary-care hospitals. *J. Infect.* 64(3),319-324, 2012. doi:10.1016/j.jinf.2011.12.004
  54. Maltezou H.C., Adamis G., Tsonou P, Moustaka E., Katerelos P, Gargalianos P. Consumption of antibiotics for community-acquired infections by adults in Greece: A cross-sectional study. *Am. J. Infect. Control.* 44(12), 1741-1743, 2016. doi:10.1016/j.ajic.2016.04.242
  55. Maltezou H.C., Maltezos E., Antoniadou A., et al. Prescription of antibiotics and knowledge about antibiotic costs among physicians working in tertiary-care hospitals. *J. Chemother.* 26(6), 375-378, 2014. doi:10.1179/1973947813Y.0000000160
  56. Kontogiorgis C., Nena E., Berberoglou E., et al. Estimating Consumers' Knowledge and Attitudes Towards Over-The-Counter Analgesic Medication in Greece in the Years of Financial Crisis: The Case of Paracetamol. *Pain Ther.* 5(1), 19-28, 2016. doi:10.1007/s40122-015-0042-x
  57. Lalagkas P.N., Poulentzas G., Tsiolis L., et al. Investigating Potential Drug-Drug Interactions from Greek e-Prescription Data. *Curr. Drug Saf.* 17(2), 114-120, 2022. doi:10.2174/1574886316666210816115811
  58. Lalagkas P.N., Poulentzas G., Kontogiorgis C., Douros A. Potential drug-drug interaction between sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors and statins: pharmacological and clinical evidence. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 17(6), 697-705, 2021. doi:10.1080/17425255.2021.1921735
  59. Deligiannidou G.E., Gougoula V., Bezirtzoglou E., Kontogiorgis C., Constantinides T.K. The Role of Natural Products in Rheumatoid Arthritis: Current Knowledge of Basic In Vitro and In Vivo Research. *Antioxidants.* 10(4), :599, 2021. doi:10.3390/antiox10040599
  60. Kontogiorgis C., Valikeserlis I, Hadjipavlou-Litina D., Nena E., C., Constantinidis T. Use of Non-Selective Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Relation to Cardiovascular Events. A Systematic Pharmacoepidemiological Review. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 14(6), 502-513, 2016. doi:10.2174/1570161114666160728093323

61. Lalagkas P.N., Poulentzas G., Takaviti A., et al. Community Attitudes and Habits Toward Over-The-Counter Drugs: Results of a Study Conducted in Thessaloniki, Greece. *Value Health Reg. Issues.* 28, 38-45, 2022. doi:10.1016/j.vhri.2021.07.012
62. Lalagkas P.N., Polyzois S., Papanas N., et al. Prevalence of pharmacologically treated type 2 diabetes mellitus in 2012–2016 in Greece: Real-World Data. *Prim. Care Diabetes.* 16(5), 714-716, 2022. doi:10.1016/j.pcd.2022.07.001
63. Petrakis I., Kontogiorgis C., Nena E., et al. Unraveling innovation potential in the real-world setting: eighteen novel agents with twenty-six approved European indications, in the management of leukemias, lymphomas, and multiple myeloma. *Expert Rev. Hematol.* 12(12), 1063-1075, 2019. doi:10.1080/17474086.2019.1668763
64. Sultana J., Crisafulli S., Almas M., et al. Overview of the <sc>European post-authorisation study</sc> register post-authorization studies performed in Europe from September 2010 to December 2018. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 31(6), 689-705, 2022. doi:10.1002/pds.5413
65. Roque Pereira L., Durán C.E., Layton D., et al. A Landscape Analysis of Post-Marketing Studies Registered in the EU PAS Register and Clinical-Trials.gov Focusing on Pregnancy Outcomes or Breastfeeding Effects: A Contribution from the ConcePTION Project. *Drug Saf.* 45(4), 333-344, 2022. doi:10.1007/s40264-022-01154-7



# Preparation and Evaluation of Dispersed Systems of Topical Anesthetic Drugs. The Example of a Benzocaine Galenic Formulation

Costas Demetzos<sup>1\*</sup>, Nikolaos Naziris

<sup>1</sup>Section of Pharmaceutical Technology, Department of Pharmacy, School of Health Sciences, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimioupolis Zografou, Athens 15771, Greece

## KEYWORDS:

**Benzocaine; Galenic formulation; dispersed system; Stability**

## ARTICLE INFO:

Received: January 19, 2023

Accepted: January 22, 2023

Available on line: March 23, 2023

## \* CORRESPONDING

## AUTHORS:

Costas Demetzos, E-mail:  
demetzos@pharm.uoa.gr

## ABSTRACT

Topical anesthetics are drug molecules that are widely utilized in medical applications, including the treatment of painful conditions, the prevention of pain during a procedure and the relieve of pain post-surgery. Benzocaine (ethyl 4-aminobenzoate) is a water-insoluble topical anesthetic drug that is used for the temporary relief of pain caused by minor irritation, soreness, or injury of the mouth and throat. It is the active ingredient in some over-the-counter (OTC) products, including ointments, sprays, gels and solutions. However, the low solubility of benzocaine in water renders it impossible to develop a solution with an adequate concentration. The herein proposed method regards the incorporation of benzocaine in a dispersed system composed of amphiphilic molecules that can self-assemble, promoting encapsulation and a stable final formulation over time. The proposed dispersed system is composed of sunflower phosphatidylcholine and polysorbate, for the development of a physicochemically stable galenic formulation that can be administered to children for the treatment of certain oral conditions. We propose the revision of the currently used prescription and that the term "solution" (Sol) be replaced by the term "dispersed system" (DisSys), giving the opportunity to pharmacists to develop a stable galenic formulation, following the principles and laws of Physical Pharmacy and Pharmaceutical Technology.

## Introduction

Benzocaine is used short term, also as a galenic formulation, to relieve pain from minor mouth problems (such as toothache, canker sores, sore gums/throat, mouth/gum injury). It is a local an-

esthetic that works by numbing the painful area. Benzocaine is slightly soluble in water, with a reported solubility of 400 mg/L<sup>1</sup>. In the case of pharmaceutical molecules with weakly acidic or weakly alkaline properties, the degree of ionization is one of the main factors that determine their

pharmaceutical effect., as only the non-ionized form of the drug can pass through the lipophilic cell membranes. The degree of ionization depends on the pKa value of the drug molecule and the pH value of the dissolution medium. Local anesthetics are generally weakly basic compounds with a pKa value of 7.6-8.9<sup>2</sup>.

The need for the establishment of a universal guideline on the procedures and practices associated with the preparation of pharmaceutical products inside pharmacy laboratories, was first recognized in 2011, through the “Resolution CM/ResAP(2011)1 on Quality and Safety Assurance Requirements for Medicinal Products Prepared in Pharmacies for the Special Needs of Patients”, which was later updated in 2016<sup>3</sup> Generally, different countries of the European Union have very different regimes for pharmaceutical preparations. In Greece, the latter uniform regulation of health providers (EKPY) of the National Organization for the Provision of Health Services (EOPYY) that came into force in 2018, mentions the term “galenic formulation” to describe pharmaceutical formulations that are prepared inside the pharmacy and are compensated by the EOPYY according to ministerial decision, following a proposal by the board of directors of the organization<sup>4,5</sup>.

Pharmaceutical preparations based on biomaterials with self-assembled properties such as amphiphilic molecules (e.g. sunflower phosphatidylcholine, PC) are currently used to formulate low solubility drugs and biological molecules. The basic concept is the self-closed structures that the amphiphilic molecules (i.e. sunflower PC) produce to increase the van der Waals hydrophobic forces, promoting high encapsulation efficiency of lipophilic drugs (e.g. benzocaine or topical anesthetic drugs) or biological compounds. The final formulation should be stable in certain conditions (e.g. room temperature) and should be checked and evaluated using conventional methods, such as measurement of optical properties, pH, dynamic and electrophoretic light scattering (DLS and ELS), thermal analysis techniques etc. The main reason for proposing a new galenic formulation for ben-

zocaine (see below Formulation II) is the poor dissolution properties of the lipophilic compound in aqueous media. Such preparations and the evaluation process took place in university laboratories or in laboratories that are established to evaluate dispersed systems, offering all the needed data for in depth evaluation, regarding the physical, chemical and thermodynamic stability of the final formulation<sup>6-8</sup>.

In our laboratory in the Department of Pharmacy of the National and Kapodistrian University of Athens we decided to evaluate the stability of a galenic preparation of benzocaine (see below Formulation II), compared to the established prescribed recipe in Greece prepared by pharmacists (Formulation I). It was obvious from our experiments and based on the experience of pharmacists that the current galenic prescription should be revised and improved, from the currently prescribed solution to a dispersed system of the lipophilic compound. This improvement offers a new galenic formulation recipe to be used for a huge number of lipophilic compounds, such as topical anesthetic drugs.

## Materials and Methods

In this section we describe the protocols for the preparation of two benzocaine galenic formulations. These have been assigned the names Benzocaine Formulation I, which corresponds to benzocaine as a solution (proposed acronym BFSol), and second Benzocaine Formulation II, which corresponds to benzocaine as dispersed system (proposed acronym BFDiSys).

For comparison reasons, a benzocaine formulation (Benzocaine Formula I as prescribed solution) was developed and evaluated, as a reference formulation based on a galenic recipe that is established in Greece and prescribed by the doctors for preparing benzocaine oral formulations.

### Benzocaine Formulation I (BFSol)

Equipment and Materials

- Analytical balance



**Figure 1.** Photo of the developed benzocaine dispersed system (BFDisSys).

- Mortar and pestle
- Volumetric cylinder
- Powder Penicillin 50,000 IU
- Benzocaine (ethyl 4-aminobenzoate) (micronized) (Mw = 165.19) (Chemco by Syndesmos S.A., Athens, Greece)
  - Glycerin
  - Distilled water.

The protocol to prepare the benzocaine formulation currently prescribed demands:

1. In a vial that contains powder penicillin 50,000 IU, 3.8 mL distilled water are added, and a solution of penicillin 50,000 IU is prepared.
2. 1 g of benzocaine is mixed with a part of glycerin to be dissolved and homogenized.
3. From the solution of penicillin, a 0.19 mL is received.
4. Distilled water is added in an empty vial to a final volume of 50 mL.
5. The benzocaine dissolved and homogenized in 50 mL glycerin with the 0.19 ml penicillin 50,000 IU are added to 50 mL distilled water in a vial of 100 mL.

### **Benzocaine Formulation II (BFDisSys)**

The present method concerns the dispersion

of molecules with topical anesthetic action in an aqueous medium containing self-assembled amphiphilic molecules such as Phosphatidylcholine from sunflower and Polysorbate (Tween® 80) for preparing stable and effective formulations.

#### Equipment and Materials

- Analytical balance
- Mortar and pestle
- Volumetric cylinder
- Benzocaine (ethyl 4-aminobenzoate) (micronized) (Mw = 165.19) (Chemco by Syndesmos S.A., Athens, Greece)
  - Phosphatidylcholine from sunflower (Lipoid H 100) (Lipoid AG, Steinhausen, Switzerland)
  - Polysorbate 80 (Tween® 80) (Mw = 1,310) (Chemco by Syndesmos S.A., Athens, Greece)
  - Distilled water.

The protocol to prepare the benzocaine formulation that is proposed as dispersed system includes the following steps:

1. The below quantities are weighted:
  - a. Benzocaine 1 g
  - b. Sunflower phosphatidylcholine 5.4 g
  - c. Polysorbate 80 (Tween® 80), 600 mg
2. The ingredients are added inside the mortar.
3. Mixing is carried out by using the pestle, until a homogeneous mixture is obtained.

**Table 1.** Physicochemical properties of the developed **BFSol** and **BFDisSys** formulations (day 0).

Formulation	Medium	$D_h^1$ ( $\mu\text{m}$ )	PDI <sup>2</sup>	$\zeta$ -pot <sup>3</sup> (mV)
BFSol	Distilled H <sub>2</sub> O	1.289 $\pm$ 0.559	1.000 $\pm$ 0.000	-
BFDisSys	Distilled H <sub>2</sub> O	0.567 $\pm$ 0.025	0.375 $\pm$ 0.051	-32.2 $\pm$ 0.8

<sup>1</sup> Hydrodynamic diameter; <sup>2</sup> Polydispersity index; <sup>3</sup> Zeta potential; *BFDisSys*: benzocaine formulation dispersed system; *BFSol*: benzocaine formulation solution.

4. Distilled water is added to the mixture by geometric dilution, up to 100 mL, while mixing by using the pestle is carried out, to disperse the solid mixture effectively.

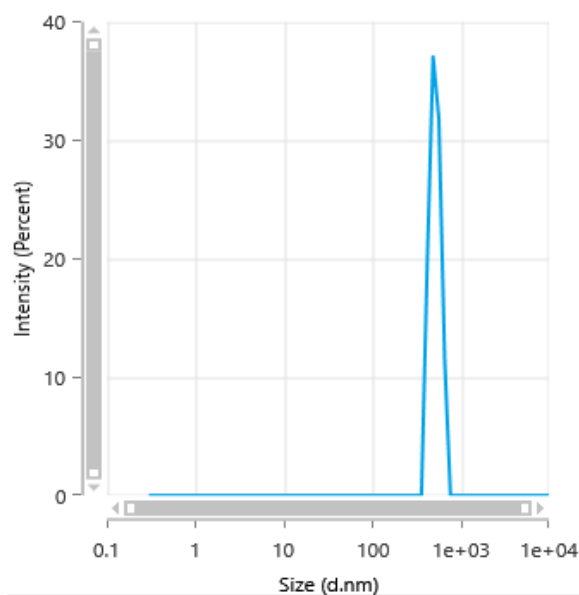
5. A homogeneous milky yellowish dispersed system is formed, which contains the drug, dispersed into lipidic/sunflower phosphatidylcholine particles.

6. The dispersed system is transferred to the appropriate container, for future oral application.

### Physicochemical Properties and Stability

The physicochemical characteristics of BFSol and BFDisSys were evaluated after preparation (day 0), by measuring their size (hydrodynamic diameter,  $D_h$ ), size distribution (polydispersity index, PDI) and zeta potential ( $\zeta$ -pot), through dynamic and electrophoretic light scattering (DLS and ELS). To this end, 50  $\mu\text{L}$  samples were diluted 60-fold in HPLC-grade H<sub>2</sub>O and then measured with a Zetasizer 3000 HSA or a Zetasizer Lab (Red) (Malvern Panalytical, Malvern, UK), at a detection angle of 90° and at 25 °C, by measuring the intensity of the scattered light. The results were analyzed by the CONTIN method. The same approach was applied to study the physicochemical properties of the systems over time (days 7 and 14) in order to evaluate their stability. Moreover, electron microscopy has been used to check the morphological characteristics of the particles encapsulated benzocaine (data not shown).

### Results and Discussion



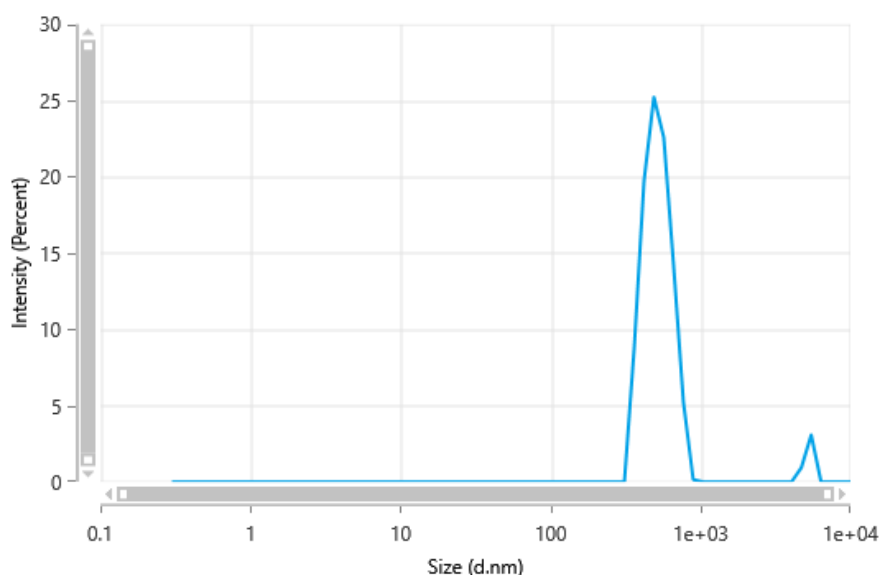
**Figure 2.** Size distribution of the benzocaine dispersed system (*BFDisSys*), weighed by intensity (day 0).

The present study concerns a simple and quick method to prepare a stable benzocaine dispersion system (*BFDisSys*) by using two ingredients that are available in the market, specifically, sunflower PC and Polysorbate (Tween® 80) (Figure 1). The physicochemical properties of the developed formula are presented in Table 1, while the particle size distribution is depicted in Figure 2. From the results, the method leads to small particles of size below 1000 nm, which presumably incorpo-

**Table 2.** Physicochemical properties of the developed **BFSol** and **BFDisSys** formulations over time.

Formulation	Medium	Day	$D_h^1$ ( $\mu\text{m}$ )	PDI <sup>2</sup>
BFSol	Distilled H <sub>2</sub> O	7	Collapsed	-
BFSol	Distilled H <sub>2</sub> O	14	Collapsed	-
BFDisSys	Distilled H <sub>2</sub> O	7	0.647 $\pm$ 0.035	0.303 $\pm$ 0.051
BFDisSys	Distilled H <sub>2</sub> O	14	0.656 $\pm$ 0.025	0.315 $\pm$ 0.036

<sup>1</sup> Hydrodynamic diameter; <sup>2</sup> Polydispersity index; *BFDisSys*: benzocaine formulation dispersed system; *BFSol*: benzocaine formulation solution.



**Figure 3.** Size distribution of the benzocaine dispersed system (*BFDisSys*), weighed by intensity (day 14).

rate benzocaine. More specifically, their size was around 0.566  $\mu\text{m}$ , with a polydispersity (PDI) 0.634  $\pm$  0.322 (Table 1). The zeta potential ( $\zeta$ -pot), which is the charge of the particles (i.e. slipping plane charge), was -32.2 mV, which suggests that these particles are significantly negatively charged, promoting the physical stability of the

final formulation over time (Table 2).

On the other hand, the reference formula (BFSol) which is currently prescribed, was characterized by very high hydrodynamic diameter and maximum polydispersity, which suggests the existence of a very heterogeneous population of large particles that promotes aggregation and phase separa-



tion (Table 1). This ultimately led to the instability of the final formulation (Table 2). Our strong belief is that the prescription of the formulation of benzocaine and topical anesthetic drugs, in general, as galenic solution formulations should be replaced by a more appropriate and scientifically correct prescription, based on pharmaceutical technology and physical pharmacy principles and laws. This, ultimately, gives to the pharmacists the advantage for producing stable galenic formulations, as dispersed systems, as the international bibliography promotes and supports.

The herein developed galenic formulation BF-DisSys was expected to exhibit good colloidal stability, based on the measured zeta potential of the nanoparticles and according to the Derjaguin, Landau, Vervey, and Overbeek (DLVO) theory (9). The theory suggests that particles with surface charge of absolute value higher than  $\pm 30$  mV should repulse each other electrostatically, thus providing a mechanism for avoiding aggregation and destabilization phenomena. As a result, the hydrodynamic diameter and polydispersity of BF-DisSys particles did not present significant changes after 7 and 14 days, as opposed to the BFSol system, which collapsed and could not be measured (Table 2, Figure 3).

## Conclusion

In the present research we aimed to develop and evaluate in terms of stability characteristics, a galenic formulation composed of benzocaine, by using simple and low-cost excipients. We have recognized from a stability point of view that the current prescription of benzocaine as a galenic formulation administered to children for the alleviation of mouth pain, does not follow the pharmaceutical technology and physical pharmacy

laws and principles, such as the DLVO theory (9). The physical and thermodynamic stability of the final formulation should be considered as crucial for the effectiveness of the final formulation, depending on the origin and nature of biomaterials (i.e. excipients and drug molecule) that have been selected to be used. Moreover, the environmental conditions (i.e. temperature, humidity) as well as the duration of storage, should be implemented with the scientific principles to ensure the stability of the product over time and its final effectiveness. Overcoming or not considering such scientific approaches, it is obvious that the stability and effectiveness of the final formulation could decline over time.

We proposed a new galenic formulation (BFDis-Sys), promoting the replacement of the already existing prescription, by taking into consideration the physical laws of stability in aqueous preparation, promoting the dispersed systems' process that allows to produce stable final products. In the case of benzocaine and of topical anesthetic drugs, the preparation of dispersed systems can provide stable formulations. Concluding, we suggest the revision of the current prescription, replacing the solution concept with the concept of dispersed system that offers advantages regarding the final stability of the formulation and provide pharmacists with a stable and effective galenic formulation. □

## Acknowledgements

The authors would like to thank Prof. Vassilios Roussis and Dr. Stefanos Kikionis for helping us to evaluate the morphology of the particles of the dispersed system incorporating benzocaine by using Scanning Electron Microscopy, SEM). We would also like to thank I. Katsogiannis, Pharmacist, MSc for assisting us in the part of regulatory issues of galenic formulations.

# Παρασκευή και αξιολόγηση κολλοειδών συστημάτων διασποράς τοπικής χρήσης αναισθητικών φαρμάκων. Το παράδειγμα ενός γαληνικού σκευάσματος βενζοκαΐνης

Κωσταντίνος Δεμέτζος<sup>1,\*</sup>, Νικόλαος Ναζίρης<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου, Αθήνα 15771, Ελλάδα

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

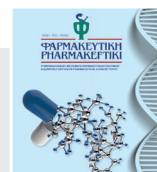
Τα τοπικά αναισθητικά είναι φαρμακομόρια που χρησιμοποιούνται ευρέως σε ιατρικές εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένης της θεραπείας επώδυνων καταστάσεων, της πρόληψης του πόνου κατά τη διάρκεια μιας επέμβασης και της ανακούφισης του πόνου μετά από επέμβαση. Η βενζοκαΐνη (4-αμινοβενζοϊκός αιθυλεστέρας) είναι ένα αδιάλυτο στο νερό τοπικό αναισθητικό που χρησιμοποιείται για την προσωρινή ανακούφιση του πόνου που προκαλείται από μικρό ερεθισμό, πόνο ή τραυματισμό του στόματος και του λαιμού. Είναι το δραστικό συστατικό σε ορισμένα μη συνταγογραφούμενα φάρμακα (ΜΗΣΥΦΑ), συμπεριλαμβανομένων αλοιφών, εκνεφωμάτων, πηκτωμάτων και διαλυμάτων. Ωστόσο, η χαμηλή διαλυτότητα της βενζοκαΐνης στο νερό καθιστά αδύνατη την ανάπτυξη διαλύματος και οδηγεί σε μη σταθερές φαρμακοτεχνολογικές και γαληνικές μορφές. Το προτεινόμενο πρωτόκολλο για την παρασκευή και αξιολόγηση τοπικών αναισθητικών και μη υδατοδιαλυτών φαρμάκων, αφορά στην ενσωμάτωση της βενζοκαΐνης σε εναιώρημα αμφίφιλων λιπιδίων, που αποτελείται από λεκιθίνη και πολυσορβικό, ως έκδοχα τα οποία έχουν την ικανότητα αυτό-οργάνωσης και σχηματισμού εσωτερικής λιπόφιλης μορφολογίας για την αποτελεσματική ενσωμάτωση και διαλυτοποίηση της βενζοκαΐνης, των τοπικών αναισθητικών και γενικότερα των λιπόφιλων φαρμάκων. Προτείνουμε την αναθεώρηση της συνταγογράφησης με βάση τους νόμους και τις αρχές της φαρμακευτικής τεχνολογίας και της φυσικής φαρμακευτικής, και προωθούμε την συνταγογράφηση της βενζοκαΐνης ως σύστημα διασποράς (dispersed system, DisSys), και όχι ως διάλυμα (solution, Sol). Τα αποτελέσματα της έρευνας μας έδειξαν την δυνατότητα παραγωγής και ανάπτυξης συστήματος διασποράς βενζοκαΐνης με σταθερότητα στον χρόνο χωρίς την δημιουργία συσσωματωμάτων και διαχωρισμό φάσεων, μη αποδεκτών ως μορφοποιήσεων με βάση τις αρχές της Φαρμακευτικής Τεχνολογίας και της Φυσικής Φαρμακευτικής.

\* CORRESPONDING  
AUTHORS:

\*Κωσταντίνος Δεμέτζος,  
demetzos@pharm.uoa.gr

## References

1. Khair-ul-Bariyah S., Arshad M., Ali M., Din M.I., Sharif A., Ahmed E. Benzocaine: Review on a Drug with Unfold Potential. *Mini-Rev Med Chem.* 20, 3, 2020.
2. Becker D.E., Reed K.L. Essentials of local anesthetic pharmacology. *Anesth Prog.* 53, 98, 2006.
3. Council of Europe (2016) Resolution CM/ResAP(2016)1 on quality and safety assurance requirements for medicinal products prepared in pharmacies for the special needs of patients [Online]. Available: [https://www.edqm.eu/sites/default/files/resolution\\_cm\\_res\\_2016\\_1\\_quality\\_and\\_safety\\_assurance\\_requirements\\_for\\_medicinal\\_products\\_prepared\\_in\\_pharmacies.pdf](https://www.edqm.eu/sites/default/files/resolution_cm_res_2016_1_quality_and_safety_assurance_requirements_for_medicinal_products_prepared_in_pharmacies.pdf) Accessed: 20 May 2017.
4. ΕΚΠΥ ΕΟΠΥΥ ΕΑΛΕΓ.Π.801572018 - ΦΕΚ 4898\_τΒ\_1 11 2018.
5. Katsogiannis I. MSc thesis entitled "Recording and Evaluation of Galenic Formulation Preparation Practices in Greek Pharmacies". 2019. (In Greek)
6. Mazayen Z.M., Ghoneim A.M., Elbatanony R.S., Basalious E.B., Bendas E.R. Pharmaceutical nanotechnology: from the bench to the market. *Futur. J. Pharm. Sci.* 8, 12, 2022.
7. Demetzos C. (2022) *Modern Pharmaceutical Nanotechnology. Fundamentals and Practical Applications*, Published by Parisianou S.A. (In Greek)
8. Demetzos C. (2016) *Pharmaceutical Nanotechnology. Fundamentals and Practical Application*, Published by Springer.
9. Missana T., Adell A. On the Applicability of DLVO Theory to the Prediction of Clay Colloids Stability. *J. Colloid Interface Sci.* 230, 150, 2000.



# Molecular docking, Molecular dynamics, and ADMET investigation of selected phytochemicals as promising inhibitors of SARS-CoV-19 targets

Veerachamy Alagarsamy\*, Viswas Raja Solomon, Bandi Narendhar, Mohaideen Thasthagir Sulthana, P Shyam Sundar, Alagarsamy Dharshini Aishwarya

Medicinal Chemistry Research Laboratory, MNR College of Pharmacy, Sangareddy - 502 294, Gr.Hyderabad, India.

## KEYWORDS:

**SARS-CoV-2; Molecular docking; MD simulation; Medicinal plants; ADMET**

## ARTICLE INFO:

*Received: August 27, 2022*

*Revised: November 27, 2022*

*Accepted: November 30, 2022*

*Published on line: March 23, 2023*

## \* CORRESPONDING

### AUTHORS:

Alagarsamy Veerachamy

E-mail address:

profvalagarsamy@gmail.com

Tel.: +91 8455-230690; fax:

+91 8455-230555

## ABSTRACT

There are a few small organic molecules against SARS-CoV-2 that has been discovered since the epidemic commenced in November 2019. The conventional medication discovery approach demands more than a decade of the year of laborious research and development and substantial financial commitment, which is not achievable in the face of the current epidemic. This study aims to discover and recognize the most effective and promising molecules against SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and spike protein targets through molecular docking screening of 120 phytochemicals from six different Ayurveda medicinal plants. The binding affinities were studied using a structure-based drug design of molecular docking, divulging 10 molecules possessing greater affinity towards the target than the reference drug molnupiravir. Molecular docking analysis identified 10 phytochemicals, castalagin, wedelolactone, arjungenin, betulin, galbacin, shiapterocarpin, liquiritin, cordioside, licopyranocoumarin, and daucosterol from different kinds of ayurvedic medicinal plants phytochemicals possessing greater affinity against SARS-CoV-2-RdRp and spike protein targets. Two molecules, namely castalagin and wedelolactone, with low binding energies, were the most promising. Furthermore, we carried out MD simulations for the castalagin-protein complexes based on the docking score. Molecular ADMET profile estimation showed that the docked phytochemicals were safe. The present study suggested that active phytochemicals from medicinal plants could inhibit RdRp and spike the protein of SARS-CoV-2.

## 1. Introduction

The COVID-19 triggered by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) virus has caused tough challenges worldwide; because of the immediate human-to-human spreadable nature of SARS-CoV-2, the disease adversely affected 636.44 million people, with 6.61 million fatalities in 223 countries and territories around the world (report as of 25<sup>th</sup> November 2022; <https://covid19.who.int/>). The disease rigorously struck the economic/ monetary progression worldwide and shoved millions of people toward redundancy. The SARS-CoV-2 was initially identified at the end of December 2019 in Wuhan City, characterized by an atypical pneumonia outbreak. The World Health Organization (WHO) declared COVID-19 a global public health emergency of international concern, and in March 2020, it was declared a pandemic. Under this emergency, scientists worldwide have been working to develop novel vaccines and drug molecules to prevent and treat COVID-19 disease<sup>1</sup>. Few vaccines have been launched in mid-2020 to battle COVID-19. Regrettably, no therapeutic medication has yet been approved by the FDA to treat this disease in recent months.

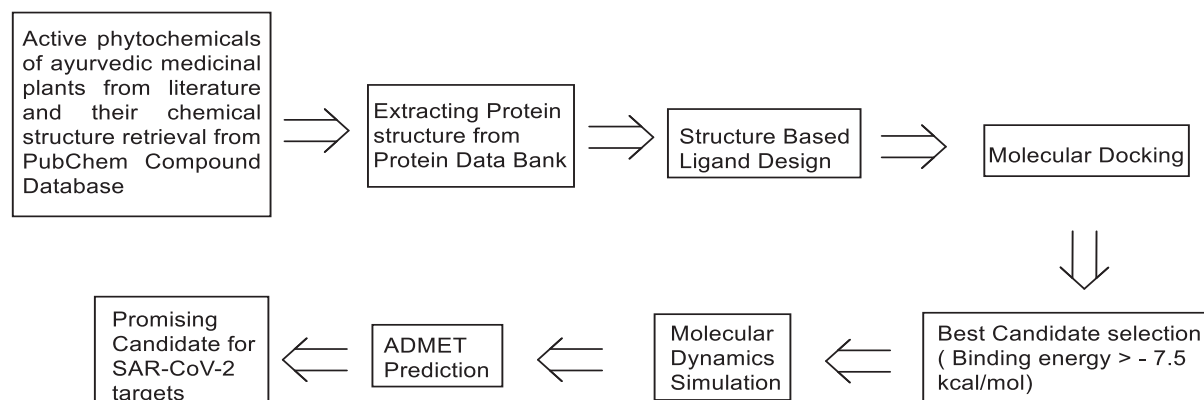
The structural proteins of the SARS-CoV-2 genome comprise four proteins Spike (S), envelope (E), membrane (M), and nucleocapsid (N). It also contains a nonstructural protein segment of 3-chymotrypsin-like protease (3CL<sup>pro</sup>), Main protease (M<sup>pro</sup>), papain-like protease (PL<sup>pro</sup>), helicase, and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). Protein sequence studies confirmed that the catalytic sites of the four SARS-CoV-2 enzymes, which could provide antiviral targets, are incredibly maintained and offer around 80% genomic similarity with SARS-CoV. This feature provides to comprehend and hinder the SARS-CoV-2 replication cycle. 3CL<sup>pro</sup> and PL<sup>pro</sup> play a vital role in the viral replication process via the formation of 16 nonstructural proteins. (Anand, K, et al., 2003). Impeding the above replication cycle of SARS-CoV-2 would become a potential molecular target for developing therapeutics against coronavirus.

Massive vaccination clinics better managed the

SARS-CoV-2 variant of delta and Omicron for people, including adults and kids, who seem to be susceptible to infection. However, mass vaccination weakened the cruelty of the pandemic in the last year<sup>1</sup>, and the desire for effective and easily accessible treatments for the same is still looming. The comprehensive and urgent obliteration and creation of a covid-19 free world by a worldwide vaccination effort may take only a few years in economically weakened countries. Concurrently, the efficiency and proficiency of routine vaccination are intensely influenced by novel variants of SARS-CoV-2. In the meantime, individuals suffering from various health complications or comorbidities are not entirely protected by the nullifying capacity of spike antibodies because of vaccination<sup>2</sup>.

Repurposing drugs is another way to cure COVID-19 disease. Some antiviral antibiotics and other FDA-approved drugs are reprocessed for this treatment<sup>3,4</sup>. Several novel mechanisms have proven the efficacy and potency of phytochemical constituents obtained from various herbal medicines and nutraceuticals to treat multiple viral diseases. Phytochemical-based antivirals with negligible toxic potential are excellent alternatives for treating coronavirus mutants<sup>5</sup>. Most of these phytochemical-based antivirals act as antioxidants during COVID-19 to break interleukin gale and ROS damage. In recent days, insilico studies are the heart/quick tool of drug discovery used to screen many naturally occurring available molecular libraries. Recently, several researchers have focused on identifying potential biomolecules active against SARS-CoV-2 from natural sources by the implication of an unusual drug designing approach<sup>6-9</sup>. The principal aim of this study involves screening more than a hundred natural ligands like flavonoids, steroids, and saponins against two target proteins of SARS-COV-2 and discovering the more potent biologically active molecules by using the insilico approach (Fig. 1).

Many medicinal plants are used for the therapeutic potentiality to treat various diseased states of respiratory organs, notable ones but not limited to are *Acacia nilotica* (gum arabic tree),<sup>10</sup> *Acorus tatarinowii*, *Glycyrrhiza glabra* (Liquorice)<sup>11,12</sup>, *Quercus*



**Figure 1.** Using structure-based ligand design to identify potential inhibitors against SARS-CoV-2 RdRp and spike protein targets.

*coccifera* (Kermes oak)<sup>13,14</sup>, *Terminalia chebula* (Myrobalans)<sup>15,16</sup>, and *Wedelia chinensis* (Pilabhamgara)<sup>17,18</sup> used in the present study (Fig. 2 and Table 1). They are all immunomodulators and reinforce the body to counteract various infections. These plant species contain polyphenolic compounds such as phenolic acids, flavonoids, stilbenes, and lignans (Fig. 2 and Table 1). Most polyphenolic compounds gain a high antioxidant function, and their therapeutic properties, such as vasodilatory, antibacterial, antiviral, anticarcinogenic, and anti-inflammatory, have been reported. The literature has evident that polyphenols possess antiviral activity and act on the DNA or RNA virus target by interacting directly with viral particles. However, these interactions depend on the virus. A further characteristic of the antiviral activity of polyphenols is that they can inhibit intracellular replication, which may be recognized as antioxidant features of phenolic groups, thus inhibiting the oxidation of cells by the replication of the viruses. Natural polyphenols have broad accessibility, low-cost manufacture, and, above all, their few side effects. They are becoming an important target in developing some drugs to combat viruses. Therefore, developing more targeted inhibitors from natural sources could be an efficient therapeutic strategy to combat COVID-19. In this study, we have screened 120 natural polyphenolic compounds from the above six medicinal plants against two different

proteins, i.e., RdRNA polymerase (RdRp) and spike glycoprotein of SARS-CoV-2, with the aim to identify potent bioactive compounds using molecular docking, molecular dynamics and ADMET. In addition, these plant constituents were not studied for RdRNA polymerase (RdRp) and spike glycoprotein of SARS-CoV-2.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Protein preparations

The 3D crystal structure of COVID-19 SARS-CoV-2 RdRp (7BV2)<sup>19</sup> and spike protein (PDB: 6LZG)<sup>20</sup> with high crystal resolution was retrieved from Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) Protein Data Bank website (<https://www.rcsb.org/>), and its original ligand and water were eliminated. The protein contains 306 amino acids. The protein was prepared using the protein preparation wizard Schrodinger 2020-3. The crystallographic inhibitor, ions (K<sup>+</sup> and Mg<sup>+</sup>), and the unwanted water molecules were deleted and assigned bond orders, polar hydrogens were added, created disulphide bonds, and converted selenomethionine to methionine using Protein preparation wizard Schrodinger 2021-3. Checked and repaired missing atoms in the protein crystal structure, edited histidine hydrogens, assigned Raadii, added Kolman charge

**Table 1. List of Ayurvedic medicinal plants used in this study and their phytoconstituents**

S.No	Plant Name	Reported activities	Phytoconstituents considered for docking study
1.	<i>Acacia nilotica</i> (gum arabic tree)	Anticancer, anti-tumours, antiscorbutic, astringent, anti-oxidant, natriuretic, antispasmodic, diuretic, intestinal pains and diarrhea, nerve stimulant, cold, congestion, coughs, dysenter, fever, hemorrhages, leucorrhea, ophthalmia, and sclerosis.	Heptacosane 1, 2, 3-triol, <i>m</i> -digallic acid, Protocatechuic acid, Ellagic acid, Leucocyanidin, <i>m</i> -Digallic dimer 3,4,5,7-tetrahydroxy flavan-3-ol, Oligomer 3,4,7-trihydroxy flavan 3,4-diol,3,4,5,7-Tetrahydroxy flavan-3-ol, (-)-Epicatechol, Cystine, Methionine, Threonine, Lysine, Tryptophan, Apigenin, 6-8-bis-D-glucoside, Rutin, Phlobetannin, Protocatechuic acid, Pyrocatechol, (+)-Catechin, (-)-Epigallocatechin-5,7-digallate, Octacosanol, Betulin, $\beta$ -Amyrin, $\beta$ -Sitosterol.
2	<i>Acorus tatarinowii</i> (Calamus or Sweet flag)	Anticancer, anti-tumours, anti-oxidant, anti-fatigue, intestinal pains, improving cognitive function, memory of Alzheimer's disease, Anti-neuroinflammatory, anticonvulsant and sedative	Asarone, Calamenone, Emodin, Galbacin, Calamusenone,2-Acetyloxyacoronene, Acorenone, 1,2-Dimethoxy-4-(1'-Z-propenyl) benzene, Galgravin, Eudesmin, Physcion, Chrysophanol, 1-Hydroxy-7(11), 9-Guaiadien-8-one.
3.	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (Liquorice)	Antibacterial, anti-inflammatory, antiviral, antioxidant, and antidiabetic activities.	Glycyrrhizin, Licquiritigenin, Isoliquiritigenin, Licquiritin, Licquiritinapioside, Glucoliquiritin, Shinflavanone, Shimpitrocarpin, Prenyllicoflavone A, 1-Methoxyphaseolin, Pinoembrin, Geraniol, $\alpha$ -Terpineol, Licopyranocoumarin, Licochalcone B, Licochalcone A, Glisoflavone, Licoarylcoumarin.
4.	<i>Quercus coccifera</i> (Kermes oak)	Antioxidant, antibacterial, Antifungal, antiviral, antiprotozoal, anticarcinogenic, radioprotective, antimutagenic, chemopreventive, hepatoprotective, cardioprotective, cytoprotective, antidiabetic.	Kaempferol, Vanillin, Quercetin, Epicatechin, Castalagin, Eupatorin, Cirsimaritin, Quercussioside, Procyanidin B3, Procyanidin B4, Quercuschin, Polydatin, Naringenin.
5.	<i>Terminalia chebula</i> (Myrobalans)	Antiinflammatory, antiarthritic, adaptogenic, antianaphylactic, hypolipidemic, hypocholesterolemic, gastrointestinal motility, antiulcer, antispasmodic, anticonvulsant, wound healing, purgative, antiallergic, immunomodulatory	Terchebulin, Terflavin A, Terflavins B, Terflavin C, Terflavin D, Terchebin, Punicalin, Neo-chebulic acid, Cordioside, Casuarinin, Corilagin, Chebulanin, Chebulinic acid, Methyl(S)-flavogallate, Eugenol, Ascorbic acid, Tannic acid, Vanillic acid, Ferulic acid, Pyragallool, Phloroglucinol, Arjunenin, Arjunic acid, Arjunglucoside, Arjunetin, Terminolic acid, 2 $\alpha$ -Hydroxymicroimic acid, Bellericoside, $\beta$ -Caryophyllene, $\alpha$ -Phellandrene, $\alpha$ -Terpinene, Terpinolene, Rutin, Quercetin, Isoquercetin, 3-Methoxy quercetin, Chebupentol, Daucosterol, $\beta$ -Sitosterol, Pelargonidin, Luteolin.
6.	<i>Wedelia chinensis</i> (Pilabhamgara)	Anti-hepatotoxic agent, dermatological disorders, cough, headache, hair loss, dying of hair, lice, nervous weakness, anemia, digestive disorders, osteochondritis, multiple sclerosis, juvenile arthritis	Wedelolactone, Norwedelolactone, Norwedelic acid, 2-Tridecanone, <i>N</i> -Butyl-4-methylpyridinium, Trans-3-propyl- <i>cis</i> -4-methyl- <i>cis</i> -pinane, <i>N</i> -(2-tert-Butylphenyl) pivalamide, Phenacetin, $\alpha$ -Elemene, (-)-(1 <i>R</i> )-2-Methyl cymantrencarboxaldehyde, $\alpha$ -Pinene, Spathulenol, Limonene.

(-500.974), Gasteiger charges (-21.9958) were added, and set Kollman charge field. The prepared proteins were validated through a Ramachandran plot (Fig. S1). AutoDock vina was used to create the bioactive conformations<sup>21</sup>. For AutoDock vina study for RdRp (7BV2), an extended PDB format, termed PD-BQT, is used for X, Y, and Z coordinates file grid boxes (center\_x = 91.5167, center\_y = 92.3818, center\_z = 103.7340), which includes atomic partial, charges and atom types. For spike protein (6LZG) X, Y, and Z coordinates, file grid boxes (center\_x = -31.7673, center\_y = 18.1854, center\_z = -2.8980) were applied. Torsion angles were calculated to assign the flexible and nonbonded rotation of molecules. All the chemicals in our data collection were docked in the protein's active site under investigation, and the findings were evaluated using Discovery Studio 2021.

## 2.2 Ligands selection

To find potential inhibitors of SARS-CoV-2, RdRp, and spike protein targets, we examined 120 active phytochemical from six different plant species (Table 1) such as *Acacia nilotica* (Gum arabic tree) (Table 1), *Acorus tatarinowii* (Calamus or Sweet flag) (Table 1), *Glycyrrhiza glabra* (Liquorice) (Table 1), *Quercus coccifera* (Kermes oak), *Terminalia chebula* (Myrobalans) (Table 1) and *Wedelia Chinensis* (Pilabhamgara) (Table 1) were found in the literature. The active phytochemicals (Table 1) were obtained in SDF (Structure Data File) 3D format from the PubChem database (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). SDF files were converted to PDB files with the aid of Marvin Sketch. Using AutoDock Partial charges (Kollmann and Giester) were added. Chosen torsion tree and set the torsion to 6, finally saved as PDBQT 3D format. Recent literature shows that molnupiravir is highly effective at reducing nasopharyngeal SARS-CoV-2 infectious virus and has a proven beneficial safety and tolerability profile. Furthermore, it lessened the risk of hospitalization or death in at-risk, unvaccinated adults with COVID-19. Based on this evidence, we have used it as a reference drug.

## 2.3. Molecular docking

The molecular docking investigation was carried out by a genetic algorithm using the AutoDock Vina programme<sup>21,22</sup>. We used Perl script to do virtual screening in AutoDock Vina (Command-perl vina\_windows.pl). Selected (Total 120) active phytochemicals of *Acacia nilotica*, *Acorus tatarinowii*, *Glycyrrhiza glabra*, *Quercus coccifera*, *Terminalia chebula* (Myrobalans), and *Wedelia Chinensis* (Pilabhamgara) (Tables 1 and 2) were docked with SARS-CoV-2 spike protein (PDB: 6LZG) and RdRp (PDB: 7BV2) targets. Afterward, with the help of PYMOL software<sup>23</sup>, the ligand docked-out files were converted into PDB files for 2D-3D interactive visualization studies using DS 4.0. The docked complexes' shortening was done based on binding energy (kcal/mol) and dissociation constant (pM) as per AD Vina scoring, where negative energy means stronger binding.

## 2.4. Molecular dynamics

Under physiological settings, simulation of Molecular Dynamics (MD) helps visualize Protein-Ligand Complexes' action (PLC) at the target's binding site area. MD was carried out utilizing the system's builder panel and the Desmond module of Schrödinger built by the D.E Shaw research group (Academic license, Version 2020-1). The orthorhombic simulation box was built using the explicit water model Simple Point-Charge (SPC) with a minimum distance of 10 between the protein and solvent surfaces. The orthorhombic TIP3P water model was used to solve complexes docked with receptors. Counterions were used to neutralize the solvated system, and the physiological system's salt concentration was limited to 0.15 M. The OPLS AA force field was used to denote the receptor-ligand complex system.

Two seconds of relaxation time was used for the Reversible reference system Propagator Algorithm (RESPA) integrator, Nose-Hoover chain thermostat, and Martyna-Tobias-Klein barostat. The final production of MD simulations was performed using the equilibrated system. This MD simulation was set to run for 100 ns at 310 K temperature and 1.0



**Table 2. The top ten phytochemicals showing binding affinity to SARS-CoV-2 RdRp and spike protein targets**

S. No	Compound	Binding affinity (kcal/mol)	
		RdRp (7BV2)	SPIKE (6LZG)
1.	Castalagin	-14.5	-14.1
2.	Arjungenin	-10.1	-8.6
3.	Daucosterol	-9.9	-8.5
4.	Cordioside	-9.7	-7.3
5.	Liquiritin	-9.5	-8.7
6.	Wedelolactone	-9.1	-8.8
7.	Betulin	-9.0	-7.7
8.	Galbacin	-8.9	-9.3
9.	Licopyranocoumarin	-8.8	-7.3
10.	Shinpterocarpin	-8.6	-10.2
Standard	Molnupiravir	-8.0	-7.5

bar pressure, with the NPT (Isothermal-Isobaric ensemble, constant temperature, constant pressure, constant number of particles) ensemble at default settings ensemble for relaxation before simulation. The MD simulation was run using the MD simulation tool with a simulation duration of 100 nanoseconds. The.out file was also used to produce a movie and see the trajectories. The movie was exported at a higher resolution (1280 x 1024) and with improved quality when the .cms file was loaded. During the MD simulation, 1000 frames were used to write the trajectory. To better understand the complex's stability during MD simulation, the protein backbone frames were aligned to the backbone of the starting frame. Finally, the simulated interaction diagram and results were analyzed after importing the .file and setting the Root Mean Square Deviation (RMSD) and Root Mean Square Fluctuation (RMSF) in the analysis to oblique.

## 2.5 Drug-likeness and ADMET prediction

The most potent docked molecules (Table 2) were

chosen for drug-likeness testing and ADMET profile prediction using the web-based server Lipinski rule of five (<http://www.scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp>)<sup>24,25</sup> and SWISS ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity; Table 5). It aids in predicting both physically important descriptors and pharmaceutically relevant characteristics. Estimated aqueous solubility (Log S), percent human oral absorption, octanol/water (O/W) segment coefficient, blood/brain partition coefficient, and all-out Solvent Accessible Surface Area (SASA) were among the metrics assessed. The SwissADME is a web-based server, generously accessible at <http://www.swissadme.ch>, and intended for user-friendly submission and easy analysis of the results.<sup>26</sup>

ProTox-II offers a freely accessible web server for insilico toxicity estimates for pharmacologists, regulatory bodies, bench chemists, and all users without login at [http://tox.charite.de/protox\\_II](http://tox.charite.de/protox_II). The web server uses a 2D structure as input and reports the possible toxicity profile of the chemical for several models with confidence rankings, and an overall tox-

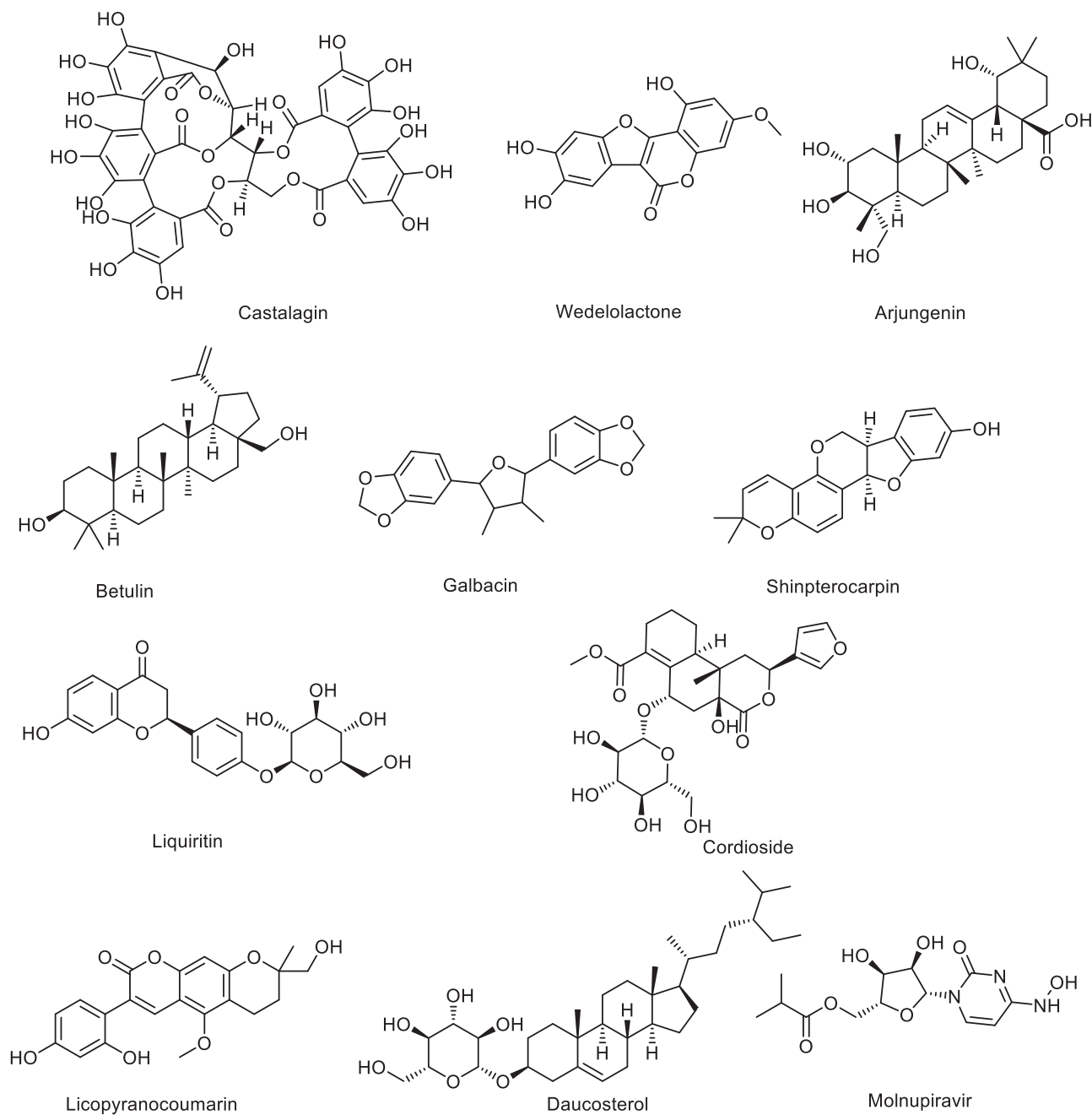


Figure 2. The phytoconstituents were used for molecular docking with SARS-CoV-2 targets.

**Table 3. Molecular Docking analysis and the type of molecular interaction of selected phytochemical and molnupiravir to RdRp.**

S. No	Name	Distance	Type	From	From Chemistry	To	To Chemistry
1	Castalagin	2.43	H-bond	Arg-553:HH11	H-Donor	O34	H-Acceptor
		1.64	H-bond	Arg-555:HE	H-Donor	O49	H-Acceptor
		2.90	H-bond	Arg-555:HH21	Negative	0	Pi-Orbitals
		2.01	H-bond	Ser-814:HG	H-Donor	O30	H-Acceptor
		2.78	H-bond	O19	H-Donor	His-439:NE2	H-Acceptor
		3.26	H-bond	O65	H-Donor	Glu-811:OE2	H-Acceptor
		2.92	H-bond	O63	H-Donor	Asp-618:OD2	H-Acceptor
		3.019	Carbon Hydrogen Bond	His-439:HE1	H-Donor	O19	H-Acceptor
		2.65	Carbon Hydrogen Bond	Ser-549:HB1	H-Donor	O55	H-Acceptor
		2.61	Carbon Hydrogen Bond	Ser-814:HA	H-Donor	O31	H-Acceptor
		3.43	Pi-Anion	Asp-618:OD2	Negative	0	Pi-Orbitals
		4.76	Pi-Anion	Glu-811:OE2	Negative	0	Pi-Orbitals
		2.90	Pi-Sigma	Arg-555:HD1	C-H	0	Pi-Orbitals
		4.78	Pi-Alkyl		Pi-Orbitals	Arg-555	Alkyl
		2	Arjungenin	3.07	H-bond	Asn-496:HD21	H-Donor
2.12	H-bond			P:A14:H7	H-Donor	O1	H-Acceptor
2.61	H-bond			P:A15:H7	H-Donor	O7	H-Acceptor
2.58	H-bond			P:A15:H7	H-Donor	O9	H-Acceptor
1.80	H-bond			P:G16:H7	H-Donor	O9	H-Acceptor
1.90	H-bond			T:A13:H7	H-Donor	O21	H-Acceptor
3.65	Carbon Hydrogen Bond			Pi-Orbitals	H-Donor	P:U13:OP2	H-Acceptor
3	Molnupiravir	2.12	H-bond	Asn-496:HD22	H-Donor	O7	H-Acceptor
		2.06	H-bond	P:A14:H61	H-Donor	O6	H-Acceptor
		2.57	H-bond	P:A15:H62	H-Donor	O6	H-Acceptor
		2.67	H-bond	T:A13:H7	H-Donor	O5	H-Acceptor
		2.48	H-bond	T:A13:H61	H-Donor	O5	H-Acceptor
		1.84	H-bond	T:A14:H62	H-Donor	O5	H-Acceptor
		3.02	H-bond	H41	H-Donor	T:A13:O5'	H-Acceptor
		2.27	H-bond	H41	H-Donor	T:A14:OP2	H-Acceptor
		3.05	H-bond	H42	H-Donor	A:Asn-496:OD1	H-Acceptor
		3.14	Pi-Donor H-bond	T:A14:H7	H-Donor	0	Pi-Orbitals
	4.67	Pi-Alkyl	P:U13	Pi-Orbitals	C22	Alkyl	
	4.22	Pi-Alkyl	P:U13	Pi-Orbitals	C23	Alkyl	
	4.67	Pi-Alkyl	P:A14	Pi-Orbitals	C23	Alkyl	

icity chart with the three most similar compounds with known acute toxicity.<sup>27</sup> A Random Forest (RF) algorithm model is employed to create the classification for hepatotoxicity, cytotoxicity, mutagenicity, and carcinogenicity. Toxic doses are most commonly expressed as LD<sub>50</sub> values (mg/kg body weight). The LD<sub>50</sub> is the median lethal dose, meaning that 50% of test subjects die upon exposure to a compound. The globally harmonized system (GHS) classified various chemicals based on toxicity types such as Class I: fatal if swallowed (LD<sub>50</sub> ≤ 5), Class II: fatal if swallowed (5 < LD<sub>50</sub> ≤ 50), Class III: toxic if swallowed (50 < LD<sub>50</sub> ≤ 300), Class IV: harmful if swallowed (300 < LD<sub>50</sub> ≤ 2000), Class V: may be harmful if swallowed (2000 < LD<sub>50</sub> ≤ 5000), and Class VI: non-toxic (LD<sub>50</sub> > 5000).

### 3. Results and Discussion

Natural polyphenolic compounds with medicinal properties show lesser undesirable effects than synthetic organic compounds. The phytochemicals (Table 1) for treating COVID-19 provide trustworthiness and are reported from evidence-based medicinal plants for managing the ailment of respiratory disorders. Insilico methodologies such as molecular docking and molecular dynamics simulation studies provide a vital starting point in binding energy and stability of ligands to proteins for advanced research in this field. Two SARS-CoV-2 targeting proteins, comprising spike glycoprotein, and RdRp, were docked with 120 phytochemicals from six different medicinal plants to find potential inhibitors for these targets. In the present study, we have considered some fundamental interactions, i.e., the hydrogen bonds (H-bonds) are dealt with on the first level, the interactions between pi-sigma, pi-alkyl, pi-sulfur, and pi-cation interactions are dealt with on the second level. As a result, the first level of contact was observed as the most difficult for ligand displacement in the enzyme's binding site, and the existence of H-bond interaction in the chosen complex explains the effective interaction between these molecules and their targets (Tables 2, 3, and 4).

According to binding energy values from AutoDock Vina, we demonstrated that different phyto-

chemicals found in *Acacia nilotica*, *Acorus tatarinowii*, *Glycyrrhiza glabra*, *Quercus coccifera*, *Terminalia chebula* (Myrobalans), and *Wedelia chinensis* (Pilabhamgara) (Tables 1-4, Fig. 3 and 4) exhibited significant binding affinity with SARS-CoV-2 targets. Table 2 represents the list of phytochemicals displaying considerable binding energy (> -7.5 kcal/mol) with SARS-CoV-2 targets. Based on the interaction energy criterion, all studied molecules were compared with the reference antiviral drug molnupiravir.

The third level deals with hydrophobic contacts and nonspecific van der Waals interactions between aliphatic and aromatic carbon atoms. The bulk of the ligand is covered by these interactions, which are typically spherical with a radius of four. As a result, the initial level of contact was thought to be the most important for ligand displacement in the enzyme's binding site. The presence of hydrogen bond interactions in the ligand-protein complex explains why the three chemicals and the tested protein have such a strong link (Tables 2-4).

#### 3.1 Docking Interaction with RdRp (7BV2)

From the RdRp (7BV2) molecular docking study, it has been found that out of 28 compounds from *Acacia nilotica*, one compound, namely, betulin (CID 72326) is a triterpene compound, showed the highest binding affinity as compared to molnupiravir (CID 145996610) for SARS-CoV-2 RdRp (Fig. 3, Table 2, Tables S1 and S2). Betulin showed the highest binding energy of -9.0 kcal/mol. Preliminary in vitro studies have demonstrated that betulin inhibited sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs). Inhibition of SREBP by betulin decreased the biosynthesis of cholesterol and fatty acids. In vivo, betulin ameliorated diet-induced obesity, decreased lipid contents in serum and tissues, and increased insulin sensitivity<sup>28</sup>. Among 13 active phytochemicals from *Acorus tatarinowii*, only one compound, namely, Galbacin (CID 11175182), showed higher binding interaction (-8.9 kcal/mol) to reference drug molnupiravir for SARS-CoV-2 RdRp (-8.0 kcal/mol) (Fig. 3, Table 2, Tables S1 and S2). Galbacin showed a binding energy of -8.9 kcal/mol. Galbacin

is a lignan compound that showed DNA topoisomerase I and II inhibition and no cytotoxicities against normal human colon carcinoma cell line (HT-29) and human breast carcinoma cell line (MCF-7).

Out of 18 active phytochemicals from *Glycyrrhiza glabra* (Licorice), three compounds, namely, liquiritin (CID 503737), licopyranocoumarin (CID 122851), and shinpterocarpin (CID 10336244), showed considerable binding affinity as compared with reference drug molnupiravir for SARS-CoV-2 RdRp (Fig. 3, Tables S1 and S2). Shinpterocarpin was found to have the highest binding energy of - 8.6 kcal/mol. Licopyranocoumarin and shinpterocarpin had similar binding energies - 8.8 and - 8.6 kcal/mol, respectively. Among the 18 phytoconstituents from this plant, liquiritin showed the highest binding interaction with - 9.5 kcal/mol energy (Fig. 3, Tables S1 and S2).

Among 13 active phytochemicals from *Quercus coccifera* (Kermes oak), only one compound, namely, castalagin (CID 12302513), showed higher binding affinity compared to the reference ligand molnupiravir for SARS-CoV-2 RdRp based on AutoDock Vina prediction. Castalagin has a binding energy of -14.5 kcal/mol. Different 2D-3D interactions formed by castalagin include conventional and carbon-hydrogen bonding with the residues His-439, Ser-549, Arg-553, Arg-555, Asp-618, Glu-811 and Ser-814 (Figs. 3 and S3, Tables 2 and S1-S3). In comparison, molnupiravir has a -8.0 kcal/mol binding energy. Different 2D-3D interactions formed by molnupiravir include conventional hydrogen bonding with the residues and nucleotides, Ade-P:14, Ade-P:15, Ade-T:14, Ade-T:15 and Asn-496 and pi-alkyl interaction with Urd-P:13. It also creates pi-donor hydrogen bond formation with the residues mentioned above (Fig. 3, Table 3, Tables S1 and S2, Fig. S2).

It has been found that out of 37 compounds from *Terminalia chebula* (Myrobalans), three compounds, namely, arjungenin (CID 12444386), cordioside (CID 101915817), and daucosterol (CID 742590), showed better binding affinity as compared to molnupiravir for SARS-CoV-2 RdRp based on AutoDock Vina. Arjungenin showed significant binding energy of -10.1 kcal/mol. Arjungenin is a new triterpene glucoside

that shows  $\alpha^2$ -glucuronidase inhibitory activity, antiviral, and anti-inflammatory activities. It creates ligand-protein (2D-3D) interactions, including conventional and carbon-hydrogen bonding with residues Urd-P:13, Ade-P:14, Ade-P:15, Ade-T:14, Ade-T:15 and Asn-496. (Fig. 3, Fig. S4 and Tables S1 and S2). Daucosterol was found to be another inhibitor with binding energy -9.9 kcal/mol. The least binding inhibitor from this plant species is cordioside which showed binding energy of -9.7 kcal/mol. Out of 13 active phytochemicals from *Wedelia chinensis* (Pilabhamgara), only one compound, wedelolactone (CID 5281813), showed improved binding affinity compared to the reference drug used in this study. Wedelolactone showed binding energy of -9.1 kcal/mol found in this study (Fig. 3, Tables S1 and S2).

### 3.2 Docking Interaction with spike protein (6LZG)

Based on binding interaction energy values from AutoDock studies we showed that different phytochemicals found in *Acacia nilotica*, *Acorus tatarinowii*, *Glycyrrhiza glabra*, *Quercus coccifera*, *Terminalia chebula* (Myrobalans), and *Wedelia chinensis* (Pilabhamgara) (Fig. 4, Tables S3 and S4) exhibited better binding affinity with SARS-CoV-2 structural protein of spike (6LZG). Table 2 shows the top 10 phytochemicals displaying considerable binding energy (> - 7.3 kcal/mol) with SARS-CoV-2 spike protein. By comparing all studied molecules with the reference drug, molnupiravir energy (> - 7.5 kcal/mol) is based on the interaction values. The binding interaction values indicate that both targets have a similar trend for SARS-CoV-2, RdRp protein (7BV2), and spike protein (6LZG).

The docking interaction with spike protein determines 10 phytochemicals, castalagin (-14.1 kcal/mol), shinpterocarpin (-10.2 kcal/mol), galbacin (-9.3 kcal/mol), wedelolactone (-8.8 kcal/mol), liquiritin (-8.7 kcal/mol), arjungenin (-8.6 kcal/mol), daucosterol (-8.5 kcal/mol), botulin (-7.7 kcal/mol), cordioside (-7.3 kcal/mol), licopyranocoumarin (-7.3 kcal/mol), molnupiravir (-7.5 kcal/mol)

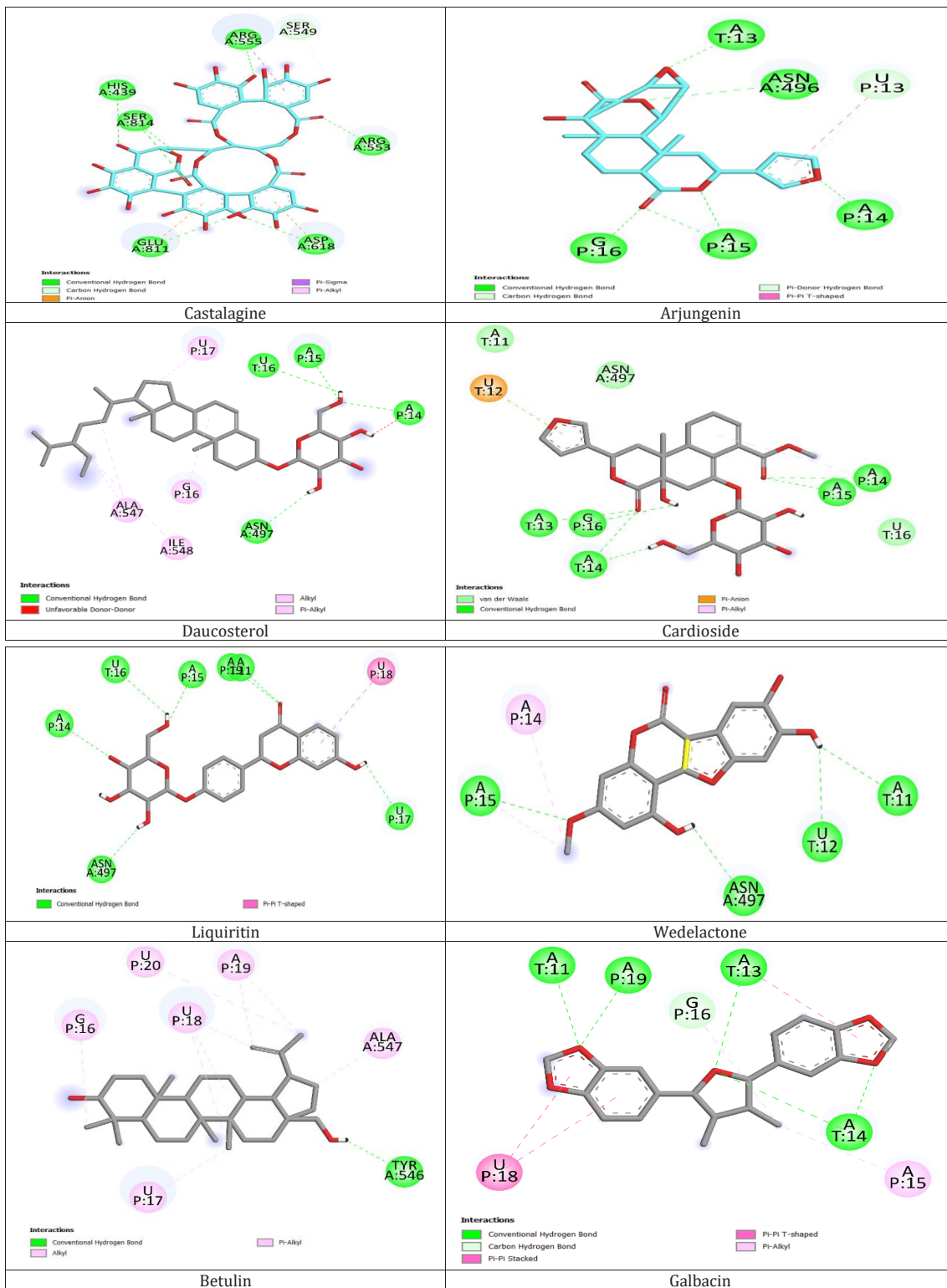
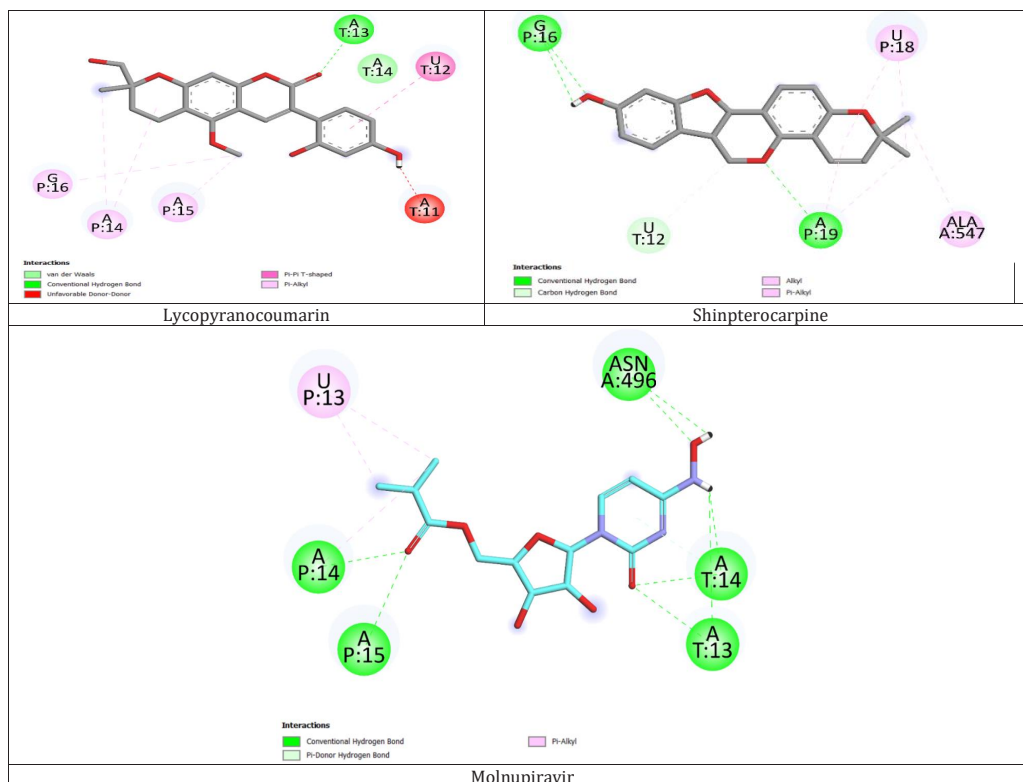


Figure 3. The 2D interaction view of phytochemicals and molnupiravir with SARS-CoV-2 RdRp protein (7BV2)

Figure 3(continued)



**Figure 3.** The 2D interaction view of phytochemicals and molnupiravir with SARS-CoV-2 RdRp protein (7BV2)

mol) from different kinds of ayurvedic medicinal plants phytochemicals possessing greater affinity against SARS-CoV-2 spike protein targets (Fig. 4, Table S3 and S4). Two molecules, namely, castalagin (-14.1 kcal/mol) and shinpterocarpin (-10.2 kcal/mol) with low binding energies, were the most promising. The 2D–3D interactions formed by castalagin include conventional hydrogen bond and pi-donor hydrogen bonding with the residues Asp-206, Asp-350, Asn-394, His-401, and Lys-562 (Fig. 4, Fig. S6, Table 4, Table S3 and S4). In comparison, molnupiravir has a -8.0 kcal/mol binding energy. Different 2D–3D interactions formed by molnupiravir include conventional hydrogen bonding with the residues Glu-166, Arg-188, Thr-190, alkyl and pi-alkyl interactions with Met-49 and Met-165. It also forms pi-sigma bond formation with His-41 (Fig. 7, Fig. S5, and Table 4). Shinpterocarpin showed the second-highest binding interaction -10.2 kcal/mol with spike protein. It generates ligand-protein (2D–

3D) interactions, including conventional hydrogen bonding with residue Ala-396, alkyl interaction with Ala-99, and pi-cation interaction with Lys-562 (Fig. 4, Fig. S7, Table 4, and Tables S3 and S4).

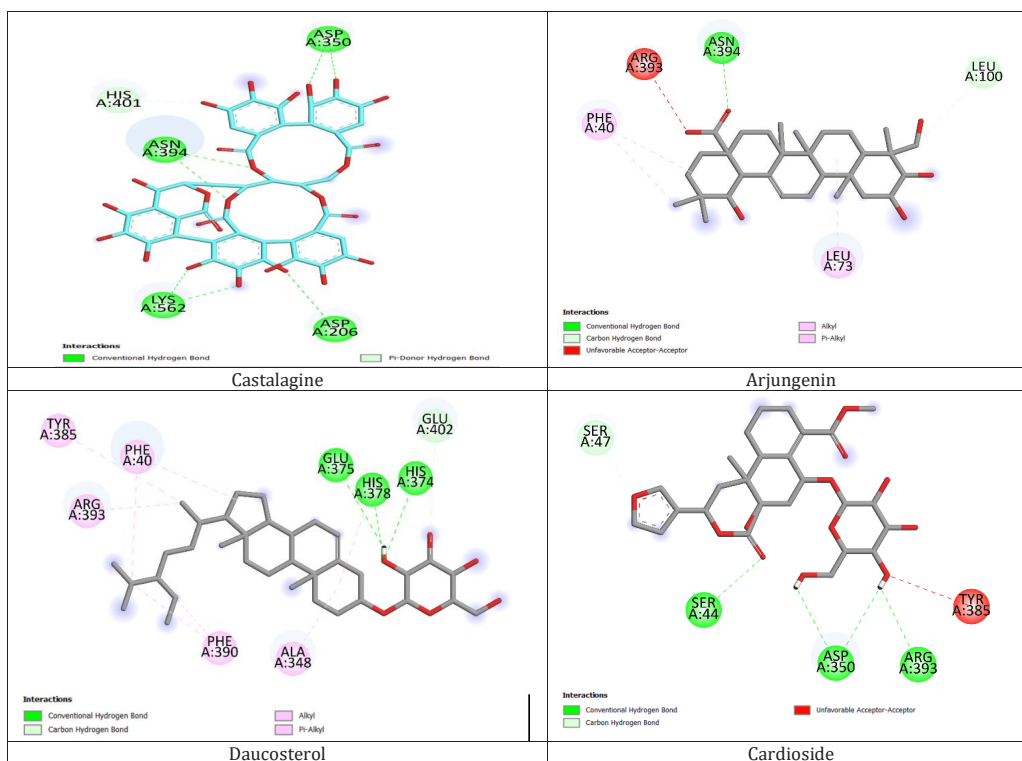
Figure 5 depicts the RMSD and secondary structure timeline analysis of the 7BV2-Castalagin complex. Based on the trajectory analysis, the protein was stable after 50 ns during simulations for 100 ns. Protein RMSF indicates that residues near 100 and 490 are fluctuating more, but these are not at the active site, so they do not affect our protein-ligand complex interactions. Similarly, secondary structure analysis (frame by frame) revealed that the proteins' regions had the same secondary structure. Several flexible areas show secondary structural changes at the same time, contributing to the protein's overall RMSD. Interestingly, the RMSD of castalagin in all of these circumstances resembles that of the 7BV2-Castalagin complex (i.e., a periodic fluctua-

tion in the RMSD value derived from conformational switching owing to rotation around the amide N-C bond (Fig. 5). According to the trajectory analysis, the 7BV2-Castalagin complex appears to be stable throughout the simulation (Fig. 5).

According to the secondary structure timeline study, the protein's secondary structure remained unchanged, with minimal fluctuations throughout the simulation (Fig. S9). To learn more about the crucial binding site residues that interact with ligands, we looked at their RMSD fluctuations. Arg-553, Arg-555, Asp-760, Asp-761, and Ser-814 are the five primary residues engaging with the ligand in the 7BV2-Castalagin complex, according to our docking analysis (Fig. 7, Fig. S10). Glu-398, Asp-206, Phe-390, Asp-382, Asp-350, Asn-394, Arg-393, and three water molecules are involved in H bonding with ligand oxygen atoms at 19, 40, and 51 (Fig. 7, Fig. S11) in the 6LZG-Castalagin complex, according to our docking analysis.

*Figure 6. Protein RMSF A. 7BV2 and B. 6LZG (On this plot, peaks indicate areas of the protein that fluctuate the most during the simulation. Typically, it is observed that the tails (N- and C-terminal) fluctuate more than any other part of the protein. Secondary structure elements like alpha helices and beta strands are usually more rigid than the unstructured part of the protein, and thus fluctuate less than the loop regions.*

The RMSD remained consistent at roughly 3.5Å, showing a more significant intermolecular contact between these residues and ligands. However, with such a small distance between active site residues and ligands, steric conflicts between the atoms present are likely to occur, resulting in significant penalties. Moreover, constant RMSD between key residues and ligands, with a magnitude of around 1 Å, exemplifies the rigidity of the 7BV2 binding site. It is probably because of this rigidity that ligand molecules cannot undergo conformational interconversion.



**Figure 4.** The 2D interaction view of phytochemicals and molnupiravir with SARS-CoV-2 Spike protein (6LZG)

*Figure 4. continues*



Figure 4(continued)

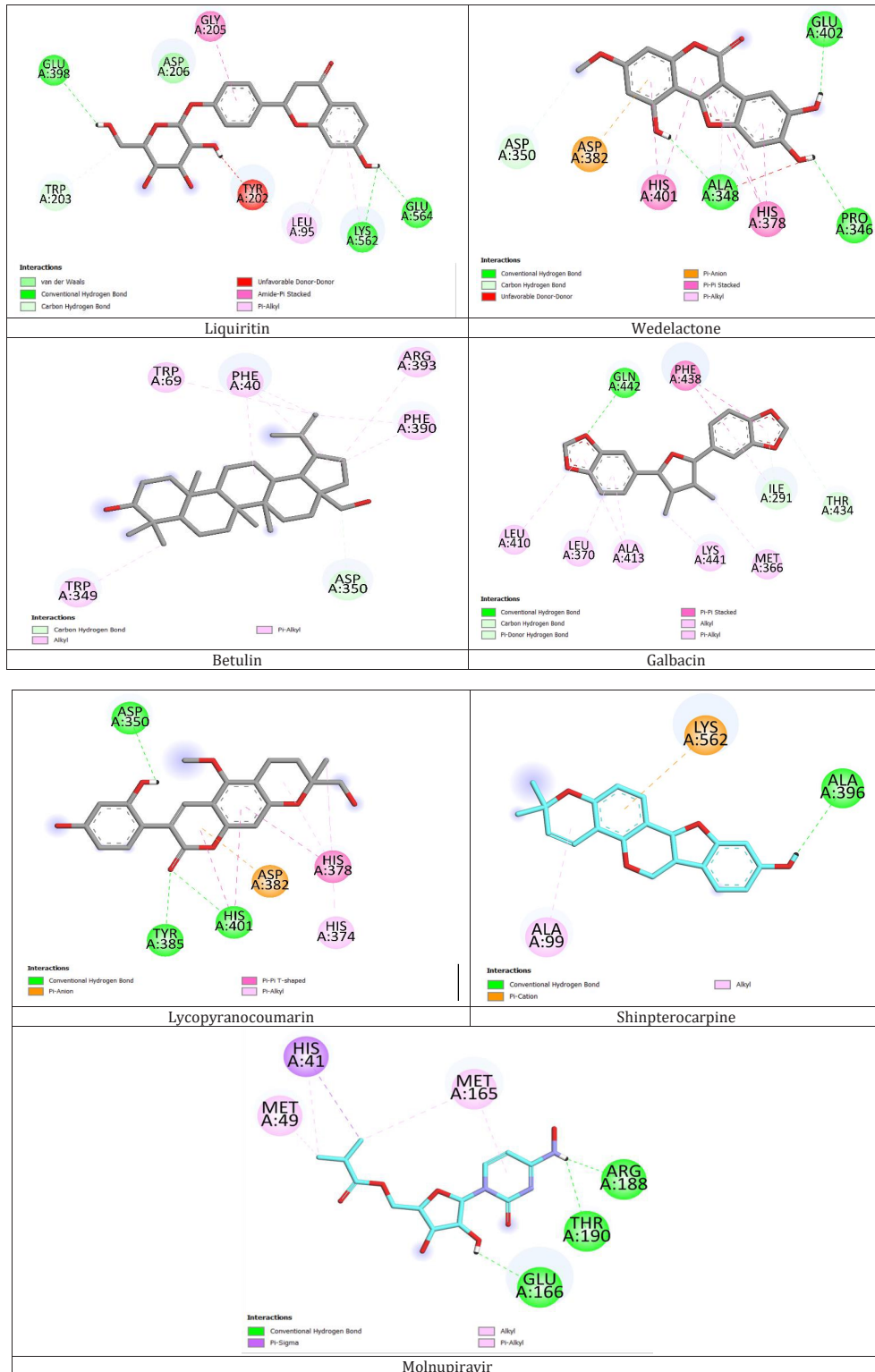
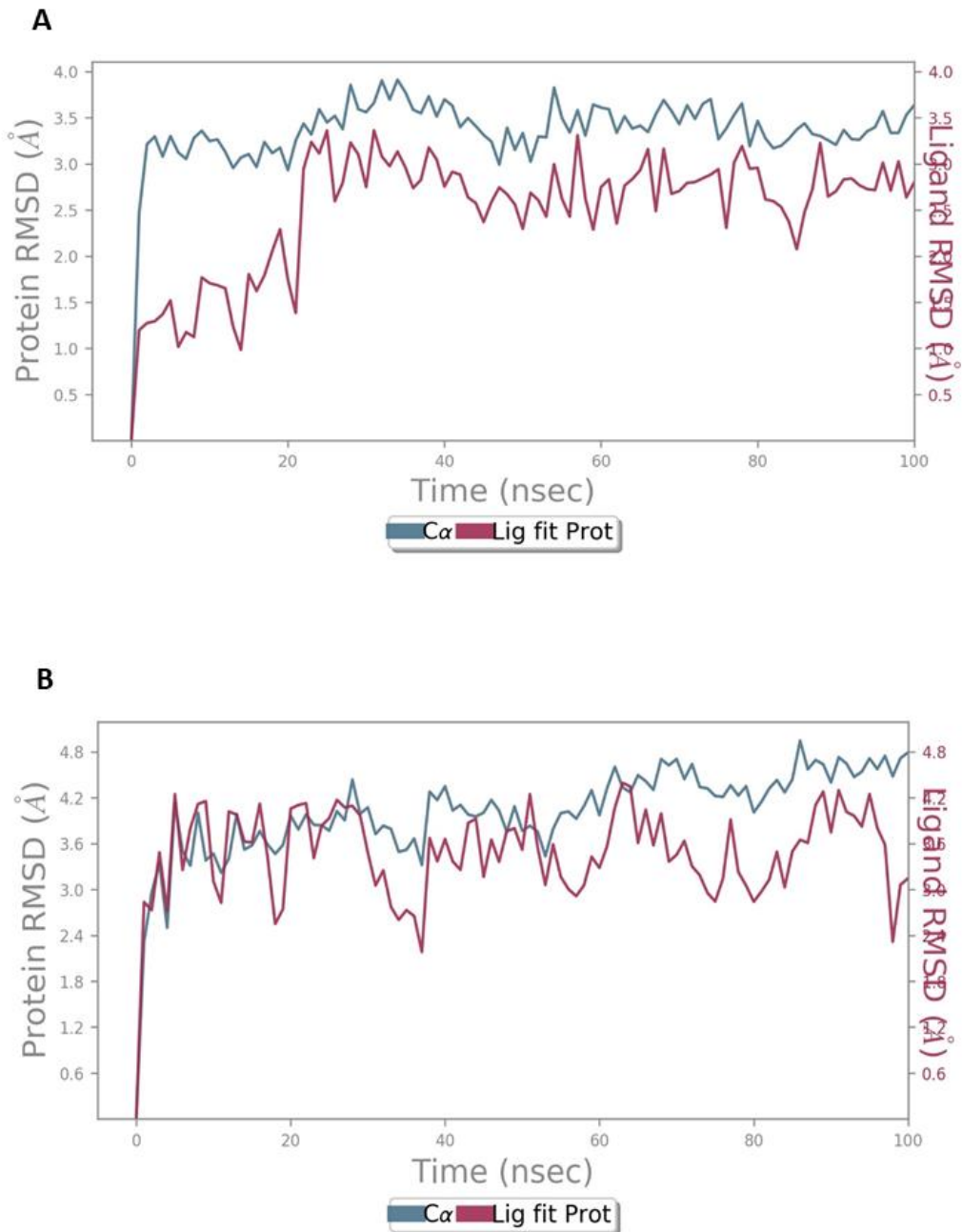


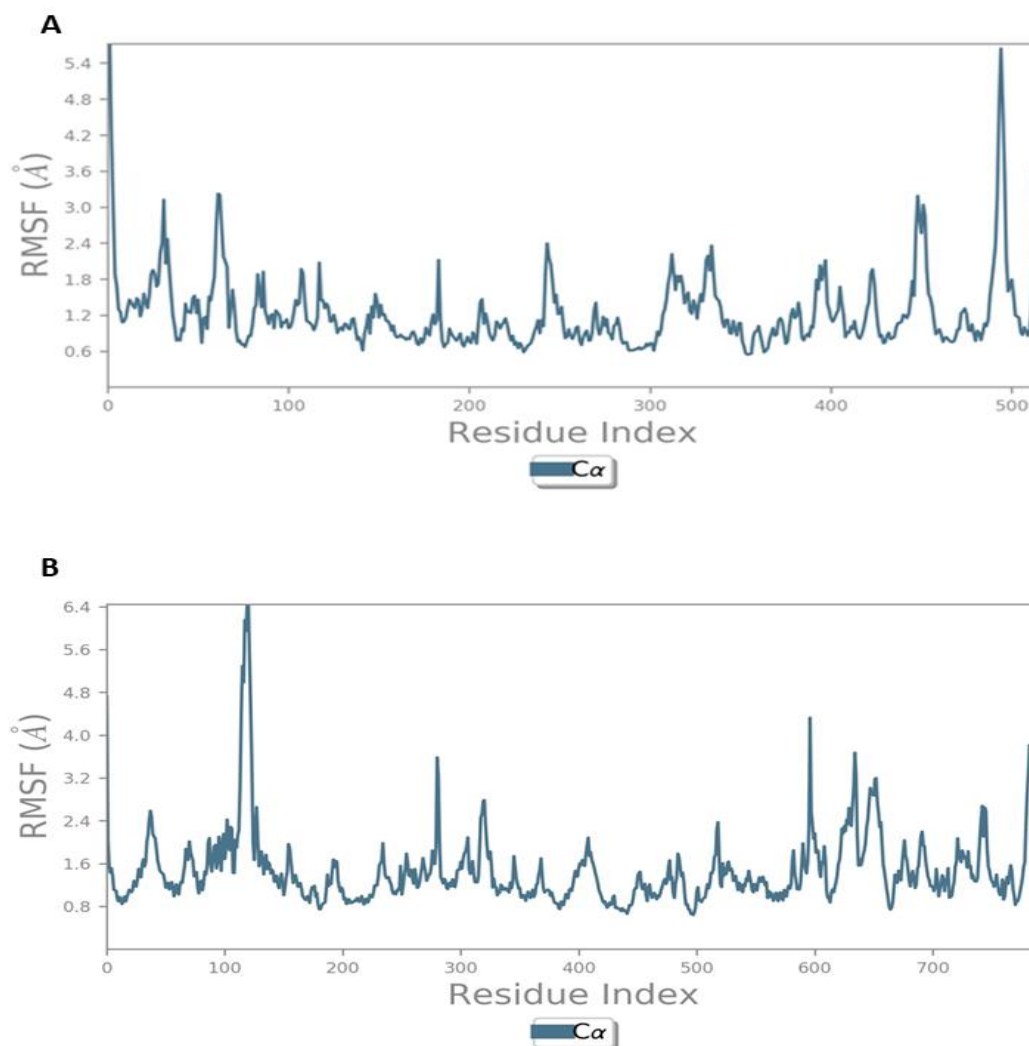
Figure 4. The 2D interaction view of phytochemicals and molnupiravir with SARS-CoV-2 Spike protein (6LZG)

**Table 4. Molecular Docking analysis and the type of molecular interaction of selected phytochemicals and molnupiravir against SARS-CoV-2 spike protein (6LZG)**

S. No	Name	Distance (Å)	Type	From Chain A	From Chemistry	To	To Chemistry	
1.	Castalagine	2.14	H-bond	Asp-350:HN	H-Donor	O 51	H-Acceptor	
		2.14	H-bond	Asp-350:HN	H-Donor	O 53	H-Acceptor	
		2.68	H-bond	Asn-394:HD21	H-Donor	O 10	H-Acceptor	
		2.56	H-bond	Asn-394:HD22	H-Donor	O 41	H-Acceptor	
		2.32	H-bond	Asn-394:HD22	H-Donor	O 32	H-Acceptor	
		2.35	H-bond	Lys-562:HZ2	H-Donor	O 59	H-Acceptor	
		2.33	H-bond	Lys-562:HZ3	H-Donor	O 61	H-Acceptor	
		3.20	H-bond	O 51	H-Donor	Asp-350:O	H-Acceptor	
		3.13	H-bond	O 65	H-Donor	Asp-206:OD2	H-Acceptor	
		3.96	Pi-Donor H-bond	O 45	H-Donor	His-401	Pi-Orbitals	
2.	Shinpterocarpine	2.65	H-bond	H 1	H-Donor	Ala-396:O	H-Acceptor	
		4.38	Pi-Cation	Lys-562:NZ	Positive	0	Pi-Orbitals	
		4.59	Alkyl	Ala-99	Alkyl	0	Alkyl	
		2.87	H-bond	Arg-188:HE22	H-Donor	O 7	H-Acceptor	
		1.99	H-bond	Thr-190:HN	H-Donor	O 6	H-Acceptor	
		3.04	H-bond	H 41	H-Donor	Glu-166:O	H-Acceptor	
		2.60	H-bond	H 30	H-Donor	Ala-396:O	H-Acceptor	
		3.78	Carbon Hydrogen Bond	Met-49:CA	H-Donor	N9	H-Acceptor	
		3.79	Carbon Hydrogen Bond	CH 22	H-Donor	Met-165:O	H-Acceptor	
		3.54	H-bond	His-41	H-Donor	CH22	H-Acceptor	
3.	Molnupiravir	3.57	H-bond	His-41	H-Donor	CH23	H-Acceptor	
		3.77	H-bond	H41	H-Donor	Gly-205:O	H-Acceptor	
		4.17	H-bond	H30	H-Donor	Ala-396:O	H-Acceptor	
		4.04	Pi-Cation	Asp-206:CA	H-Donor	N9	H-Acceptor	
		3.82	Carbon Hydrogen Bond	C12	H-Donor	Glu-208:O	H-Acceptor	



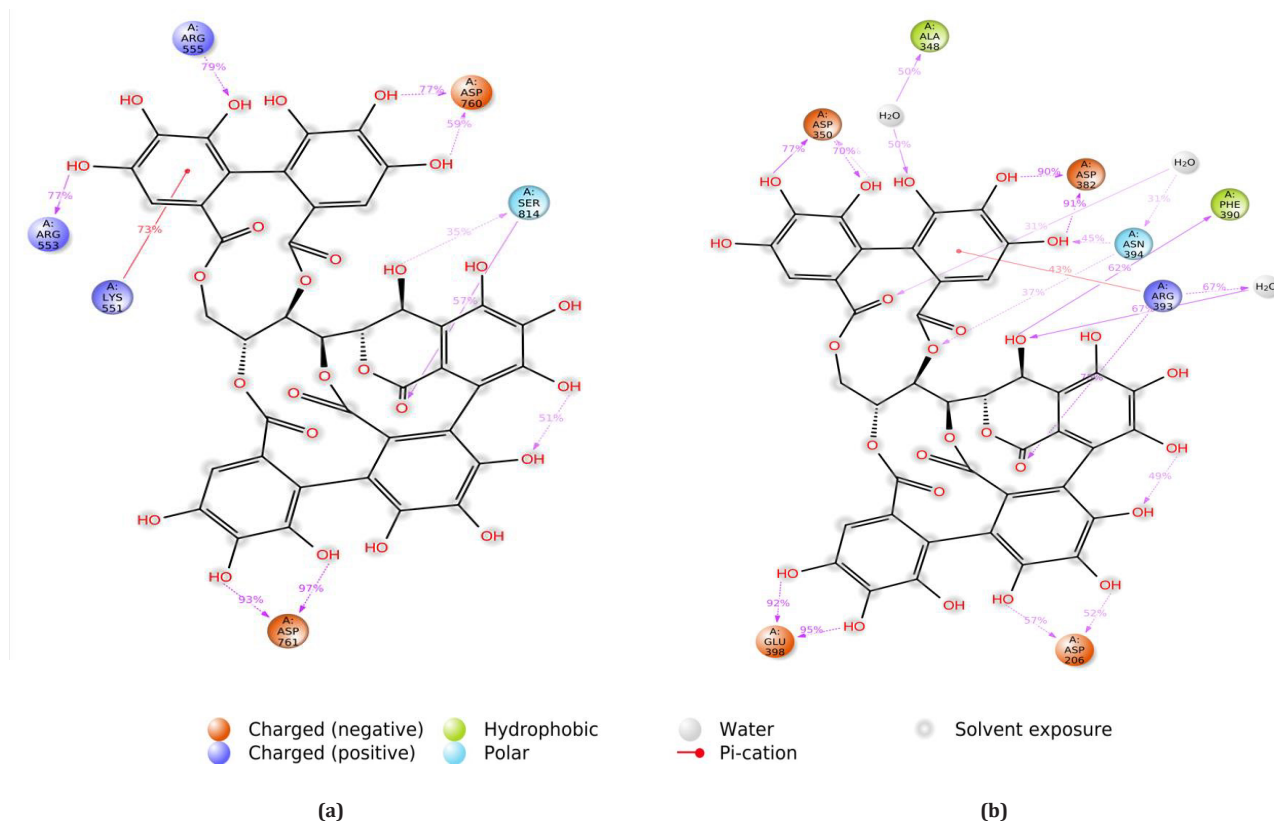
**Figure 5.** RMSD (Å) of the simulated protein A. 7BV2 and B. 6LZG in association with the inhibitor Castalagin after a 100 ns MD simulation.



**Figure 6.** Protein RMSF A. 7BV2 and B. 6LZG (On this plot, peaks indicate areas of the protein that fluctuate the most during the simulation. Typically, it is observed that the tails (*N*- and *C*-terminal) fluctuate more than any other part of the protein. Secondary structure elements like alpha helices and beta strands are usually more rigid than the unstructured part of the protein, and thus fluctuate less than the loop regions.

The above plot (Fig. 6) shows the RMSD evolution of a protein 6LZG (left Y-axis). All protein frames are first aligned on the reference frame backbone, and then the RMSD is calculated based on the atom selection. Monitoring the RMSD of the protein can give insights into its structural conformation throughout the simulation. RMSD analysis can show if the simu-

lation has equilibrated its fluctuations towards the end of the simulation around some thermal average structure. The order of changes from 1 to 3 Å is perfectly acceptable for small, globular proteins. However, changes much more significant than that show that the protein is undergoing a large conformational change during the simulation. It is also essential



**Figure 7.** MD Simulation analysis of Castalagin with 7BV2 (a) and 6LZG (b): The 2D interaction representation of the protein-castalagin complex after 100 ns simulation. A schematic of detailed ligand atom interactions with the protein residues. Interactions that occur more than 30.0% of the simulation time in the selected trajectory (0.00 through 100.00 ns) are shown.

30

that the simulation converges the RMSD values to stabilize around a fixed value. RMSF plot shows peaks show areas of the protein that fluctuate the most during the simulation. Typically, you observe that the tails (*N*- and *C*-terminal) fluctuate more than any other protein part. Secondary structure elements (SSE) like alpha helices and beta strands are usually more rigid than the unstructured part of the protein and thus fluctuate more minor than the loop regions and are monitored throughout the simulation.

Physicochemical properties and pharmacokinetic (ADMET) parameters provide drug-like properties of selected molecules. Pharmacokinetics studies of selected compounds using computational analysis

results are depicted in Table 5. The designed compounds have an appropriate logP (octanol/water) value for biological efficacy with zero to three Lipinski violations. They also had satisfying pharmacological properties of 95% available drugs with high to medium predicted oral absorption availability without any toxic functionality. The molecular weight of each ligand was within the range log S values within the acceptable range of 95% of existing drugs. The lipophilicity data suggested compounds were lipophilic (CLog P values -1.28 to 6.56 (Table 5). The predicted values of selected compounds are compared with standard molnupiravir. All the molecule's ADME properties are within the normal range.

Castalagin is predicted with a toxicity class IV for acute oral toxicity with an LD<sub>50</sub> value of 1400 mg/

**Table 5. ADMET properties of potential inhibitors from Ayurvedic medicinal plants, predicted using the web-based server SwissADME and Lipinski rule of five.**

Compound	QPlogPw	QPlogPo/w	QPlogS	QPlogBB	QPlogKp	HOA	SASA	RoF
Cordioside	1.24	4.791	-6.383	No	-3.148	Low	81.546	0
Castalagin	-3.36	-1.27	0.02	No	-7.77	Low	455.18	3
Betulin	-1.13	-0.08	-2.22	No	-9.68	Low	181.44	2
Arjunjenin	-4.23	5.43	-6.27	No	-5.54	High	118.22	1
Liquirtin	-0.75	-0.83	-1.72	No	-9.52	Low	145.91	1
Lycopyranocoumarin	1.02	0.69	-2.25	No	-8.24	High	105.45	0
Galbacin	3.11	3.19	-3.90	Yes	-6.19	High	46.15	0
Wedelactone	-0.79	-0.76	-1.33	No	-8.84	High	105.45	0
Daucosterol	5.93	6.56	-8.23	No	-3.75	Low	99.38	1
Shinpterocarpine	2.91	2.45	-3.47	Yes	-6.61	High	47.92	0
Molnupiravir	-1.62	-1.28	-0.75	No	-9.22	Low	150.04	0

QPlogPw - Predicted water/gas Partition co-efficient; QPlogPo/w - Predicted octanol/water Partition co-efficient corresponding to CLogP; QPlogS - Predicted Aqueous Solubility; QPlogBB - Predicted Blood/Brain Partition coefficient; QPlogKp - Predicted Skin permeability; HOA - Predicted Human Oral Absorption; PSA - Percent human Oral Absorption; RoF - Rule of 5 Number of violations of Lipinski's rule of five.

**Table 6. Predicted toxic properties of potential inhibitors from Ayurvedic medicinal plants, using ProTox-II platform.**

Compound	Predicted LD <sub>50</sub> (mg/Kg)	Hepatotoxicity	Carcinogenicity	Immunotoxicity	Mutagenicity	Cytotoxicity
Cordioside	274 (Class III)	0.95	0.79	0.96 (Active)	0.79	0.86
Castalagin	1400 (Class IV)	0.84	0.59	0.74 (Active)	0.65	0.79
Betulin	2000 (Class IV)	0.88	0.65	0.50	0.79	0.99 (Active)
Arjunjenin	1600 (Class IV)	0.92	0.63	0.60	0.84	0.76
Liquirtin	2300 (Class V)	0.82	0.85	0.77 (Active)	0.76	0.88
Lycopyranocoumarin	500 (Class IV)	0.80	0.79	0.98 (Active)	0.64	0.70
Galbacin	1500 (Class IV)	0.77	0.53 (active)	0.79 (Active)	0.64	0.82
Wedelactone	3800 (Class V)	0.78	0.66 (active)	0.90	0.50 (Active)	0.67
Daucosterol	8000 (Class VI)	0.94	0.71	0.99 (active)	0.83	0.55
Shinpterocarpine	500 (Class IV)	0.82	0.52 (active)	0.99 (active)	0.51	0.91
Molnupiravir	826 (Class IV)	0.56 (active)	0.50	0.96	0.50	0.80

Kg with a prediction accuracy of 78% (Table 6). The organ toxicity (hepatotoxicity) of castalagin was predicted with a confidence score of 0.84 and the toxicological endpoint (immunotoxicity) with a confidence score of 0.74 (active). Based on ProTox-II platform toxicity prediction studies, except for betulin, arjunjenin, wedelactone, and molnupiravir, all are maybe active for immunotoxicity, resulting in significant toxic consequences (Table 6). In the present study, we have docked 120 phytoconstituents from six medicinal plants and found 10 phytochem-

icals that showed a better binding affinity towards the SARS-CoV-2 RdRp and Spike protein. The docking result is based on binding energy and ligand docking pose. The obtained results suggested each compound has a difference in energy value between ligand and SARS-CoV-2 RdRp and Spike protein by comparing all studied molecules with molnupiravir based on the interaction energy value. Among that, castalagin at interaction energy value (-14.5 and 14.1 kcal/mol) on SARS-CoV-2 RdRp and Spike protein, respectively.

QPlogPw - Predicted water/gas Partition co-efficient; QPlogPo/w - Predicted octanol/water Partition co-efficient corresponding to CLogP; QPlogS - Predicted Aqueous Solubility; QPlogBB - Predicted Blood/Brain Partition coefficient; QPlogKp - Predicted Skin permeability; HOA - Predicted Human Oral Absorption; PSA - Percent human Oral Absorption; RoF - Rule of 5 Number of violations of Lipinski's rule of five.

#### 4. Conclusions

COVID-19 is a contagious disease triggered by SARS-CoV-2 virus and has turned into a global pandemic in the flicker of an eye. SARS-CoV-2 RdRp and Spike protein are shown to be highly potent and vital targets for the inhibition of COVID-19 contamination. In the present study, we have docked 120 phytoconstituents from six different medicinal plants; 10 phytochemicals such as castalagin, wedelolactone, arjungenin, betulin, galbacin, shiinterocarpin, liquiritin, cordioside, licopyranocoumarin, and daucosterol show the improved binding affinity towards targets. Castalagin showed higher binding energy (-14.5 and 14.1 kcal/mol) on SARS-CoV-2 RdRp and Spike protein, respectively, by forming six conventional hydrogen bonds (bond distance 2 to 3.5 Å). These phytochemicals might be repurposed against COVID-19. The elite

docked compounds with drug-like properties have a harmless ADMET profile, which may help to develop optimized potent COVID-19 inhibitors. From this study, we may conclude that the above-stated active phytochemicals may be projected to have the potential to be repurposed as anti-COVID-19 therapeutics. □

#### Declarations

##### Declaration of competing interest

The authors declare no competing interest.

#### Funding

This research is not supported by any funding source from the public, commercial, or not-for-profit sectors. It was performed as part of the employment of the authors, and the employer is MNR College of Pharmacy.

#### Acknowledgment

The authors would like to thank the Chairman and Management of MNR College of Pharmacy, Sangareddy, India, for providing the requisite facilities for conducting this research work.

Supplementary Material available [Click here](#)

#### References

1. Khandker S.S, Godman B, Jawad M.I., Meghla B.A., Tisha T.A., Khondoker M.U., Haq M.A., Charan J, Talukder A.A., Azmuda N, Sharmin S, Jamiruddin M.R., Haque M, Adnan N. A systematic review on covid-19 vaccine strategies, their effectiveness, and issues. *Vaccines*. 9 (12), 1, 2021.
2. Morales-Núñez J.J., Munoz-Valle J.F., Meza-López C, Wang L.F., Sulbarán A. C. M., Torres-Hernández P. C., Bedolla-Barajas M, De la O-Gómez B, Balcázar-Félix P, Hernández-Bello J. Neutralizing Antibodies Titers and Side Effects in Response to BNT162b2 Vaccine in Healthcare Workers with and without Prior SARS-CoV-2 Infection. *Vaccines*. 9 (7), 2021.
3. Butler C.C., Yu L.M., Dorward J., Gbinigie O, Hayward G., Saville B. R., Van Hecke O, Berry N, Detry M. A., Saunders C, Fitzgerald M, Harris V, Djukanovic R, Gadola S, Kirkpatrick J, Lusignan S. de, Ogburn E., Evans P. H., Thomas N. P.

- B., Patel M. G., F. D. R. Hobbs. Doxycycline for community treatment of suspected COVID-19 in people at high risk of adverse outcomes in the UK (PRINCIPLE): a randomised, controlled, open-label, adaptive platform trial. *Lancet. Respir. Med.* 9 (9), 1010, 2021.
4. Xia Q., Dai W., Xu K., Ni Q., Li Y., Liu J., Zhao H., Guo Y., Yu L., Yi P., Su J., Lang G., Tao J., Shi D., Wu W., Wu X., Xu Y., Xu M., Yu L., Wang X., Cai H., Fang Q., Zhou J., Qiu Y., Li L. Clinical efficacy of methylprednisolone and the combined use of lopinavir/ritonavir with arbidol in treatment of coronavirus disease 2019. *J. Med. Virol.* 93 (7), 4446, 2021.
  5. Suwannarach N., Kumla J., Sujarit K., Pattananandecha T., Saenjum C., Lumyong S. Natural Bioactive Compounds from *Feculesungi* as Potential Candidates for Protease Inhibitors and Immunomodulators to Apply for Coronaviruses. *Molecules.* 25 (8), 1800, 2020.
  6. Sen D., Debnath P., Debnath B., Bhaumik S., Debnath S. Identification of potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease and spike receptor from 10 important spices through structure-based virtual screening and molecular dynamic study. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 40(2), 941, 2022.
  7. Hu X., Cai X., Song X., Li C., Zhao J., Luo W., Zhang Q., Ekumi I. O., He Z. *Future Virol.* 2020.
  8. Ibrahim M. A. A., Abdelrahman A. H. M., Husien T. A., Badr E. A. A., Mohamed T. A., El-Seedi H. R., Pare P. W., Efferth T., Hegazy M.-E. F. In silico drug discovery of major metabolites from spices as SARS-CoV-2 main protease inhibitors. *Comput. Biol. Med.* 126, 104046, 2020.
  9. Ibrahim M. A. A., Mohamed E. A. R., Abdelrahman A. H. M., Allemailem K. S., Moustafa M. F., Shawky A. M., Mahzari A., Hakami A. R., Abdeljawaad K. A. A., Atia M. A. M. Rutin and flavone analogs as prospective SARS-CoV-2 main protease inhibitors: In silico drug discovery study. *J. Mol. Graph. Model.* 105, 107904, 2021.
  10. Malviya S., Rawat S., Kharia A., Verma M. Medicinal attributes of *Acacia nilotica* Linn.-A comprehensive review on ethnopharmacological claims. *Int. J. Pharm. Life Sci.* 2(6), 830, 2011.
  11. Pastorino G., Cornara L., Soares S., Rodrigues F., Oliveira M. B. P. P. Licorice (*Glycyrrhiza glabra*): A phytochemical and pharmacological review. *Phytother. Res.* 32(12), 2323, 2018.
  12. Dastagir G., Rizvi M. A. Review - *Glycyrrhiza glabra* L. (Licorice). *Pak. J. Pharm. Sci.* 29(5), 1727, 2016.
  13. Ito H., Yamaguchi K., Kim T.H., Khenouf S., Gharzouli K., Yoshida T. Dimeric and trimeric hydrolyzable tannins from *Quercus coccifera* and *Quercus suber*. *J. Nat. Prod.* 65(3), 339, 2002.
  14. Sohretoglu D., Kuruüzüm-Uz A., Simon A., Patócs T., Dekany M. New secondary metabolites from *Quercus coccifera* L. *Rec. Nat. Prod.* 8(4), 323, 2014.
  15. Bag A., Bhattacharyya S. K., Chattopadhyay R. R. The development of *Terminalia chebula* Retz. (Combretaceae) in clinical research. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 3(3), 244, 2013.
  16. Upadhyay S., Tripathi P. K., Singh M., Raghavendhar S., Bhardwaj M., Patel A. K. Evaluation of medicinal herbs as a potential therapeutic option against SARS-CoV-2 targeting its main protease. *Phytother. Res.* 34(12), 3411, 2020.
  17. Hossen K., Das K. R., Okada S., Iwasaki A., Suenaga K., Kato-Noguchi H. Allelopathic Potential and Active Substances from *Wedelia chinensis* (Osbeck). *Foods (Basel, Switzerland).* 9(11), 2020.
  18. Koul S., Pandurangan A., Khosa R. L. *Wedelia chinensis* (Asteraceae) – An overview. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2(2, Supplement), S1169, 2012.
  19. Yin W., Mao C., Luan X., Shen D. D., Shen Q., Su H., Wang X., Zhou F., Zhao W., Gao M., Chang S., Xie Y. C., Tian G., Jiang H. W., Tao S. C., Shen J., Jiang Y., Jiang H., Xu Y., Zhang S., Zhang Y., Xu H. E. Structural basis for inhibition of the



- RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 by remdesivir. *Science* **368**(6498), 1499 (2020).
20. Wang Q., Zhang Y., Wu L., Niu S., Song C., Zhang Z., Lu G., Qiao C., Hu Y., Yuen K. Y., Wang Q., Zhou H., Yan J., Qi J. Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell*. 181(4), 894, 2020.
  21. Trott O., Olson A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* 31(2), 455, 2010.
  22. Krieger E., Vriend G. YASARA View - molecular graphics for all devices - from smartphones to workstations. *Bioinformatics*. 30(20), 2981, 2014.
  23. Yuan S., Chan H. C. S., Hu Z. Using PyMOL as a platform for computational drug design. *WIREs Comput. Mol. Sci.* 7(2), e1298, 2017.
  24. Nutho B., Mahalapbutr P., Hengphasatporn. Using PyMOL as a platform for computational drug design. *Science* **9**(3), e1298 (2020).
  25. Lipinski C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov. Today Technol.* 1(4), 337, 2004.
  26. Banerjee P., Eckert A.O, Schrey A.K., Preissner R. ProTox-II: a web server for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic Acids Res.* 46(W1), W257, 2018.
  27. Daina A., Michielin O., Zoete V.. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* 7, 42717, 2017.
  28. Tang J.-J., Li J.-G., Qi W., Qiu W.-W., Li P.-S., Li B.-L., Song B.-L. Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduces atherosclerotic plaques. *Cell Metab.* 13(1), 44, 2011.



# The Commodity Analysis of the Basic Dental Care Product

Tatyana Diadiun\*<sup>1</sup>, Olexandr Kukhtenko<sup>2</sup>, Bohdana Pavliuk<sup>3</sup>, Iryna Herasymets<sup>4</sup>, Dmytro Soldatov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National University of Pharmacy, Department of Organization and Economy in Pharmacy, Kharkiv, Ukraine

<sup>2</sup>National University of Pharmacy, Department of Technologies of Pharmaceuticals, Kharkiv, Ukraine

<sup>3</sup>Horbachevsky Ternopil National Medical University, Department of Pharmacy Management, Economics and Technology, Ternopil, Ukraine,

<sup>4</sup>Horbachevsky Ternopil National Medical University, Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology

**KEYWORDS:**  
products for individual oral hygiene; product range, prevention, cost, commodity analysis

## ABSTRACT

Quality oral hygiene is the most common and effective method of dental diseases prevention. Access to individual selection and purchase of toothbrushes provides a great demand for them, which contributes to the constant expansion of the range. This makes conducting a commodity analysis of products for individual oral hygiene relevant. A toothbrush is the main mean of oral care, and the main tool for cleaning teeth.

## ARTICLE INFO:

Received: July 24, 2022

Revised: December 4, 2022

Accepted: December 5, 2022

Available on line: March 23, 2023

## \* CORRESPONDING

### AUTHORS:

Tatyana Diadiun

E-mail:

diadiunscience@gmail.com

## Introduction

Oral health is one of the major concerns of dental health care professionals<sup>1</sup>. Most of periodontal diseases (halitosis, gingivitis, periodontitis, gum abscesses, peri-implant mucositis, etc.) are bacteria-dependent, through biofilm formation and dental plaque accumulation<sup>2</sup>. The promotion of regular oral hygiene can contribute to the maintenance of a functional dentition throughout life<sup>3</sup>. Currently available approaches to control bacterial plaque development can be categorized as either mechanical (toothbrushes, floss, interdental brushes, chewing sugar-free gums) or chemotherapeutic (toothpaste, mouthwashes, gels)<sup>4</sup>. In Western industrialized countries, a toothbrush is widely accepted as a simple, affordable and effective device to remove plaque in a shorter time<sup>5,6</sup>. To date, dental professionals recommend brushing teeth twice a day for two minutes<sup>7,8</sup>. However, a wide diversity in brushing methods does exist depending on the position and motion of the brush. There appears to be no consensus on the ideal technique neither for the general population nor for people of different ages or with particular dental conditions<sup>9</sup>. No method is satisfactory when considering interdental

**Table 1 Toothbrush change frequency study**

Frequency of tooth-brush change	20-40 years		40-60 years	
	Number of persons	Percentage	Number of persons	Percentage
Once in 3 months	35	70	14	28
Once in 6 months	8	16	21	42
After loss of efficiency by the brush	7	14	15	30

cleanliness. Tooth brushing is able to clean the buccal, lingual, and occlusal tooth surfaces but the proximal and interdental areas often stay untouched<sup>10</sup> or roughly cleaned<sup>11</sup>. Furthermore, tooth brushing efficiency for plaque removal relies on several parameters: motivation and skills of the subject, the use of a brush that fits the mouth allowing it to reach all areas, as well as proper oral hygiene education with instructions on movement, duration, and frequency of brushing<sup>12</sup>. As an example, the two-minute recommendation for brushing time is hardly ever achieved in behavioral studies. Most people spend between 30 and 60 s brushing their teeth<sup>13,14</sup>, while plaque removal efficiency is known to be time-dependent<sup>15-17</sup>.

The work aimed to study the product range of oral care products and to analyze the pricing policy in the pharmaceutical market of Ukraine.

**Objectives of the Research.** Conducting frequency analysis, commodity analysis and pricing policy for personal hygiene products, toothbrushes as well as determining the level of public awareness of personal oral hygiene.

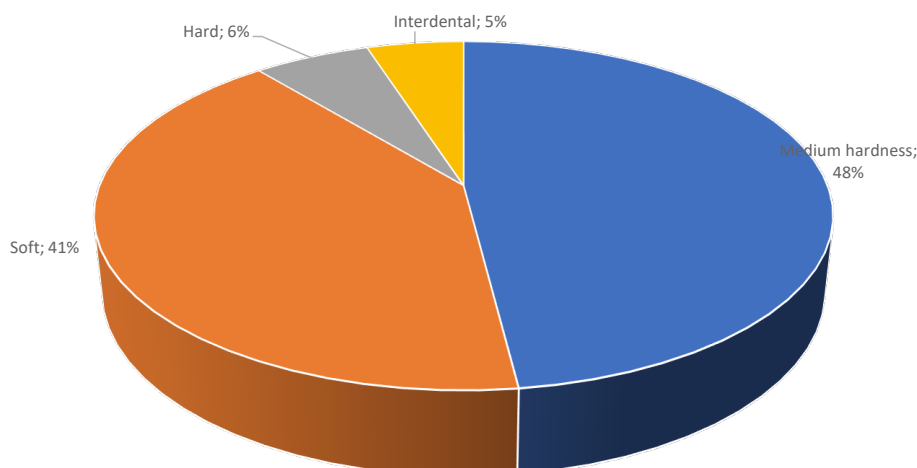
### Materials and methods.

Frequency and descriptive analysis of literature sources, product range and prices from online retail sites of Pharmacy 9-1-1 (<https://apteka911.ua/ua/shop/zubnyie-schetki>), Low Price Pharmacy (<https://anc.ua/ru/catalog/ezhednevnyagigiena-297/zubnye-shchetki-312>) and Eva Beauty and Health Products Store (<https://eva.ua/ua/024-031-032/zubnye-schetki/>).

### Results And Discussion.

In January 2022, a survey was conducted on the topic of dental hygienic awareness of the population. 164 people were surveyed, of which 107 women (65%) and 57 men (35%). The median age was 25 years for women and 30 years for men. Thus, 114 (69.5%) people brush their teeth twice a day, 38 (23%) – once, and 12 (7.5%) people – more than twice a day. At the same time, such persons who do not brush at all were not noted.

Questions in the questionnaires also concerned personal oral hygiene and the causes of its violations, 51% of the respondents violate the observance of personal oral hygiene due to lack of awareness and information, 47% - due to the intense rhythm of life. Only 2% of respondents allow violations due to material distress. The tooth brushing time is not regulated and depends on the chosen brush and brushing technique. When using conventional brushes in people without periodontal diseases on average, it should be 3 min. At the same time, it is necessary to perform 400 paired movements<sup>18</sup>. Selection of a toothbrush should be carried out individually depending on the clinical condition of the oral cavity organs and tissues. The life of a toothbrush depends on many factors: how often a person brushes his or her teeth, for how long, what is the force of pressure, what is the abrasiveness of the toothpaste. It is advisable to replace a conventional brush on average once every 2–3 months, more often for the ones made from natural bristles, or when the first signs of bristle wear appear<sup>19</sup>.



**Figure 1** Market share by the hardness degree

The results of the survey on the frequency of toothbrush changes (Table 1) showed that people who replace the subject every 6 months are almost 3 times more likely to be 40-60 years old compared to 20-40 years old. Persons who change the brush when it loses effectiveness, because they believe that more frequent replacement with a new one is inexpedient both financially and in terms of efficiency, are half as much among young respondents.

The largest number of respondents change their toothbrush once in 3 months, 70% of people aged 20-40 years and 28% aged 40-60 years. 16% of respondents from the first age category and 42% from the second category change their toothbrush once in six months. After loss of efficiency, the toothbrush is replaced by 14% of respondents aged 20-40 years and 30% aged 40-60 years.

A study on the storage of oral hygiene products was also carried out by means of a questionnaire. Questionnaires of 126 people were analyzed. After the use, the brush is washed, and left in an upright position in an individual cup or wall holder by 17% of respondents. 58% of respondents indicated the storage of brushes in a common cup. 25% of the respondents constantly use a container that closes the working part of the brush. A survey was also conducted, which showed that the majority of 126 peo-

ple (76.8%) use manual toothbrushes. And only 38 respondents (23.2%) use electric brushes to brush their teeth.

The data of the Compendium handbook were used in the studies<sup>20</sup>.

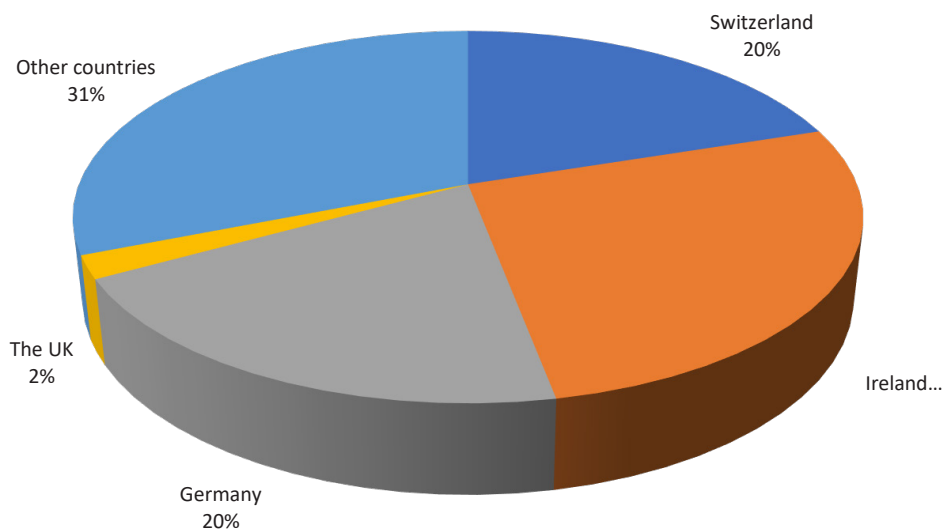
Thus, as seen in Fig. 1, in the market of Ukraine, the largest number of toothbrushes are of medium hardness, 48%, soft – 41%, hard – 6%, the least are interdental, they only take 5%.

Also, according to the Compendium [20], frequency analysis of toothbrushes on the Ukrainian market by country of manufacture has been carried out.

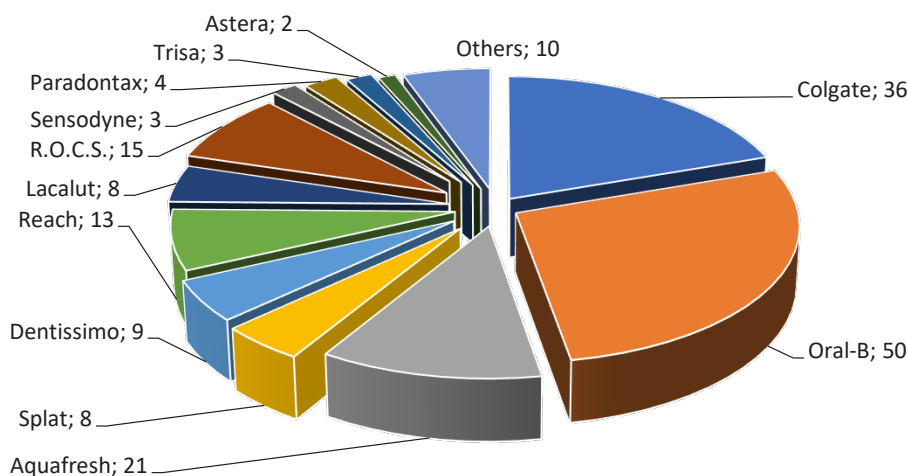
Fig. 2 shows that the largest number of toothbrushes on the Ukrainian market (27%) is represented by the Irish-made products, the second most frequent toothbrushes are of German and Swiss manufacture (22%), the least is represented by the UK (2%).

Also, according to the Compendium<sup>20</sup>, frequency analysis of toothbrushes on the Ukrainian market by manufacturers was carried out. The results are presented in Fig. 3.

The largest number of toothbrushes on the market is represented by Oral-B (27%), with toothbrushes manufactured by Colgate (20%) following. Aquafresh – 12%, R.O.C.S – 8%, Reach - 7%, Dentissimo – 5%, Splat and Lacalut – 4% each, Sensodine, Parodontax and Trisa – 2% each, the smallest number of



**Figure 2.** Distribution of toothbrush by the country of origin



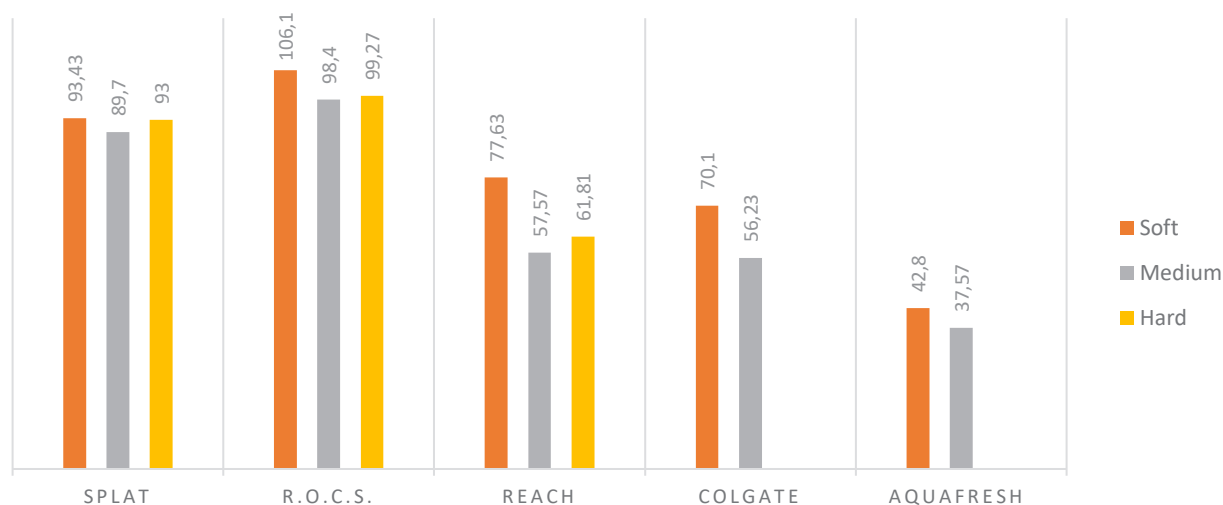
**Figure 3.** Frequency analysis of toothbrush market

toothbrush is represented by the manufacturer Astera – 1%, the others account for 6%.

It is worth noting that the majority of respondents could not clearly indicate the toothbrush of which company or what rigidity they usually use. They say that they only focus on price.

To investigate this, it is relevant to study the pricing policy for toothbrushes in the Ukrainian market.

The range and prices of toothbrushes in the chain of pharmacies 9-1-1<sup>21</sup>, the “low prices pharmacy” chain<sup>22</sup> and the network of stores of beauty and health products “Eva”<sup>23</sup> were analyzed.



**Figure 4.** Overall average price of toothbrush, UAH.

Note: 100UAH=2.41EUR=2.48USD

For the study, toothbrushes of varying degrees of rigidity were selected from the following manufacturers: SPLAT, R.O.C.S., REACH, Colgate and Aquafresh. For comparison, toothbrushes of different price categories were used. (Fig 4.)

Among the toothbrushes manufactured by SPLAT, the lowest average price is for medium hardness brushes – 89.70 UAH, and the highest is for soft brushes. Their average price is 93.43 UAH, which is just UAH 0.43 higher than the average price of SPLAT hard brushes.

Among R.O.C.S. toothbrushes, the lowest average price have medium hardness brushes – 98.40 UAH, while the highest average price is noted for soft brushes - 106.10 UAH. The average price for toothbrushes with hard bristles is 99.27 UAH.

Among the REACH toothbrushes, the lowest average price have medium-hardness brushes, 57.57 UAH, and the highest is for soft brushes, the average price of which is 77.63 UAH. The average price for hard toothbrushes by REACH is UAH 61.81.

Among the Colgate range, hard toothbrushes are not represented on the platforms studied.

Among the studied toothbrushes manufactured by Colgate, the lowest average price is for medi-

um-hardness brushes, 56.23 UAH, while the highest average price is for soft brushes, 70.10 UAH.

Among the Aquafresh range, hard toothbrushes are not represented on the platforms studied.

Among the studied toothbrushes manufactured by Aquafresh, the lowest average price is for medium hardness toothbrushes, 37.57 UAH, while the highest average price is for soft toothbrushes, 42.80 UAH. (Table 5).

The results of the analysis of toothbrush prices with different degrees of hardness were used to determine and compare the overall average prices of products of different manufacturers (Fig. 4). The total average price for SPLAT toothbrushes is UAH 92.04, R.O.C.S. - UAH 101.26, reach - UAH 104.05, Colgate - UAH 63.17, Aquafresh - UAH 40.19.

The lowest overall average price for toothbrushes is noted at the manufacturer Aquafresh, it is 40.19 UAH. The highest prices have been recorded for REACH toothbrushes, UAH 104.05.

## Conclusions.

In recent years, the product range of toothbrushes in the pharmaceutical market of Ukraine has under-

gone significant expansion. Despite this, the level of awareness of the population about the right choice and care for personal oral hygiene products is not satisfactory. Most of the respondents could not clearly indicate what kind of toothbrush they usually use, but 23.2% indicated that they use electric brushes, and 76.8% use manual brushes. This indicates the popularity of manual toothbrushes among consumers. According to the frequency analysis of the range of toothbrushes by the degree of hardness, the most common are medium-hard brushes, 48%. While the soft ones take the second place – 41%, and the hard

ones with only 6% rank third. The results of the analysis of prices for toothbrushes of different hardness show that the lowest price in all the studied manufacturers have toothbrushes of medium hardness. While the lowest total average price is noted for Aquafresh toothbrushes, it is UAH 40.19, the highest prices are recorded for REACH toothbrushes – UAH 104.05.

Thus, it can be concluded that the pharmaceutical market of Ukraine is saturated with toothbrushes of different types and from different price categories, which meets the needs of all categories of consumers. □

## References

1. Van Der Weijden FA, Slot D.E. Oral hygiene in the prevention of periodontal diseases: the evidence. *Periodontol.* 55,104–123, 2011. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00337.x.
2. Baehni PC, Takeuchi Y. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. *Oral Dis.* 9(suppl1), 23–29, 2003. doi: 10.1034/j.1601-0825.9.s1.5.x.
3. Claydon N.C. Current concepts in toothbrushing and interdental cleaning. *Periodontol* 2000. 48,10-22, 2008. doi: 10.1111/j.1600-0757, 2008.00273.x. PMID: 18715352.
4. Choo A, Delac D.M., Messer L.B. Oral hygiene measures and promotion: review and considerations. *Aust. Dent. J.* 46(3),166-73, 2001. doi: 10.1111/j.1834-7819.2001.tb00277.x. PMID: 11695154.
5. Loe H. Oral hygiene in the prevention of caries and periodontal disease. *Int. Dent. J.* 50,129–139,2000. doi: 10.1111/j.1875-595X.2000.tb00553.x.
6. Grover D, Malhotra R, Kaushal S, Kaur G. Toothbrush – a key mechanical plaque control. *Ind. J. Oral Sci.* 3, 62–68, 2012. doi: 10.4103/0976-6944.106456.
7. American Dental Association. Available: <http://www.mouthhealthy.org/en/az-topics/b/brushing-your-teeth> (accessed on October 10, 2016).
8. UFSBD. Available: <http://www.ufsbd.fr/es-pace-grand-public/votre-sante-bucco-dentaire/recommandations-hygiene-bucco-dentaire> (accessed on October 10, 2016).
9. Wainwright J, Sheiham A. An analysis of methods of toothbrushing recommended by dental associations, toothpastes and toothbrush companies and in dental texts. *Br. Dent. J.* 217, E5, 2014. doi: 10.1038/sj.bdj.2014.651.
10. Kinane D.F.( 1998) The role of interdental cleaning in effective plaque control: need for interdental cleaning in primary and secondary prevention. In: Lang NP, Attström R, Loe H, editors. *Proceedings of the European workshop on mechanical plaque removal.* Berlin, Quintessence, Publishing co. pp. 156–168. [Google Scholar]
11. Mastroberardino S, Grazia Cagetti M, Cocco F, Campus G, Pizzocri J, Strohmenger L. Vertical brushing versus horizontal brushing: a randomized split-mouth clinical trial. *Quintessence Int.* 45, 653–661, 2014.
12. Frandsen A. (1986) Mechanical oral hygiene practices. In: Loe H, Kleinman D.V, editors. *Dental plaque control measures and oral hygiene practices.* Oxford- Washington DC: IRL Press. pp. 93–116.
13. MacGregor I, Rugg-Gunn A. A survey of toothbrushing sequence in children and young adults. *J. Periodontol Res.* 14, 225–230, 1979. doi: 10.1111/

- j.1600-0765.1979.tb00227.x.
14. Van der Weijden FA, Timmerman M.F, Nijboer A, et al. A comparative study of electric tooth-brushes for the effectiveness of plaque removal in relation to toothbrushing duration. *J. Clin. Periodontol.* 20, 476–481, 1993. doi: 10.1111/j.1600-051X.1993.tb00394.x.
  15. Honkala E., Nyssonen V., Knuuttila M., Markkanen H. Effectiveness of children’s habitual toothbrushing. *J. Clin. Periodontol.* 13, 81–85, 1986. doi: 10.1111/j.1600-051X.1986.tb01418.x.
  16. Van der Weijden FA, Timmerman M.F, Danser M.M, et al. Approximal brush head used on a powered toothbrush. *J. Clin. Periodontol.* 32,317–322, 2005. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00700.x.
  17. Gallagher A., Sowinski J., Bowman J. et al. The effect of brushing time and dentifrice on dental plaque removal *in vivo*. *J. Dent. Hyg.* 83,111–116, 2009.
  18. Melnychuk G. M. (2011) Gingivitis, periodontitis, periodontal disease: peculiarities of treatment: training manual. – 5th edition, supplemented / G. M. Melnychuk, M. M. Rozhko, L. V. Zaverbna. Ivano-Frankivsk, p. 328.
  19. Therapeutic dentistry G. M. Melnychuk, M. O. Kushnirenko, A. S. Melnychuk, R. S. Kashivska, SHEE “Ivano-Frankivsk National Medical University” “Modern products of oral care, methods of brushing teeth in adults and children”
  20. <https://compendium.com.ua>
  21. <https://apteka911.ua/shop/zubnyie-schetki/aquafresh>
  22. <https://aptekanizkihcen.ua/en/search>
  23. <https://eva.ua/ua/024-031-032/brnd-72858/zubnye-schetki/>



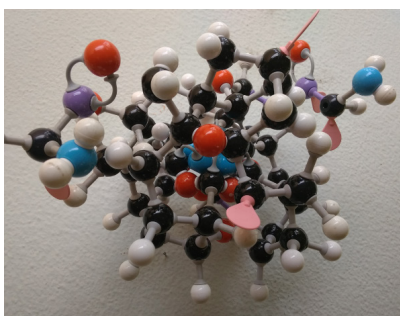
# A 3D 'lego-like' Atomic Model Represents Viruses and/or m-RNA Vaccines. An Educational Multitasking Tool.

Costas Demetzos

Department of Pharmacy, Laboratory of Pharmaceutical Technology, School of Health Sciences, National & Kapodistrian University of Athens

<http://demetzoslab.gr/>; <https://orcid.org/0000-0001-9771-4314>; <http://linkedin.com/in/costas-demetzos-76a651203>

Graphical Abstract



“Molecular sculpture” as 3D 'lego-like' atomic model of mRNA vaccines against the SARS-CoV-2 virus.

## KEYWORDS:

**lego model; viruses, vaccines**

## ARTICLE INFO:

Received: January 12, 2023

Revised: January 15, 2023

Accepted: January 15, 2023

Available on line: March 23, 2023

## \* CORRESPONDING

### AUTHOR:

C., Demetzos,  
demetzos@pharm.uoa.gr

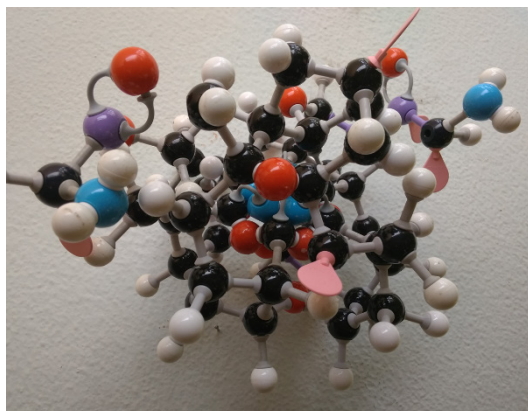
## ABSTRACT

Our proposition was to design an atomic based educational 'sculpture' in a 3D manner, that aims to describe complex nanosystems such as viruses and vaccines. This might be used to easily educate students, health professional and society, on the concept of complexity, morphology and functionality of viruses and of vaccines of second and third generation. Presentations of the “molecular sculpture” that represents the structure of mRNA vaccines against the SARS-CoV-2 virus took place by Professor of Pharmaceutical Nanotechnology Costas Demetzos at a two-day conference of the foreign language interdepartmental postgraduate program of the National & Kapodistrian University of Athens 'Nanomedicine', June 2022, Athens, as well as in the 3rd Pharmaceutical Conference of Peloponnese, Nafplio, October, 2022 (Photos 1 and 2, respectively). Moreover, the 'molecular sculpture' has been presented in a European workshop, organized by Greek Pharmaceutical Student Federation (GPSF), November, 2022, Athens.

## Background

The atomic 3D 'lego-like' model represents the morphology of a complex system like a virus or a vaccine (**Figure 1**). A complex system is a system containing many interdependent constituents which interact non-linearly. It has numerous interconnections and interactions which are difficult to describe, understand, predict, manage, design, and/or change. A quality of an object with many interwoven elements, aspects, details, or attributes that makes the whole object difficult to understand in a collective sense<sup>1-3</sup>. Complex systems are raised along with scientific and philosophical questions that remain to be understood. Pythagoras of Samos, Greek philosopher referred to the complex systems and in the Universe harmony and their relationship with the human being. The role of complexity, morphology and functionality of complex systems such as lyotropic nanocubic liquid crystals (**Figure 2**) should be taken into consideration for producing new and innovative therapeutic and prophylactic health products and the education of students, health professionals and society should be emerged as the main concern.

To understand how the complexity of a nanosystem is impacted by its internal complexity and morphology and by the complexity of its environment, the interface complexity is emerged as a crucial factor that should be taken into consideration during the evaluation of its effectiveness. The metrics of complexity are very serious and should be carefully evaluated taking into account the number of links, the number of elements, the function and hierarchy of the elements, the information content of the system based on the probability of failure of the nanosystem as it is used in particular microenvironment conditions<sup>5</sup>. The 3D multitasking model that we proposed can be used to educate and to engage in an easy manner the soft skills of students, health professionals and society. Modern education must cover a much broader variety of topics compared to a few decades ago. World challenges in environment, climate and health, requires training experts in two or more core scientific fields, as well as in the con-

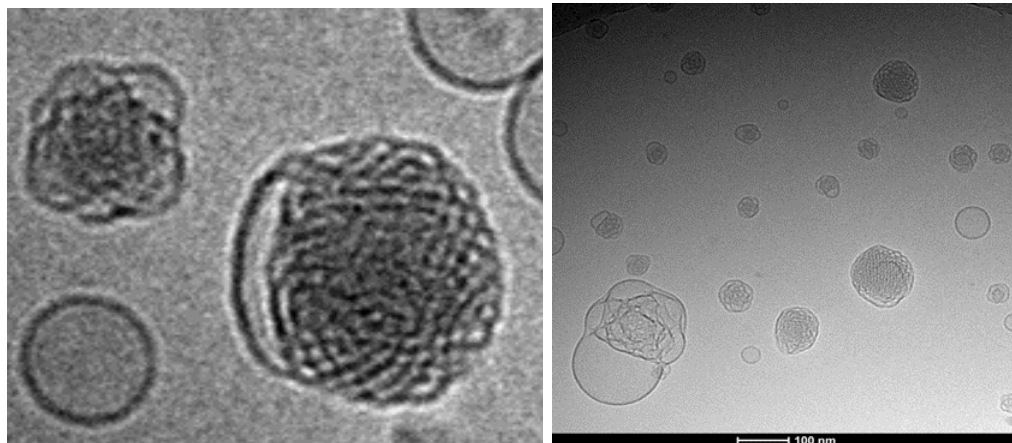


**Figure 1.** Atomic 'sculpture' as 3D model, represents the structure and morphology of vaccines and of viruses. Primarily, Black spheres represent carbon, red spheres represent oxygen, white spheres represent hydrogen, blue spheres represent nitrogen, deep purple spheres represent phosphorus. Each colored sphere represents also molecules like, phospholipids (black), cholesterol (red), genetic bases (blue) polar head group of phospholipids (deep purple). The whole structure represents the morphology of a virus or of a vaccine.

nectivity between these. This "education at the interface" is one of the biggest challenges of the 21st-century academics. We need a new and accurate didactic model that should be evaluated under the lens of the evolution of research and innovation in health sciences. The new didactic model should offer a clear and simple approach to understanding the complexity of nature using the 'lego' concept. Based on the above, we designed and present this 3D 'lego-like' system which represent important bio and artificial features such as the components and complexity of viruses and of vaccines.

The 3D 'Lego-like' multitasking tool could be facilitating the educational process and could be used as:

- A 3D model that describes the complexity, the morphology, and the functionality of a virus: The capsid of a virus is mainly composed of phospholipids representing by using the black spheres in the 3D model. Moreover, cholesterol and the



**Figure 2.** Cryo-Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM) of complex lyotropic nanocubic liquid crystals that can incorporate bioactive molecules or genetic materials for producing Drug Delivery nano Systems or vaccines<sup>4</sup>.

genetic content of virus are presented using red and blue spheres. The decorated surface of a virus with proteins are easily presented by the 3D model while the variants and the mutation process, are easily described. The molecules from which the 3D model consists, (i.e., phospholipids, cholesterol, cationic phospholipids, lipids, ingredients like polyethylene glycol etc) are self-assembled producing complex structures, such as the virus capsid. The uncertainty to project the next variant of a virus is explained by the 3D. The education comes from the clarification of concepts like, complexity, self-assembly, morphology and functionality that are well explained to the audience. However, education becomes more interesting, more engaging, and closer to real life. This 3D model benefits the education process regarding new therapeutic outcomes against viruses avoiding the fear from the audience. The new didactic model that the 3D model proposed, is focus on the continuing and lifelong learning and the utilization of new technologies in higher education, in health professionals and in the society. By incorporating this 3D model in the education process achievements like, active participation of students, health professionals and social partners (i.e., patients) into lifelong and self-learning processes, are become beneficial.

- A 3D model could describe the complexity, the morphology, and the functionality of a mRNA vaccine: Nowadays, we can classify vaccines in three main generations. The first generation contains the vaccines of live-attenuated or inactivated pathogens. Subunit (second-generation) vaccines contain only specific immunogenic domains of the pathogen. The third-generation vaccines do not contain pathogens' antigenic proteins, but part of their genetic material. Such vaccines have recently been approved for human use and many assume that they will bring a revolution in the field of vaccinology. The genetic material is encapsulated into nanoparticles and transferred inside the target host cells<sup>6</sup>. The 3D model describes the second and third generation of vaccines because of its morphological characteristics from which it consists of. The second-generation vaccines are composed of antigenic proteins that are located on the surface of a nanoplatform which is mainly composed of phospholipids, components from which the human cell membrane is consist of. However, it is obvious that this kind of vaccines are composed of biocompatible and biodegradable biomaterials and are safe and effective. All these biomaterials as well as the antigens are easily described on the 3D model based on its morphology and complexity. The third generation of vaccines like those

against SARS-CoV-2 are composed of phospholipids, cholesterol and polyethylenoglycol -a well approved excipient- that are all presented in the 3D model and are easily accessible and described. The genetic material from which the vaccine is consist of, clearly observed into the core of the 3D model representing by the blue spheres decorated by red representing cholesterol which is used to control the fluidity of the phospholipid membrane of the vaccine. However, all the biomaterials from which the second and third generations of vaccines are consist of, are presented into the 3D model. Moreover, difficult concepts like complexity, self-assembly, morphology and functionality are clarified in an easy and comprehensive manner.

## Conclusions

Viruses and artificial bio- elements like vaccines are

complex nanosystems and should be clarified mainly in to the society in order to avoid the fear and increasing the awareness of students, health professionals and society to the evolution of science and technology. The atomic based 3D 'lego-like' model proposed as an innovative and new didactic tool that could:

1. Helps students, professionals, and society to understand the morphology the composition and the behavior of viruses and of vaccines.
2. Includes information and bio and nanotechnological issues such as mutation of viruses, physicochemical properties of vaccines, invisible artificial nanoplatfoms that can carry genetic material etc
3. Engages students, professionals, and society in using an engineering design process
4. Addresses real-world problems like complexity, morphology, and functionality of bio-entities and of artificial bio elements such as medicines, therapeutic products and vaccines.

## References

1. 'Nonextensive entropy. Interdisciplinary applications' Ed. M Gell-Mann and C. Tsallis, Oxford University Press, 2004.
2. Demetzos C. (2022) 'The Voice of Science, the Silence of Nature', Lambert Academic Publishing,.
3. Lucia U., A link between Nano and classical thermodynamics: Dissipation analysis, *Entropy*, 1309-1328, 17, 2015.
4. Chountoulesi M., Pippa N., Chrysin E.D., Forsy A., Trzebicka B., Demetzos C., Cubic lyotropic liquid crystals as drug delivery carriers: Physicochemical and morphological studies. *Int. J. Pharm.* 25, 550 (1-2), 57-70, 2018. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.08.003.
5. A Framework for Quantifying Complexity and Understanding its Sources: Application to two Large-Scale Systems. By Martin P.A.J.Y., <https://dspace.mit.edu/handle/1721.1/32270>.
6. Tsakiri M., Naziris N., Demetzos C. Innovative vaccine platforms against infection diseases: Under the scope of the COVID-19. *Int. J. Pharm.* 15:610:121212, 2021. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.121212. Epub 2021 Oct 20.

## **Presentations of the ‘molecular sculpture’ in the Scientific Community**



*(Photo 1). Presentation by Professor Costas Demetzos the “molecular sculpture” that represents the structure of mRNA vaccines against the SARS-CoV-2 virus, at a two-day conference of the foreign language interdepartmental postgraduate program of EKPA ‘Nanomedicine’, June, Athens, 2022.*



*(Photo 2). Presentation by the Professor of Pharmaceutical Nanotechnology Costas Demetzos the “molecular sculpture” that represents the structure of mRNA vaccines against the SARS-CoV-2 virus for educational reasons. 3rd Pharmaceutical Conference of Peloponnese, October, Nafplio, 2022.*

## ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ - MEETINGS

• **MARCH 9-11, 2023, PATRAS, GREECE**

19th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry (HSMC-19)

<https://helmedchem2023.gr>

• **JUNE 10-13, 2023 | BOSTON, MA, UNITED STATES**

ACSMEDI | EFMC Medicinal Chemistry Frontiers 2023 - Joint Symposium on Medicinal Chemistry

<https://www.medchemfrontiers.org/>

• **JUNE 11-14, 2023, IOANNINA, GREECE**

16TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON APPLIED BIOINORGANIC CHEMISTRY

<https://isabc2023.com/registration/>

• **JULY 2-6 2023 ANKARA, TURKEY**

33rd International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis

<https://pba2023.com/>

• **JULY 5-7, 2023 LILLE, FRANCE**

57th edition of the International Conference on Medicinal Chemistry (RICT 2023).

<https://www.rict2023.org/>

• **JULY 16 - 18 2023 THESSALONIKI, GREECE**

XII Meeting of the Paul Ehrlich PhD NetWork in Medicinal Chemistry

<https://medchem2023.com>

• **SEPTEMBER 4-6, 2023, BELGRADE, SERBIA**

IAPC-10 Meeting

Physico Chemical Methods in Drug Discovery and Development  
And ADMET and DMPK

<https://iapchem.org/index.php/iapc-10-home>

• **SEPTEMBER 3-7, 2023 | ZAGREB, CROATIA**

IX EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry

<https://www.efmc-asmc.org/>

• **SEPTEMBER 7-8, 2023 | ZAGREB, CROATIA**

EFMC-YMCS 2023

10th EFMC Young Medicinal Chemists' Symposium | Anniversary Edition

<https://www.efmc-ymcs.org/>

• **NOVEMBER 16-18, 2023 | BASEL, SWITZERLAND.**

International Symposium on Chemical Biology (EFMC-ISCB)

<https://www.efmc-iscb.org/>