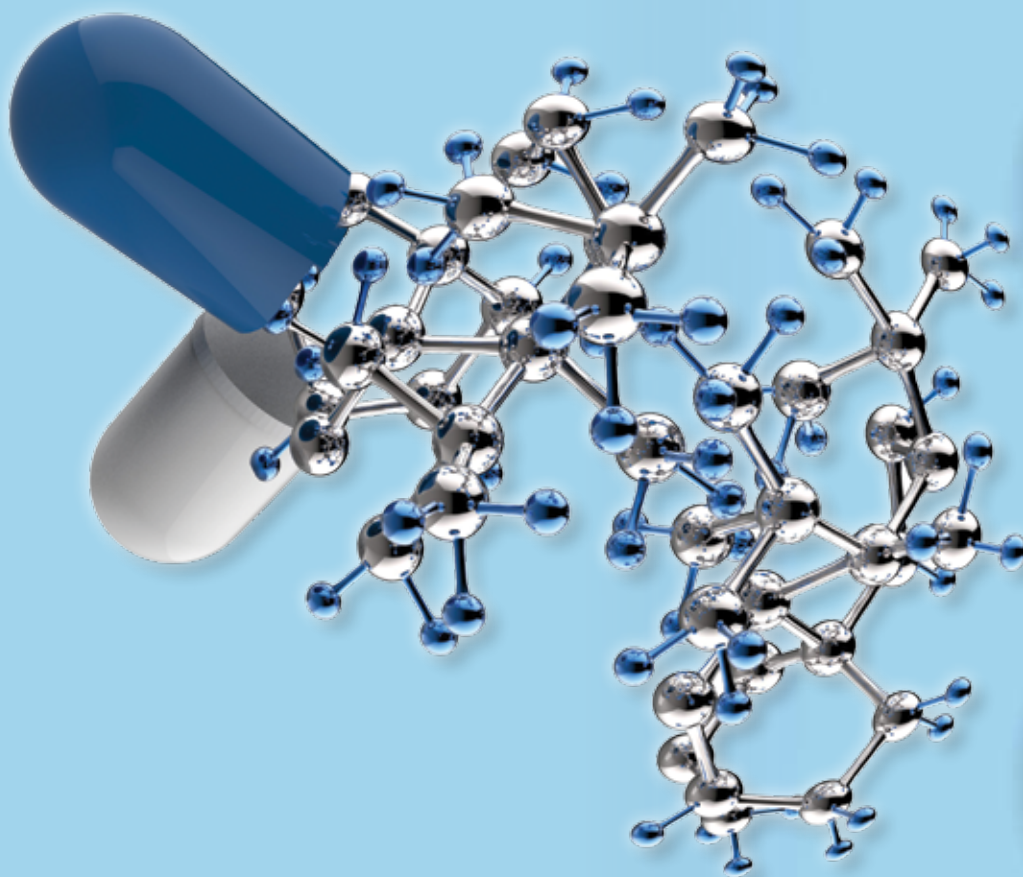


ISSN 1105-4999



ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ PHARMAKEFTIKI

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



ΤΟΜΟΣ 33 • ΤΕΥΧΟΣ I
VOLUME ISSUE

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ - ΜΑΡΤΙΟΣ 2021
JANUARY - MARCH

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ ΜΕ ΘΕΜΑΤΑ

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΟΣ 33, ΤΕΥΧΟΣ Ι,

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ - ΜΑΡΤΙΟΣ 2021

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

Β. Δημόπουλος

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

Αναπλ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Γ. Πάιρας

Αναπλ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Ε. Παντερή

Καθηγήτρια, ΕΚΠΑ

Δ. Ρέκκας

Αναπλ. Καθηγητής, ΕΚΠΑ

PHARMAKEFTIKI

A QUARTERLY EDITION

ON PHARMACEUTICAL SCIENCES' TOPICS

VOLUME 33, ISSUE I,

JANUARY - MARCH 2021

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

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

Associate 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

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**

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

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



ZITA CONGRESS ZITA MEDICAL MANAGEMENT

ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ
ΩΥΩ
ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΥΓΕΙΑ ΟΜΟΡΦΙΑ

ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΥΓΕΙΑ ΟΜΟΡΦΙΑ
ΩΥΩ FORUM

Στηρίζουμε κάθε σας δημιουργική σκέψη & προσπάθεια διάχυσης επιστημονικής γνώσης

- Διοργάνωση συνεδρίων, εκθέσεων, πολιτιστικών εκδηλώσεων και ταξιδίων κινήτρων
- Διαχείριση ιατρικών εταιρειών και οργανισμών
- Website και Ηλεκτρονικό Marketing
- Επιστημονικές Εκδόσεις Περιοδικών
- Χορηγίες
- Γραφιστικό - Δημιουργικό
- Γραμματειακή Υποστήριξη
- Τουρισμός Υγείας
- Νοσοκομειακό Marketing
- Γραφείο Τύπου



www.zita-group.com

Ομήρου 29, Πέτα Σαρωνικού, 190 01, Αττική, Ελλάδα

Τηλ: +30 22994 40962

k.ge@zita-congress.gr, info@zita-congress.gr, info@zita-management.com

Follow us



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ / CONTENTS

Θεραπευτικές Προσεγγίσεις για την Αντιμετώπιση της Ηπατίτιδας Β

Δημήτριος Μοϊάνος, Γεωργία-Μυρτώ Πρίφτη,
Γρηγόρης Ζωίδης 2-29

Το *Portulaca oleracea* είναι θεραπευτικό φυτό; Νεότερα δεδομένα

Ελισάβετ-Φωτεινή Βαρβούνη, Κωνσταντία Γκραίκου,
Γεώργιος Α. Καρίκας, Ιωάννα Χήνουα 30-51

Development and validation of spectrophotometric method for simultaneous estimation of valsartan and atenolol in binary mixtures: application to tablets analysis

Kateryna Peleshok, Olha Poliak, Liubomyr Kryskiw,
Agyemang Fredua Sarpong, Nadiya Zarivna, Dmytro Korobko,
Hryhorii Zahrychuk, Nataliy Horlachuk, Andriy Sverstiuk,
Larysa Levytska, Liliya Logoyda 52-60

Methodological approach to the selection of filtering materials for injectable medicines in polyethylene ampoules

Viacheslav Shevchenko, Svitlana Rolik-Attia,
Yevhen Bezrukavyy 61-70

Εκδηλώσεις 71

Therapeutic Approaches for the Treatment of Hepatitis B

Dimitrios Moianos, Georgia-Myrto Prifti,
Grigoris Zoidis 2-29

Is *Portulaca oleracea* a medicinal plant? Overview of recent data

Elisavet-Foteini Varvounia, Konstantia Graikoua, George A.
Karikasb, Ioanna Chinoua 30-51

Development and validation of spectrophotometric method for simultaneous estimation of valsartan and atenolol in binary mixtures: application to tablets analysis

Kateryna Peleshok, Olha Poliak, Liubomyr Kryskiw,
Agyemang Fredua Sarpong, Nadiya Zarivna, Dmytro Korobko,
Hryhorii Zahrychuk, Nataliy Horlachuk, Andriy Sverstiuk,
Larysa Levytska, Liliya Logoyda 52-60

Methodological approach to the selection of filtering materials for injectable medicines in polyethylene ampoules

Viacheslav Shevchenko, Svitlana Rolik-Attia,
Yevhen Bezrukavyy 61-70

Meetings 71

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, Fax: 22990 66029, E-mail: g.kouloumpis@zitamanagement.com

Θεραπευτικές Προσεγγίσεις για την Αντιμετώπιση της Ηπατίτιδας Β

Δημήτριος Μοϊάнос, Γεωργία-Μυρτώ Πρίφτη, Γρηγόρης Ζωίδης*

Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου, 15771, Αθήνα, Ελλάδα

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:
Ηπατίτιδα Β; HBV;
θεραπεία; αντιϊκά
φάρμακα; νέοι στόχοι
φαρμάκων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Ηπατίτιδα Β συνιστά μια σοβαρή λοίμωξη του ήπατος που οφείλεται στον ιό HBV και ευθύνεται για 800.000 θανάτους ετησίως. Παρά την ύπαρξη ενός εξαιρετικού, ασφαλούς και αποτελεσματικού εμβολίου, αποτελεί ένα τεράστιο πρόβλημα παγκοσμίως ακόμη και σήμερα. Οι σύγχρονες εγκεκριμένες θεραπείες κατά του HBV περιλαμβάνουν παράγωγα ιντερφερόνης και νουκλεοσιδικά ανάλογα. Ωστόσο, αυτές συνήθως δεν επιτυγχάνουν πλήρη αναστολή της αναπαραγωγής του ιού, ούτε εξάλειψη της δεξαμενής του cccD-NA με αποτέλεσμα πολλές φορές να είναι αναγκαία η συνέχιση της θεραπείας εφ' όρου ζωής. Έτσι, η αναζήτηση νέων φαρμάκων και στόχων με τελικό σκοπό την εύρεση μιας «αποτελεσματικής θεραπείας» αποτελεί αντικείμενο εκτενούς επιστημονικής έρευνας διεθνώς. Στο άρθρο αυτό επιχειρείται μια επισκόπηση των μέχρι σήμερα διαθέσιμων θεραπευτικών σχημάτων και παρουσιάζονται τα στάδια εκείνα του κύκλου ζωής του ιού που αποτελούν στόχους για την ανάπτυξη φαρμάκων κατά του HBV. Τέλος, παρουσιάζονται ορισμένα νέα φάρμακα που εμφάνισαν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αποτελέσματα τόσο in vitro όσο και in vivo, αφήνοντας «ανοιχτό παράθυρο» ως προς την είσοδό τους σε κλινικές δοκιμές για την αναστολή του ιού HBV.

***ΣΥΓΓΡΑΦΕΑΣ**
ΑΛΛΗΛΟΓΡΑΦΙΑΣ:
Γρηγόρης Ζωίδης,
zoidis@pharm.uoa.gr

1. Εισαγωγή

Η Ηπατίτιδα Β αποτελεί λοίμωξη του ήπατος που οφείλεται στον ιό HBV (Hepatitis B Virus) της οικογένειας *Hepadnaviridae* και μεταδίδεται μέσω του αίματος (κοινής χρήσης ενδοφλέβιων βελόνων από τοξικομανείς ή από την έγκυο μητέρα στο έμβρυο) ή των σπερματικών υγρών (για παράδειγμα μέσω σεξουαλικής επαφής)¹. Είναι είτε οξεία είτε χρόνια και μπορεί να οδηγήσει ακόμα και στο θά-

νατο, αφού αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες κίρρωσης και καρκίνου του ήπατος. Σύμφωνα με δεδομένα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ. – W.H.O.: World Health Organization), ο ιός HBV προκάλεσε 887.000 θανάτους το 2015², ενώ εκτιμάται πως πάνω από 250 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως ζουν με χρόνια Ηπατίτιδα Β (CHB: Chronic Hepatitis B), με το μεγαλύτερο επιδημιολογικό φορτίο να εντοπίζεται στις περιοχές της Αφρικής και της Ανατολικής Ασίας³.

Η πρώτη αναφορά στην ηπατίτιδα Β έγινε το 1965 από τον νομπελίστα ιατρό και γενετιστή Baruch Samuel Blumberg, ο οποίος ανακάλυψε στον ορό του αίματος ιθαγενών της Αυστραλίας το αντιγόνο επιφάνειας του ιού HBV (HBsAg: Hepatitis B Surface Antigen), το οποίο ονόμασε αρχικά, για το λόγο αυτό, «Αντιγόνο Αυστραλίας» ("Australia Antigen", AusAg)⁴. Μετέπειτα, το αντιγόνο αυτό συσχετίστηκε με την ηπατίτιδα⁵, προτού διαπιστωθεί τελικά η ύπαρξη δύο ξεχωριστών τύπων ηπατίτιδας (Α και Β) για πρώτη φορά το 1967⁶.

Το αντιγόνο επιφάνειας HBsAg είναι εκείνο που εμπλέκεται κυρίως στην λοίμωξη της ηπατίτιδας Β. Έτσι, «αποτελεσματική θεραπεία» ορίζεται ως η επίτευξη σταθερά μειωμένων επίπεδων HBsAg καθώς και ιικού DNA (HBV DNA) στην κυκλοφορία, που μπορεί να συνοδεύονται από ορομετατροπή, δηλαδή εμφάνιση στον ορό του αίματος αντισωμάτων anti-HBs (Hepatitis B surface antibody) σε ανιχνεύσιμα επίπεδα⁷. Η μείωση αυτή σχετίζεται με βελτίωση της κλινικής εικόνας του ασθενούς και σημαντικά μειωμένη πιθανότητα επανεμφάνισης της νόσου. Ένα ακόμα αντιγόνο του ιού, που παρατηρήθηκε αργότερα, είναι το «Αντιγόνο e» (HBeAg: Hepatitis B e Antigen), το οποίο είναι μία πρωτεΐνη στον εσωτερικό πυρήνα του ιού. Οι ασθενείς που διαθέτουν το αντιγόνο αυτό καλούνται HBeAg-θετικοί (HBeAg-positive), ενώ αντίστοιχα αυτοί που δεν το διαθέτουν καλούνται HBeAg-αρνητικοί (HBeAg-negative)⁸.

Παρά την ύπαρξη ενός ασφαλούς και αποτελεσματικού εμβολίου², δεν έχει επιτευχθεί μέχρι και σήμερα η εύρεση θεραπευτικού σχήματος που να καταστέλλει ικανοποιητικά τον ιό HBV. Στο άρθρο αυτό, παρουσιάζεται ο κύκλος ζωής του ιού HBV, συνοψίζονται οι ήδη υπάρχουσες θεραπείες κατά της Ηπατίτιδας Β και τα σημαντικά τους μειονεκτήματα, καθώς και οι νέοι φαρμακολογικοί στόχοι που αποτελούν σήμερα αντικείμενο εκτενούς επιστημονικής μελέτης, προκειμένου να οδηγήσουν στο φάρμακο που θα θεραπεύσει πλήρως την ασθένεια.

2. Ο κύκλος ζωής του ιού HBV

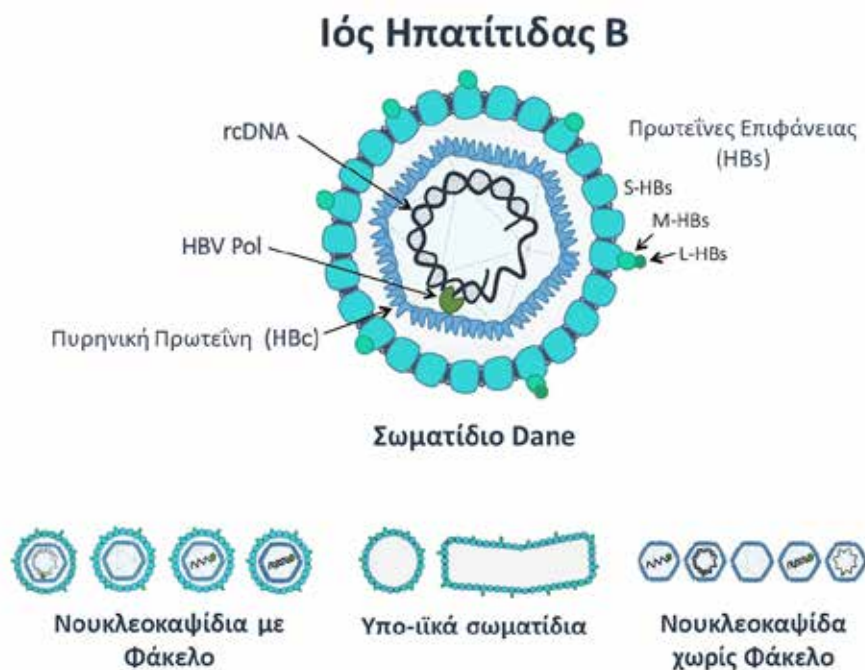
2.1 Δομή ιικού σωματιδίου – γενετικό υλικό

Τα σωματίδια του ιού HBV, γνωστά και ως σωμα-

τίδια Dane (Dane particles)⁹, έχουν διάμετρο 42nm και είναι εκείνα που είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση της λοίμωξης¹⁰. Αποτελούνται από μια εξωτερική λιπιδική μεμβράνη (φάκελος-envelope) με τους τρεις τύπους αντιγόνων επιφάνειας του ιού (HBsAg ή απλά HBs) - μικρά (small: S-HBs), μεσαία (middle: M-HBs) και μεγάλα (large: L-HBs) - η οποία περιβάλλει το καψίδιο του ιού εντός του οποίου βρίσκονται το ιϊκό DNA και η ιϊκή πολυμεράση (**Εικόνα 1**). Το γενετικό υλικό του HBV είναι μερικώς δίκλωνο, κυκλικό DNA (relaxed circular DNA: rcDNA) μήκους περίπου 3.200 ζευγών βάσεων (3,2 kb). Η μεγαλύτερη από τις δυο αλυσίδες καλείται μη κωδική ή «αρνητική» (-) αλυσίδα και είναι συμπληρωματική με το ιϊκό mRNA, ενώ η μικρότερη κωδική ή «θετική» (+) αλυσίδα αντιστοιχεί (**Εικόνα 2**)¹¹. Η (-) αλυσίδα περιλαμβάνει 4 επικαλυπτόμενα γονίδια: C, X, P και S. Το γονίδιο S κωδικοποιεί την πρωτεΐνη επιφάνειας HBsAg και περιλαμβάνει 3 διαφορετικές αλληλουχίες (ORFs: Open Reading Frames) που αναγνωρίζει η πολυμεράση (ORF Pre-S1, ORF Pre-S2, ORF Pre-S) για να ξεκινήσει τη μεταγραφή και έτσι προκύπτουν οι 3 διαφορετικοί υποτύποι HBsAg (S-, M-, L-HBsAg). Το γονίδιο C κωδικοποιεί την πυρηνική πρωτεΐνη HBcAg και το αντιγόνο-e (HBeAg), το γονίδιο P την ιϊκή DNA πολυμεράση και το γονίδιο X την πρωτεΐνη X (HBX)¹⁰.

2.2 Είσοδος

Ο κύκλος ζωής του ιού της ηπατίτιδας Β περιλαμβάνει πολλαπλά στάδια, το πρώτο εκ των οποίων είναι η είσοδος του ιού HBV ή αλλιώς των Dane σωματιδίων στα ηπατοκύτταρα του ξενιστή. Αρχικά, ο ιός προσκολλάται στην κυτταρική επιφάνεια του ξενιστή μέσω δέσμευσης του μικρού αντιγόνου επιφάνειας (Small HBsAg ή S-HBsAg) σε παράγοντες που περιλαμβάνουν πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαρίνης (HSPGs), όπως η γλυπικάνη 5 με μη ειδικό και χαμηλής συγγένειας τρόπο, και στη συνέχεια αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς του πιο συγκεκριμένα και με υψηλή συγγένεια. Παράλληλα, η σύνδεση του μεγάλου αντιγόνου επιφάνειας (Large HBsAg ή L-HBsAg) στον υποδοχέα εισόδου του ιού HBV, NTCP ή πολυπεπτίδιο συμμεταφορέα ταυροχολι-



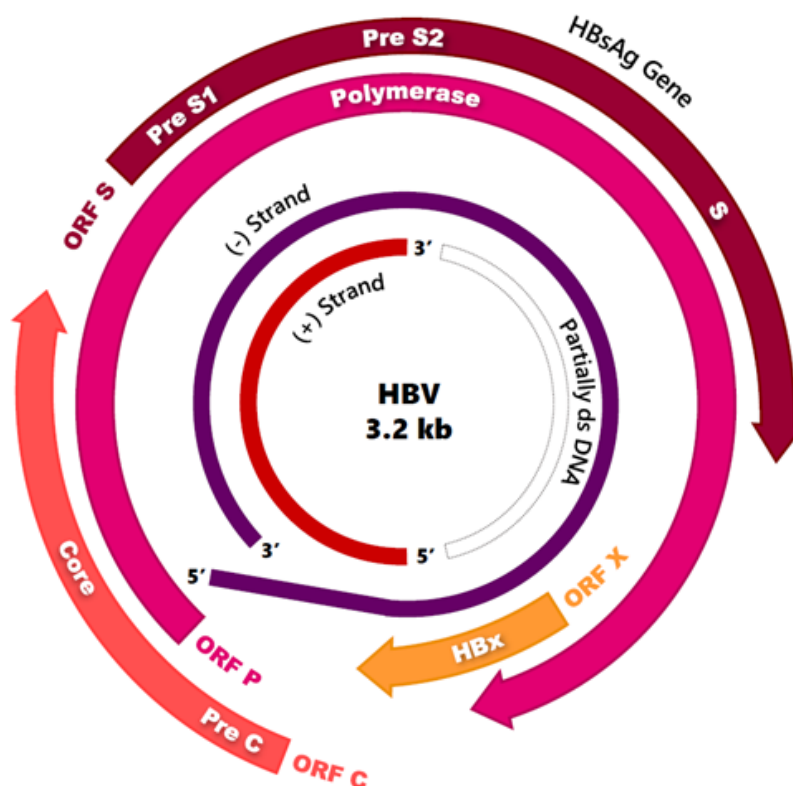
Εικόνα 1: Το σωματίδιο του ιού HBV ή αλλιώς Σωματίδιο Dane (επάνω), σωματίδια που δεν μπορούν να προκαλέσουν μόλυνση όπως νουκλεοκαψίδια με φάκελο που περιέχουν RNA, άδειοι ιϊκοί φάκελοι, νουκλεοκαψίδια χωρίς φάκελο (κάτω) (τροποποίηση από την παραπομπή [10]).

κού νατρίου σηματοδοτεί την είσοδο του ιού στο κύτταρο του ξενιστή. Το NTCP εκφράζεται ειδικά στο ήπαρ και σε αρχικό επίπεδο λειτουργεί για την πρόσληψη χολικών αλάτων στα ηπατοκύτταρα και ύστερα αναγνωρίστηκε ως υποδοχέας εισόδου του HBV και αργότερα και του HDV¹². Οι αλληλεπιδράσεις ιού-υποδοχέα θεωρείται ότι πυροδοτούν την είσοδο του ιού στα κύτταρα με μηχανισμό ενδοκυττάρωσης. Πρόσφατες μελέτες διαπίστωσαν ότι ένας υποδοχέας κινάσης Τυροσίνης, ο υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), ενεργοποιεί την είσοδο του ιού HBV μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασής του με το NTCP¹³. Το τελευταίο, λόγω της πολύπλοκης δομής του, έχει την δυνατότητα του ολιγομερισμού, κατάσταση η οποία τροποποιεί, αναλόγως σε τι στάδιο βρίσκεται, την ικανότητά του να μεσολαβεί στην είσοδο του ιού στο κύτταρο. Η είσοδος σε κυστίδια πιστεύεται ότι προκαλεί σύντηξη μεταξύ του ιϊκού περιβλήματος και της κυτ-

ταρικής μεμβράνης του κυττάρου-ξενιστή, όμως ο ακριβής μηχανισμός είναι ακόμα υπό διερεύνηση. Το εισερχόμενο στο κυτταρόπλασμα νουκλεοκαψίδιο, περιλαμβάνοντας και το rcDNA που αποτελεί το ιϊκό DNA, κατευθύνεται στον πυρήνα με τη βοήθεια των μικροσωληνίσκων και εισέρχεται στον πυρήνα μέσω του συμπλέγματος των πυρηνικών πόρων^{10,11}.

2.3 Δημιουργία - Διατήρηση cccDNA

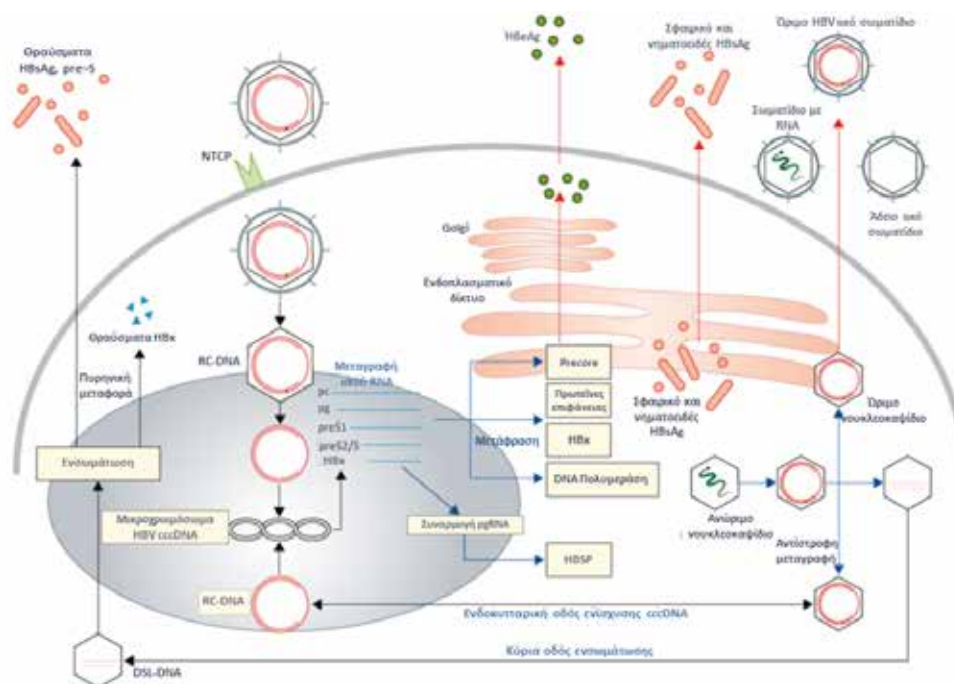
Στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή, το rcDNA του ιού HBV τροποποιείται από κυτταρικούς παράγοντες¹⁴. Η ιϊκή πολυμεράση συνδέεται στην τελική περιττή αλληλουχία στο 5' άκρο της μεγαλύτερης εκ των δύο αλυσίδων του δίκλωνου rcDNA, της «αρνητικής, (-)» και ο RNA εκκινητής (primer) που είναι ένα ολιγονουκλεοτίδιο RNA, προσκολλάται στο 5' άκρο της «θετικής, (+)» εκ των δύο αλυσίδων του δίκλωνου rcDNA. Όταν, λοιπόν, αυτά απομα-



Εικόνα 2: Το γονιδίωμα του ιού HBV: μερικώς δίκλωνο κυκλικό DNA (rcDNA: relaxed circular DNA) με 4 επικαλυπτόμενα γονίδια.

κρυνθούν, τα κενά και στους δύο κλώνους γεμίζονται με τη βοήθεια ορισμένων ενζύμων, όπως οι DNA πολυμεράσες (κ και α), οι DNA λιγάσες (LIG1 και LIG3) και οι τοποϊσομεράσες I και II (TOP1 και TOP2) και κυκλώνουν για να δημιουργήσουν το cccDNA, που ονομάζεται covalently closed circular DNA (10). Έχουν αναφερθεί αρκετοί παράγοντες που εμπλέκονται στη διαδικασία σχηματισμού του cccDNA, όπως ένα ένζυμο επιδιόρθωσης DNA, η φωσφοδιεστεράση 2 τυροσουλίου-DNA (TDP2), η οποία θεωρείται ότι διασπά το φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ πολυμεράσης και rcDNA σε μια δοκιμασία *in vitro*^{15, 16}. Η συνάφεια του ενζύμου αυτού όμως με το σχηματισμό cccDNA παραμένει αμφιλεγόμενη και είναι υπό διερεύνηση. Η ενδονουκλεάση 1 (FEN1) είναι ένας ακόμη παράγοντας που αναφέρεται ότι διασπά τη δομή πτερυγίου στο 5' άκρο της

αρνητικής (-) αλυσίδας λόγω του ότι εμπλέκεται στην αναπαραγωγή και επισκευή του DNA του ξενιστή. Η ενδονουκλεάση FEN1 έχει μία χαρακτηριστική ειδική δομή πτερυγίου, γι' αυτό και δρά με αυτό τον μηχανισμό. Αν και παραμένει άγνωστος ο τρόπος και το σημείο όπου διατηρείται το cccDNA στον πυρήνα, εκείνο βρίσκεται επισωματικά αλλά είναι εγγενώς σταθερό και γι' αυτό λειτουργεί ως πρότυπο για την μακροπρόθεσμη αντιγραφή του ιού. Μια πρόσφατη ανάλυση έδειξε ότι ο χρόνος ημιζωής του cccDNA είναι περίπου 40 ημέρες σε κύτταρα HepG2 (αποτελούν σειρά ηπατικών κυττάρων) που υπερεκφράζουν το πολυπεπτίδιο του συμεταφορέα ταυροχολικού νατρίου (NTCP)⁸. Βέβαια, στο ηπατικό περιβάλλον ο χρόνος ημιζωής του cccDNA μπορεί να είναι και μεγαλύτερος, καθώς έχει εκτιμηθεί ότι σε ανθρώπους που νοσούν από ηπατίτιδα Β, ο



Εικόνα 3: Ο κύκλος ζωής του ιού HBV. NTCP: sodium-taurocholate co-transporting polypeptide, rc-DNA: relaxed circular DNA, cccDNA:

covalently closed circular DNA, pcRNA: precore RNA, HBx: Hepatitis B x protein, pgRNA: pregenomic RNA, HBsAg: Hepatitis B surface antigen, HBeAg:

Hepatitis B e antigen, DSL-DNA: double-stranded linear DNA, HBSP:

Hepatitis B spliced protein(τροποποίηση από την παραπομπή [80]).

χρόνος ημιζωής του cccDNA φτάνει τους 9 μήνες. Οι ανοσοαποκρίσεις, καθώς και η διέγερση της κυτοκίνης παρατηρήθηκε ότι αποτελούν σημαντικά στάδια στη συντήρηση του cccDNA. Τη σταθερότητα του cccDNA φάνηκε να επηρεάζουν αρκετοί παράγοντες, όπως μια απαμινάση κυτιδίνης (πρωτεΐνη, σύμπλοκο επεξεργασίας της απολιποπρωτεΐνης B 3, APOBEC3). Η αποικοδόμηση της APOBEC3A και της APOBEC3B ρυθμίζει τη σταθερότητα του cccDNA και μπορεί να προκληθεί από ένα ένζυμο σύζευξης της ουμπικιτίνης E2 L3 (UBE2L3) (10). Σε αυτό το στάδιο του κύκλου ζωής του ιού HBV πραγματοποιείται η μετατροπή του rcDNA σε cccDNA που χρησιμεύει τελικά ως πρότυπο για ιϊκή μεταγραφή¹¹.

Εκτός από τον σχηματισμό και τη συντήρηση cccDNA, ένα μέρος του εισερχόμενου HBV DNA ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή. Μία πρό-

σφατη μελέτη κυτταρικής καλλιέργειας έδειξε ότι η ενσωμάτωση αυτή συμβαίνει γρήγορα, εντός μίας εβδομάδας μετά τη μόλυνση από τον ιό HBV¹⁷. Το ενσωματωμένο HBV DNA δεν έχει τη δυνατότητα αντιγραφής, αλλά μπορεί να λειτουργήσει ως πρότυπο για την παραγωγή του αντιγόνου HBs ή HBsAg, το οποίο πιστεύεται ότι σχετίζεται με ανοσολογική ανοχή ειδική για HBV και την ανάπτυξη παθολογικής σχετιζόμενης με τον HBV¹⁰.

2.4 Μεταγραφή – Σχηματισμός νουκλεοκαψιδίου

Το cccDNA λειτουργεί ως πρότυπο για τη σύνθεση του ιϊκού mRNA¹⁸, χρησιμοποιώντας την ανθρωπίνη RNA πολυμεράση II του κυττάρου-ξενιστή. Τα RNA που προκύπτουν από τη μεταγραφή είναι: το pregenomic RNA (pgRNA, από το οποίο προκύ-

πτουν η πυρηνική πρωτεΐνη HBcAg και η ιϊκή DNA πολυμεράση), το pre-core mRNA (μεταφράζεται στο αντιγόνο-e HBeAg, γνωστό και ως pre-core protein), το μικρό, μεσαίο και μεγάλο HBsAg mRNA (τα οποία μεταφράζονται αντίστοιχα σε S-HBsAg, M-HBsAg και L-HBsAg) και το x mRNA (το οποίο μεταφράζεται στην πρωτεΐνη HBx)¹⁹. Πλήθος παραγόντων συμμετέχουν στη διαδικασία της μεταγραφής^{11,18}. Ιδιαίτερα ουσιώδης φαίνεται να είναι και ο ρόλος της πρωτεΐνης HBx, καθώς απενεργοποιεί το σύμπλοκο Smc5/6²⁰ (structural maintenance of chromosomes complex) - το οποίο απουσία της HBx αναστέλλει τη μεταγραφή του cccDNA - ενώ είναι απαραίτητη συνολικά στη διαδικασία αναπαραγωγής του ιού και τη διατήρηση της λοίμωξης^{21,22}.

Το παραγόμενο από την μεταγραφή pgRNA συνδέεται με την ιϊκή DNA πολυμεράση μέσω μιας αλληλουχίας στο 5' άκρο του, σχηματίζοντας το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο RNP (pgRNA-polymerase ribonucleoprotein complex), το οποίο περικλείεται από μια πυρηνική πρωτεΐνη την HBcAg σχηματίζοντας πρώιμα νουκλεοκαψίδια. Η DNA πολυμεράση στη συνέχεια χρησιμοποιώντας ως πρότυπο το pgRNA καταλύει τη σύνθεση της (-) αλυσίδας του rcDNA, η οποία με τη σειρά της χρησιμεύει ως πρότυπο για τη σύνθεση της (+) αλυσίδας και έτσι σχηματίζονται ώριμα DNA νουκλεοκαψίδια¹¹. Η πολυμεράση του ιού HBV έχει διπλό ρόλο²³, αφού εκτός από αντίστροφη μεταγραφάση αποτελεί και την ριβονουκλεάση H (RNaseH: ribonuclease H) του, απομακρύνοντας την πρότυπη αλυσίδα του pgRNA κατά τη σύνθεση της (-) αλυσίδας^{10,24}.

Τα ώριμα νουκλεοκαψίδια, στη συνέχεια, είτε περικλείονται από φάκελο αποτελούμενο από HBsAg και εξέρχονται του ηπατοκυττάρου, ώστε να μολύνουν νέα κύτταρα, είτε εισέρχονται ξανά στον πυρήνα ώστε να ανακυκλωθεί η δεξαμενή του cccDNA. Αυτή η ενδοκυτταρική ανακύκλωση η οποία διατηρεί τη δεξαμενή του cccDNA στον πυρήνα του ηπατοκυττάρου αποτελεί έναν από τους παράγοντες που καθιστούν τόσο δύσκολη την αποτελεσματική θεραπεία της νόσου. Από το ηπατοκύτταρο εξέρχονται επίσης μικρότερου μεγέθους σωματίδια¹⁰ όπως άδειοι ιϊκοί φάκελοι χωρίς νουκλεοκαψίδιο στο εσωτερικό τους (subviral particles), νουκλεοκαψί-

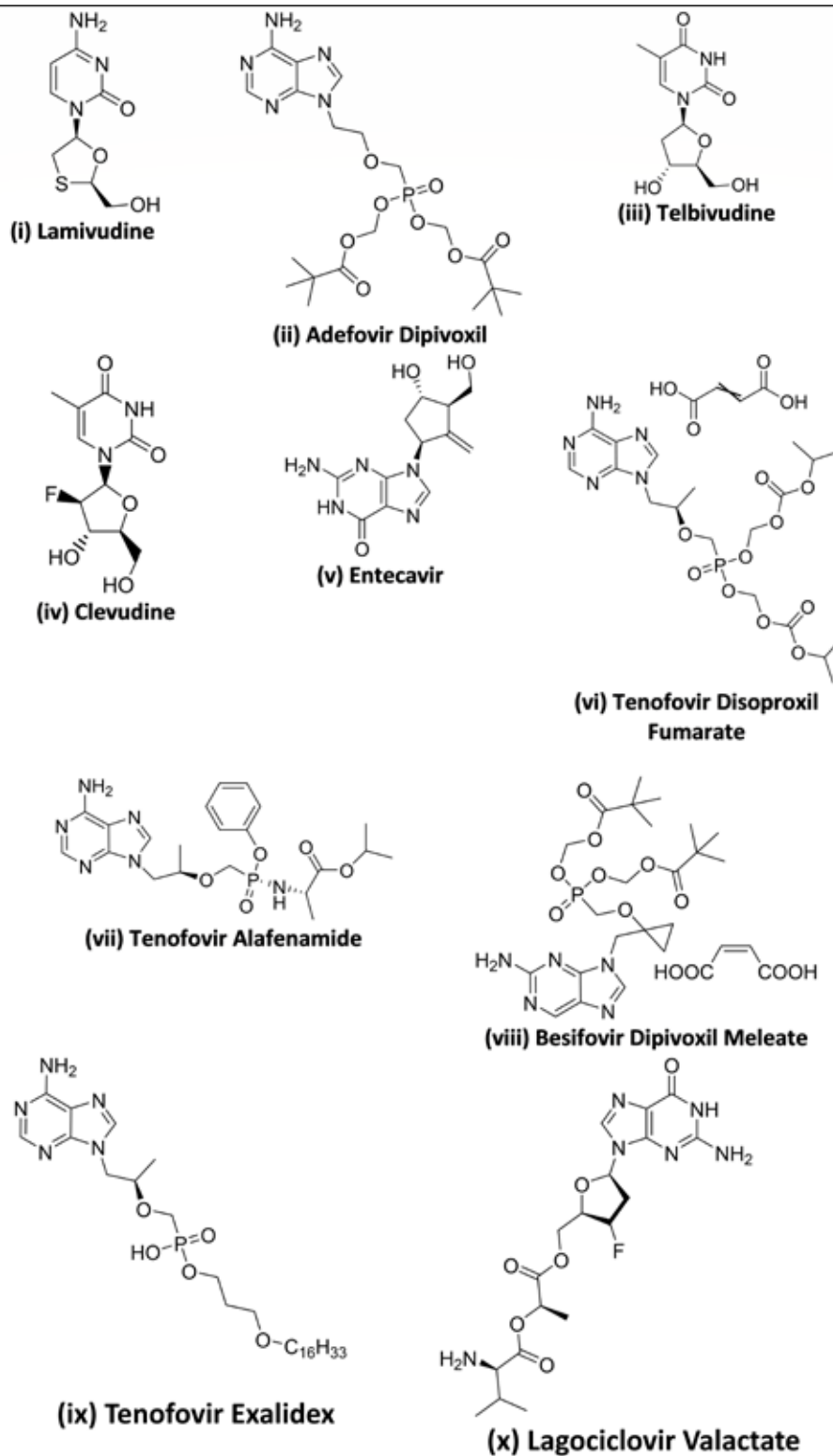
δια με φάκελο που περιέχουν RNA καθώς και νουκλεοκαψίδια χωρίς φάκελο να τα περικλείει (naked nucleocapsids) (**Εικόνα 1**), τα οποία δεν έχουν την ικανότητα να μολύνουν άλλα κύτταρα²⁵ (**Εικόνα 3**).

3. Εγκεκριμένες θεραπείες

Δύο κατηγορίες θεραπειών είναι σήμερα διαθέσιμες για την αντιμετώπιση της Ηπατίτιδας Β, τα παράγωγα ιντερφερόνης (IFN) και τα νουκλεοσιδικά ή νουκλεοτιδικά ανάλογα (nucleos(t)ide analogues: NAs ή nucleos(t)ide compounds: NUCs). Η ιντερφερόνη α (IFN-α) έλαβε έγκριση για πρώτη φορά το 1991²⁶, ωστόσο η προσθήκη αλυσίδων πολυαιθυλενογλυκόλης στο μόριό της βελτίωσε σημαντικά τα χαρακτηριστικά της και έτσι αντικαταστάθηκε το 2005 από την PEG-IFN-α. Η τελευταία είναι διαθέσιμη σήμερα σε δυο μορφές, PEG-IFN-α2a (Pegasys®, Roche) και PEG-IFN-α2b (Pegintron®, Merck), παρουσιάζοντας καλύτερες φαρμακοκινητικές ιδιότητες και αυξημένο χρόνο ημιζωής, καθιστώντας δυνατή τη χορήγησή της μια φορά την εβδομάδα²⁷. Χορηγείται με υποδόρια ένεση και η δράση της είναι, τόσο άμεση αντιϊκή²⁸⁻³⁰, όσο και ανοσοτροποποιητική³¹. Ένας χρόνος θεραπείας με PEF-IFN οδηγεί σε ορομετατροπή HBeAg στο 29-32% των ασθενών και σε σταθερά μειωμένα επίπεδα HBsAg στο 3-7% των ασθενών, 24 εβδομάδες μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας¹. Εντούτοις, εμφανίζει αρκετές ανεπιθύμητες ενέργειες όπως συμπτώματα γρίπης, κόπωση, μυελοκαταστολή και κατάθλιψη και αντενδείκνυται σε ασθενείς με ηπατική ανεπάρκεια και κίρρωση ήπατος^{1,32}. Οι παραπάνω καθιστούν τη θεραπεία με PEG-IFN-α ιδιαίτερα δύσκολη οδηγώντας, μαζί με το γεγονός πως χορηγείται υποδόρια, σε μειωμένη συμμόρφωση των ασθενών.

Η δεύτερη κατηγορία φαρμάκων αποτελείται από τα Νουκλεοσιδικά Ανάλογα (NA) (**Πίνακας 1**) που αναστέλλουν τη δραστηριότητα του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase) του HBV. Η δραστητική μορφή των φαρμάκων αυτών είναι η τριφωσφορική, που προκύπτει κατόπιν φωσφορυλίωσης τους από κυτταρικές κινάσες. Τα τριφωσφορικά νουκλεοσιδικά ανάλογα είναι υποστρώματα για την αντίστροφη μεταγραφάση.

Πίνακας 1: Δομές Νουκλεοσιδικών Αναλόγων που έχουν λάβει έγκριση για τη θεραπεία της Ηπατίτιδας Β.



Κατά τη διάρκεια της αντίστροφης μεταγραφής παίζουν το ρόλο των τερματιστών των αλυσίδων και εμποδίζουν τη σύνθεση τόσο της αρνητικής (-) όσο και της θετικής (+) σε πολικότητα αλυσίδας του δίκλωνου DNA του HBV. Χορηγούνται *per os* με τη φαρμακοτεχνική μορφή του δισκίου, είτε στη δραστική τους μορφή είτε ως προφάρμακα, έχουν ευνοϊκή φαρμακοκινητική χωρίς γενικά περιορισμούς διατροφής, περιορισμένη αλληλεπίδραση φαρμάκου-φαρμάκου και είναι χαμηλού βάρους δισκία. Τα NA μπορούν να καταστέλλουν την ιαίμια σε κλινικά μη ανιχνεύσιμα επίπεδα σε έως 76% των HBeAg (+) ασθενών και σε έως και 93% των HBeAg (-) ασθενών μετά από ένα έτος θεραπείας. Ο γονότυπος του HBV μπορεί να επηρεάσει την απόκριση στα NA, με τους ασθενείς γονότυπου A και D να είναι πολύ πιο πιθανό να επιτύχουν θεραπεία από τους ασθενείς του γονότυπου B και C όταν λαμβάνουν ανάλογα του tenofovir³³. Δυστυχώς, στους τελευταίους, το ποσοστό λειτουργικής θεραπείας τους είναι <10% λόγω εν μέρει ανεπαρκούς αποτελεσματικότητας στόχευσης ήπατος ή/και χαμηλού φραγμού στην αντίσταση. Η θεραπεία με NA είναι επομένως ουσιαστικά δια βίου, αν και ο τερματισμός αυτών καθίσταται εφικτός σε ορισμένους HBeAg (-) ασθενείς. Οκτώ NA έχουν εγκριθεί κατά του ιού HBV, από τα οποία τα τρέχοντα συνιστώμενα είναι το entecavir και τα δύο προφάρμακα του tenofovir, το disoproxil και το alafenamide⁰.

Το πρώτο NA που φάνηκε να είναι αποδοτικό είναι το **lamivudine** (λαμβουδίνη, 3 TC, LMV, Epirivir®, Zeffix®, Heptodin®, Hepitec®), το οποίο εγκρίθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής το 1998³⁴ και λαμβάνεται μία φορά την ημέρα, με λίγες παρενέργειες, για τουλάχιστον ένα έτος ή περισσότερο. Γενικά δεν χρησιμοποιείται ευρέως, επειδή είναι λιγότερο ισχυρό από τα νεότερα φάρμακα και οι περισσότεροι ασθενείς αναπτύσσουν ανοχή σε αυτό μέσα σε ένα ή δύο χρόνια²⁶. Δεδομένα από μια πολυκεντρική τυχαioποιημένη ελεγχόμενη δοκιμή (Randomized controlled trial - RCT) έδειξαν ότι η θεραπεία με lamivudine για διάμεση διάρκεια 32,4 μηνών μείωσε τη συχνότητα εμφάνισης ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC)³⁵. Ακόμη και σε ασθενείς με κίρρωση του ήπατος, η θεραπεία με

lamivudine έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τον κίνδυνο HCC, όπως φαίνεται σε αναδρομική ανάλυση για 238 ασθενείς³⁶. Η βέλτιστη διάρκεια της θεραπείας με αυτό το φάρμακο έχει γίνει θέμα συζήτησης και μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Kwon *et al.* το 2013³⁷ προτείνει ότι η θεραπεία σε ασθενείς που δεν εμφανίζουν μεταλλάξεις στην περιοχή YMDD (τυροσίνη-μεθειονίνη-ασπαρτάμη-ασπαρτάμη) μπορεί να συνεχιστεί για πάνω από πέντε χρόνια έως ότου επιτευχθεί πλήρης απώλεια HBsAg. Ωστόσο, η διατηρούμενη ιϊκή απόκριση που επιτεύχθηκε με lamivudine για περισσότερα από πέντε χρόνια δεν έδειξε μείωση της συχνότητας εμφάνισης HCC. Από την άλλη πλευρά, οι Eun *et al.*³⁸ βρήκαν ότι η παρατεταμένη ιϊκή καταστολή με μακροχρόνια θεραπεία με lamivudine μειώνει τη συχνότητα εμφάνισης HCC. Παρόλα αυτά, συχνή είναι η ανάπτυξη αντίστασης που συνήθως οφείλεται σε μεταλλάξεις στο ιϊκό DNA³⁹. Η θεραπεία με lamivudine έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τη σχετική με το ήπαρ θνησιμότητα σε ασθενείς με HBV ακόμη και σε ασθενείς με ταυτόχρονη μόλυνση με ιό ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV)³⁹.

Το επόμενο νουκλεοσιδικό ανάλογο που έλαβε έγκριση το 2002 ήταν το **adefovir dipivoxil** (Αδεφοβίρη διπιβοξίλη, bis (POM) PMEA, ADV, Hepsera® ή Preveon®)³⁴, το οποίο λαμβάνεται μία φορά την ημέρα για τουλάχιστον ένα έτος ή περισσότερο και εμφάνισε λίγες παρενέργειες. Θεωρείται επιλογή θεραπείας δεύτερης γραμμής και οι ασθενείς πρέπει να παρακολουθούνται τακτικά ως προς τη νεφρική τους λειτουργία²⁶. Αποτελεί φάρμακο εκλογής για ασθενείς με ανοχή στο lamivudine. Παρόλο που η θεραπεία μόνο με adefovir έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματική για ασθενείς με HBV και η μακροχρόνια χρήση της έχει αποδειχθεί ότι μειώνει το ποσοστό της ίνωσης, η εμφάνιση αντίστασης κατά τη μακροχρόνια χρήση της είναι μεγάλος περιοριστικός παράγοντας. Ο συνδυασμός adefovir και lamivudine σε ασθενείς με χρόνια HBV και αντίσταση στο lamivudine έχει δείξει μεγάλη επιτυχία και χαμηλότερο ποσοστό μεταλλάξεων που μπορεί να οδηγήσει σε αντίσταση στο adefovir. Επιπλέον, η τριετής παρακολούθηση έδειξε 12% κίνδυνο εμφάνισης HCC, ενώ το 73% των περιλαμβανόμενων

ασθενών είχαν κίρρωση κατά την έναρξη³⁹.

Το **entecavir** (BMS-200475-01, ETV, Baraclude®) αναγνωρίστηκε ως σημαντικό ανάλογο αυτής της κατηγορίας το 2005³⁴. Λαμβάνεται μία φορά την ημέρα για τουλάχιστον ένα έτος ή περισσότερο και εμφανίζει λίγες παρενέργειες. Θεωρείται θεραπεία πρώτης γραμμής με εξαιρετικό προφίλ αντίστασης²⁶. Έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τη συχνότητα εμφάνισης HCC. Ωστόσο, μια αναδρομική ανάλυση 875 χρόνιων HBV ασθενών που έλαβαν μονοθεραπεία με entecavir έδειξε ότι το 43% των ασθενών που έλαβαν αγωγή δεν πέτυχαν διατηρημένη ιολογική ύφεση (maintained virological remission – MVR: σταθερά μη ανιχνεύσιμο DNA HBV<12 IU/mL) και διέτρεχαν, ειδικά αν συνυπήρχε κίρρωση, υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης HCC⁴⁰. Κατά τη χρήση συνιστάται παρακολούθηση της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης του ορού (ALT: ένα ένζυμο που απελευθερώνεται από τα νεκρά ηπατοκύτταρα) στους 6 και 12 μήνες κατά τη διάρκεια της θεραπείας με entecavir. Φυσιολογική τιμή ALT στους 6 και 12 μήνες βρέθηκε να συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο για την ανάπτυξη HCC. Επιπλέον, προτάθηκε η παρακολούθηση της άλφα-φετοπρωτεΐνης του ορού³⁹.

Το **telbivudine** (τελμπιβουδίνη, LdT, TBV, Tyzeka® or Sebivo®) εγκρίθηκε το 2006, λαμβάνεται μία φορά την ημέρα για τουλάχιστον ένα έτος ή περισσότερο, συνδέεται η χρήση του με λίγες παρενέργειες, και αποτελεί επιλογή θεραπείας δεύτερης γραμμής²⁶. Τα αποτελέσματα των RCTs έδειξαν ότι το telbivudine ήταν ανώτερο από το lamivudine, καθώς και του entecavir και του adefovir, στη θεραπεία ασθενών με χρόνια HBV ανεξάρτητα από την κατάσταση του αντιγόνου HBeAg⁴¹⁻⁴³. Το 2013, οι Tsai *et al.*⁴⁴ διαπίστωσαν ότι η αθροιστική συχνότητα εμφάνισης HCC σε ασθενείς που έλαβαν telbivudine ήταν 2,5% και 4,1% στα δύο και τρία χρόνια αντίστοιχα, η οποία δεν ήταν στατιστικά διαφορετική από τα αποτελέσματα των ασθενών που έλαβαν entecavir (3,1% και 7,5% στα δύο και τρία χρόνια αντίστοιχα). Η νεφρική λειτουργία πρέπει να λαμβάνεται επίσης υπόψη κατά την επιλογή μεταξύ των NA. Αξίζει να σημειωθεί ότι το telbivudine βρέθηκε να είναι πιο αποτελεσματικό στην πρόληψη της νεφροτοξικότητας³⁹. Την ίδια χρονιά στη Νότια Κο-

ρέα και στις Φιλιππίνες θεωρήθηκε αξιόπιστο και κυκλοφόρησε το φάρμακο **clevudine** (κλεβουδίνη, L-FMAU, CLV, Levonir®/Revonir®). Πολύ σύντομα όμως ανακλήθηκε λόγω της σκελετικής μυοπάθειας που προκαλεί, η οποία οφείλεται σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία³⁴.

Το **tenofovir disoproxil fumarate** (τενοφοβίρη δισοπροξίλη, bis(POC) PMPA fumarate, TDF, Viread®) πρωτοκυκλοφόρησε το 2008. Λαμβάνεται μία φορά την ημέρα για τουλάχιστον ένα έτος ή περισσότερο και στερείται σοβαρών παρενεργειών. Θεωρείται θεραπεία πρώτης γραμμής με εξαιρετικό προφίλ αντοχής, καθώς έχει αποδειχθεί αποτελεσματικό ως θεραπεία διάσωσης δεύτερης γραμμής μετά από αποτυχία της lamivudine-adeфовir^{26, 39}. Στον κινεζικό πληθυσμό, το tenofovir έχει αποδειχθεί ότι είναι ανώτερο από το entecavir στην πρόληψη της ανάπτυξης HCC (45). Δεδομένα από μια πρόσφατα δημοσιευμένη μετα-ανάλυση έδειξαν ότι οι ασθενείς που έλαβαν tenofovir είχαν χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης HCC σε σύγκριση με τους ασθενείς που έλαβαν entecavir (46) (39). Εξελίσσοντας το φάρμακο αυτό, έγινε αντιληπτή η θεραπευτική αξία ενός αναλόγου του, του **tenofovir alafenamide** (τενοφοβίρη αλαφεναμίδη, GS-7340-03: TAF hemifumarate, Vemlidy®) το 2016. Ένα άλλο ανάλογο, το **tenofovir exalidex** (ContraVir, CMX157) είναι ένα συζευγμένο με λιπίδια, στοχευμένο για το ήπαρ προφάρμακο που βρίσκεται σε πρώιμη κλινική ανάπτυξη, με πρωταρχικό στόχο τη βελτίωση της ασφάλειας έναντι των τρεχουσών σκευασμάτων tenofovir disoproxil fumarate⁴⁷. Πιο πρόσφατα, το 2017 στη Νότια Κορέα, ανακαλύφθηκε και ένα ακόμα ανάλογο, το **besifovir dipivoxil maleate** (μπεσιφοβίρη μηλεϊνική διισοφοξίλη, μηλεϊνικό ANA-380 / LB80380, μηλεϊνικό BSV dipivoxyl, Besivo®), το οποίο παρουσιάζει σημαντικά μειωμένη τοξικότητα στα οστά και τα νεφρά συγκριτικά με το tenofovir^{34, 47}. Ένα τελευταίο ανάλογο, το οποίο φάνηκε να ασκεί σημαντική δράση στην αντιμετώπιση της ηπατίτιδας B είναι το **lagociclovir valactate** (γαλακτική λαγοκυκλοβίρη, MIV-210), που αποτελεί προφάρμακο του FLG (φθορογουανοσίνη)^{8, 48}.

Συνολικά, η θεραπεία με PEG-IFN είναι μικρότερης χρονικής διάρκειας, οδηγεί σε μεγαλύτερη μεί-

ωση των επιπέδων HBsAg αλλά εμφανίζει αρκετές ανεπιθύμητες ενέργειες σε σχέση με τα ΝΑ, τα οποία χορηγούνται *per os* και συνήθως εφ' όρου ζωής, αλλά επιτυγχάνουν καλύτερο έλεγχο της αναπαραγωγής του ιού HBV^{7, 49}. Εξαιτίας του διαφορετικού μηχανισμού δράσης τους, έχουν προταθεί αρκετά θεραπευτικά σχήματα με συνδυασμό PEG-IFN και ΝΑ. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η συνδυαστική θεραπεία φαίνεται να πλεονεκτεί συγκριτικά με μονοθεραπεία με PEG-IFN ή ΝΑ, αφού επιτυγχάνει χαμηλότερα επίπεδα HBsAg τόσο σε HBeAg (+) όσο και σε HBeAg (-) ασθενείς μετά το τέλος της θεραπείας⁵⁰⁻⁵².

4. Νέες Θεραπευτικές Προσεγγίσεις

Σημαντικές επιστημονικές ανακαλύψεις οι οποίες επέτρεψαν την σε βάθος κατανόηση του κύκλου ζωής του HBV, όπως η ταυτοποίηση του κυτταρικού υποδοχέα NTCP που εμπλέκεται στην είσοδο του ιού HBV στα κύτταρα-ξενιστές, πληροφορίες σχετικά με τα βασικά πυρηνικά ένζυμα που εμπλέκονται στο σχηματισμό cccDNA και τον επιγενετικό έλεγχο του, η παρατήρηση της μερικής αποδόμησης του cccDNA που προκαλείται από τις IFN, ο προσδιορισμός του ρόλου της πρωτεΐνης HBx στη μεταγραφή του HBV καθώς και καινοτόμα κυτταρικά και ζωικά μοντέλα που έχουν βελτιώσει την *in vitro* και *in vivo* εκτίμηση της αντιϊκής δραστηριότητας νέων ενώσεων και της πιθανής τοξικότητάς τους, έχουν ανοίξει το δρόμο για τον εντοπισμό πολλαπλών νέων θεραπευτικών στόχων που θα οδηγήσουν σε ουσιαστική πρόοδο προς την επίτευξη «αποτελεσματικής θεραπείας» για την ηπατίτιδα Β⁷.

4.1 Αναστολείς Εισόδου

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην ενότητα 2.2, κατά την είσοδο του ιού, η pre-S1 ακολουθία του L-HBsAg αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα NTCP του ηπατοκυττάρου-ξενιστή. Η χρήση μικρών ακετυλιωμένων πεπτιδίων προερχόμενων από την pre-S1 ακολουθία αποδείχθηκε πως μπορεί να καταστείλει αποτελεσματικά την είσοδο του HBV και συνεπώς τη λοίμωξη της Ηπατίτιδας Β, παρουσιάζοντας εν-

θαρρυντικά αποτελέσματα τόσο *in vitro*^{53, 54} όσο και *in vivo*⁵⁵. Σε μια πρόσφατη ανάλυση, νέα κυκλικά πεπτίδια, προκάλεσαν σημαντική ελάττωση HBsAg *in vivo*, χωρίς να παρατηρηθεί τοξικότητα, έχοντας τιμές IC₅₀=0,66-2,54 μM χωρίς να επηρεάζουν τη φυσιολογική λειτουργία του υποδοχέα NTCP⁵⁶. Το πιο σημαντικό ανάλογο της συγκεκριμένης κατηγορίας φαίνεται να είναι το **Myrcludex B** (ή bulevirtidine), ένα λιποπεπτίδιο 47 αμινοξέων της pre-S1 ακολουθίας του L-HBsAg συνδεδεμένο με μια ομάδα μυριστικού οξέος, το οποίο έχει ήδη βρεθεί πως αναστέλλει αποτελεσματικά τη λοίμωξη *in vitro* (IC₅₀ = 80 pM)⁵⁷ και σε μύες⁵⁸⁻⁵⁹. Τα πρώτα δεδομένα κλινικών δοκιμών φάσης Ib σε ανθρώπους είναι επίσης εξαιρετικά⁶⁰. Μπορεί να χορηγηθεί *per os* σε λιποσωματική μορφή⁶¹ και παρουσιάζει ιδιαίτερα καλό προφίλ φαρμακολογικών αλληλεπιδράσεων⁶².

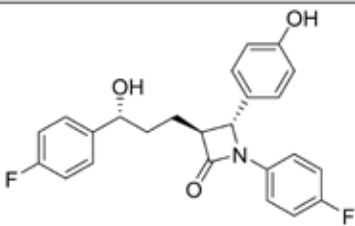
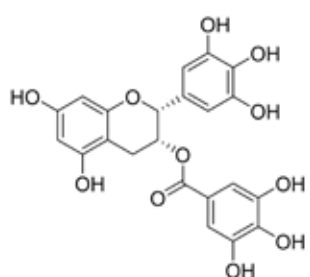
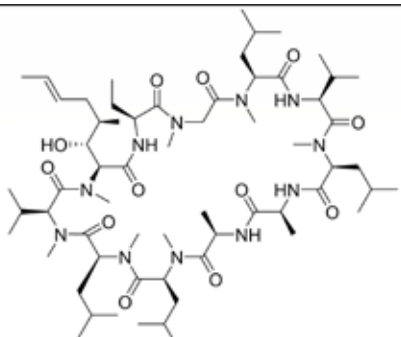
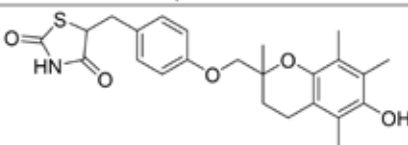
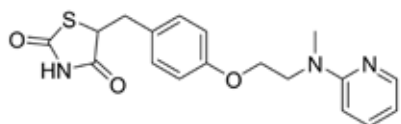
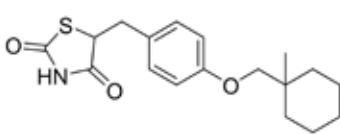
Πλήθος μορίων που εμφανίζουν μεγάλη συγγένεια με τον NTCP φαίνεται να μπορούν να αποτρέψουν ή να θεραπεύσουν τη λοίμωξη μέσω ανταγωνισμού με τα σωματίδια του ιού για σύνδεση στο συγκεκριμένο υποδοχέα (**Πίνακας 2**). Σε αυτά περιλαμβάνονται φάρμακα που έχουν ήδη λάβει έγκριση για τη θεραπεία άλλων ασθενειών (όπως ezetimibe, cyclosporin A, irbesartan κλπ)⁶³⁻⁶⁹, μόρια που απομονώθηκαν από φυτικές δρόγες⁷⁰ και μύκητες⁷¹⁻⁷², καθώς και νεότερα συνθετικά ανάλογα⁷³.

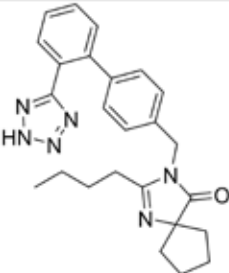
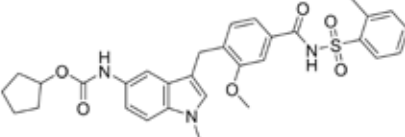
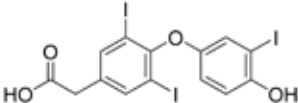
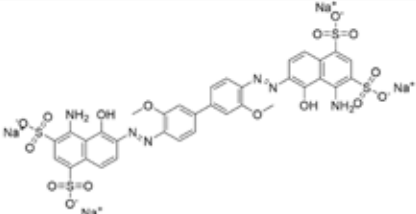
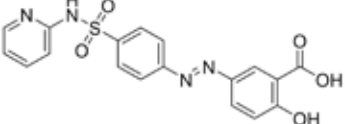
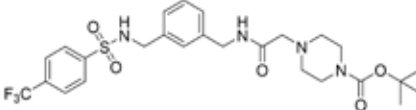
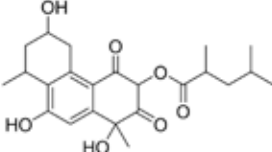
Την είσοδο του HBV στα ηπατοκύτταρα φαίνεται να μπορούν να αναστείλουν και μονοκλωνικά αντισώματα⁷⁴⁻⁷⁷, με μελέτες να έχουν αποδείξει πως μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο εκτός από την αναστολή της εισόδου και στην αναστολή της εξόδου των νέων ιικών σωματιδίων από τα μολυσμένα ηπατοκύτταρα⁷⁸, με εξαιρετικό προφίλ ασφάλειας και αποτελεσματικότητας (φάση I κλινικών δοκιμών για το συνδυασμό μονοκλωνικών αντισωμάτων HBV-Ab17 και HBV-Ab19⁷⁹).

4.2 Απευθείας στόχευση του cccDNA

Η ικανότητα άμεσης εξάλειψης ή απενεργοποίησης του HBV cccDNA έχει θεωρηθεί το «ιερό δισκοπότηρο» των θεραπειών του HBV⁴⁷. Η θεραπεία, δηλαδή, της χρόνιας λοίμωξης από ηπατίτιδα Β μπορεί εν μέρει να βασιστεί στην εξουδετέρωση του HBV

Πίνακας 2: Μόρια που αναστέλλουν την είσοδο του ιού HBV στα ηπατοκύτταρα και τιμές IC_{50} (inhibitory concentration 50%) κατά της λοίμωξης HBV, υπολογισμένες in vitro σε καλλιέργειες κυττάρων HepG2.

Όνομα	Δομή	Χαρακτηριστικά
Ezetimibe		Αναστολέας απορρόφησης χοληστερόλης $EC_{50}=18\mu M$ (64)
(-)-epigallocatechin-3-gallate		Απομονώθηκε από το πράσινο τσάι (προ-κλινικό στάδιο) $IC_{50}\approx 10\mu M$ (71)
Cyclosporin A		Ανοσοκατασταλτικό φάρμακο $IC_{50}=1,17\mu M$ (65)
Troglitazone		Θειαζολιδινοδιόνη (αγωνιστής PPAR-γ) $IC_{50}=9,7\mu M$ (67)
Rosiglitazone		Θειαζολιδινοδιόνη (αγωνιστής PPAR-γ) $IC_{50}=5,1\mu M$ (69)
Ciglitazone		Θειαζολιδινοδιόνη (αγωνιστής PPAR-γ) $IC_{50}=4,7\mu M$ (67)

Irbesartan		Ανταγωνιστής υποδοχέων αγγειοτενσίνης II $IC_{50}=3,3\mu M$ (68)
Zafirlukast		Ανταγωνιστής υποδοχέων λευκοτριενίων $IC_{50}=6,5\mu M$ (69)
TRIAC		Ανάλογο θυρεοειδικών ορμονών $IC_{50}=6,9\mu M$ (69)
Chicago Sky Blue 6B		Χρήση σε χρωστικές, βαφές και σε καλλυντικά προϊόντα $IC_{50}=7,1\mu M$ (69)
Sulfasalazine		Παράγωγο σαλικυλικού οξέος $IC_{50}=9,6\mu M$ (69)
B7		Νέο συνθετικό ανάλογο $IC_{50}=7,36\mu M$ (74)
Vanitaracin A		Απομόνωση από μύκητα <i>Talaromyces</i> <i>sp.</i> $IC_{50}=0,61\mu M$ (73)

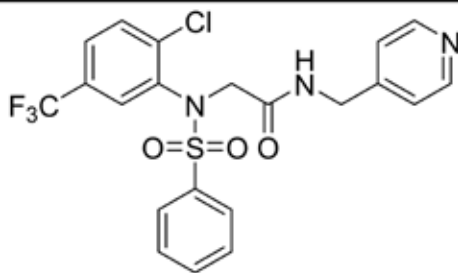
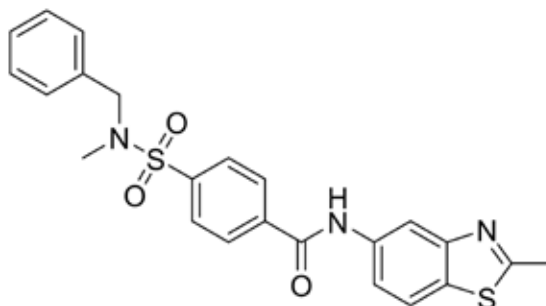
cccDNA που βρίσκεται στον πυρήνα των μολυσμένων ηπατοκυττάρων ή και στην μόνιμη αναστολή της μεταγραφής του cccDNA. Παρ' όλες τις μακροχρόνιες προσπάθειες εξάλειψης του cccDNA με τα ήδη υπάρχοντα αντιικά φάρμακα, ακόμη και μετά από παρατεταμένη θεραπεία, είτε σε ασθενείς είτε σε πειραματική κυτταρική καλλιέργεια ή σε ζωικά μοντέλα, αυτές έδειχναν να αποτυγχάνουν. Το γεγονός αυτό αυτομάτως οδήγησε στην περαιτέρω μελέτη νέων μορίων με σκοπό να στοχεύσουν επιτυχώς το cccDNA⁸⁰. Πολλά από τα βασικά στάδια του σχηματισμού cccDNA απαιτούν πυρηνικά ένζυμα του ξενιστή, συμπεριλαμβανομένων των TDP2, FEN1 και POLK, και ο σχηματισμός του ιϊκού χρωμοσώματος απαιτεί πυρηνικές ιστόνες και άλλα συστατικά της χρωματίνης του ξενιστή. Έτσι, οι θεραπείες που θα καταφέρουν να αναστείλουν το σχηματισμό του cccDNA θα είναι αυτές που θα στοχεύουν τα προαναφερθέντα βασικά στάδια σύνθεσής του⁸¹. Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 2.3, ο ρόλος της κυτοκίνης και της πρωτεΐνης APOBEC στο σχηματισμό και τη συντήρηση του cccDNA είναι πολύ σημαντικός, αφού ρυθμίζουν τη σταθερότητά του. Η χορήγηση, συνεπώς, ιντερφερόνης-α που αποτελεί μία γλυκοπρωτεΐνη της ομάδας των κυτοκινών, μπορεί να προκαλέσει απαμίνωση του ιϊκού DNA που εξαρτάται από την πρωτεΐνη APOBEC. Αποτέλεσμα αυτού είναι η μείωση του cccDNA σε μολυσμένα ηπατοκύτταρα.

Δυνητικά χρήσιμες στρατηγικές για την πλήρη απενεργοποίηση του cccDNA συνιστούν οι ενδο-νουκλεάσες CRISP και οι Cas9, οι οποίες χρησιμοποιούν RNA για να καθοδηγήσουν τη σύνδεση με το cccDNA που είναι ο DNA στόχος και οδηγούν σε μεταλλάξεις και διαγραφές αυτού. Επομένως, απαιτούνται πολλαπλά διαφορετικά μεταξύ τους RNA που στοχεύουν σε ποικίλους τόπους στο γονιδίωμα του HBV⁸¹⁻⁸². Περίπου το 7% των cccDNA γονιδιωμάτων που είχαν διαχωριστεί με CRISP-Cas9 απέδωσαν μεταλλάγματα που όμως δεν ακύρωσαν τη λειτουργία του στοχευμένου γονιδίου⁸¹. Οι CRISP-Cas9, σε σπάνιες περιπτώσεις, διαθέτουν τη δυνατότητα ακόμα και να αποκόψουν το χρωμοσωμικά ενσωματωμένο DNA του HBV⁸⁰. Προτού χρησιμοποιηθούν αυτές οι προσεγγίσεις γονιδιακής

επεξεργασίας στην κλινική πράξη, πρέπει να αντιμετωπιστούν ορισμένα πιθανά ζητήματα, συμπεριλαμβανομένης της ηπατοκυτταρικής στόχευσης, των εκτός στόχου επιπτώσεων, της διάσπασης του χρωμοσωμικά ενσωματωμένου HBV DNA και των απρόβλεπτων συνεπειών του ανασυνδυασμού του χρωμοσωμικού DNA⁸¹.

Μία άλλη τεχνική που θα μπορούσε να συμβάλει στο μεταγραφικό έλεγχο της έκφρασης του cccDNA είναι η απευθείας στόχευση της πρωτεΐνης HBx, η οποία απενεργοποιεί το σύμπλοκο Smc5/6 (structural maintenance of chromosomes complex). Το σύμπλοκο Smc5/6, όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2.4, απουσία της HBx, καταστέλλει τη μεταγραφή του cccDNA. Επομένως, αν ανασταλεί η πρωτεΐνη HBx με τη χρήση παρεμβολών RNA, θα εμποδίσει την έκφραση όλων των μεταγραφών του HBV και άρα θα μειωθεί το cccDNA (80). Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί και η ταυτοποίηση, ύστερα από κάποιο χρονικό διάστημα, των υποκατεστημένων σουλφοναμιδίων ως ειδικών αναστολέων του σχηματισμού cccDNA, αφού παρεμβαίνουν στην μετατροπή του rcDNA σε cccDNA, οπότε εμποδίζουν την εκ νέου δημιουργία του cccDNA (Πίνακας 3)⁸³⁻⁸⁴.

Τέλος, η χρήση νουκλεασών δακτύλου ψευδαργύρου (zinc-finger nucleases: ZFNs) και νουκλεασών ενεργοποιητή μεταγραφής (transcription activator-like effector nucleases: TALENs) αποτελεί μέθοδο που κατάφερε να καταστρέψει σε μεγάλο βαθμό το HBV cccDNA⁸¹. Συνήθως χρησιμοποιούνται 2 ZFN που περιέχουν τρία ή τέσσερα δάκτυλα ψευδαργύρου. Στην ηπατίτιδα B, οι ZFN αποτελούνται από τρία δάκτυλα. Οι HBV ZFNs πιθανότατα θα χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με υπάρχουσες θεραπείες όπως η ιντερφερόνη και τα νουκλεοσιδικά ανάλογα, που εμποδίζουν το σχηματισμό νέου cccDNA. Η συγκεκριμένη αγωγή θα μπορούσε να επιβραδύνει την ανάπτυξη στελεχών HBV που εμφανίζουν αντίσταση και να αυξήσει την πιθανότητα παρατεταμένης ιολογικής απόκρισης⁸⁵. Οι νουκλεάσες ενεργοποιητή μεταγραφής (TALENs) είναι πρόσφατα αναπτυγμένα ένζυμα που μπορούν να διασπάσουν ειδικής για αλληλουχίας στόχους DNA, δηλαδή του cccDNA. Κατασκευάστηκαν διαφόρων ειδών TALENs που στοχεύουν τις διατηρημένες περιοχές του ιϊκού DNA μεταξύ διαφορετικών γονότυπων

Πίνακας 3: Δις-υποκατεστημένα Σουλφοναμίδια (disubstituted sulfonamides-DSS).**(a) CCC-0975****(b) CCC-0346**

HBV. Η αντι-HBV επίδραση των TALENs αποδείχθηκε περαιτέρω σε ένα μοντέλο ποντικού με υδροδυναμική ένεση. Συνολικά, αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι τα TALENs μπορούν συγκεκριμένα να στοχεύσουν και να απενεργοποιήσουν επιτυχώς το γονιδίωμα του HBV και δρουν ισχυρά συνεργιστικά με την IFN (ιντερφερόνη), παρέχοντας έτσι μια πιθανή θεραπευτική στρατηγική για την αντιμετώπιση της λοίμωξης από χρόνια ηπατίτιδα Β⁸⁶.

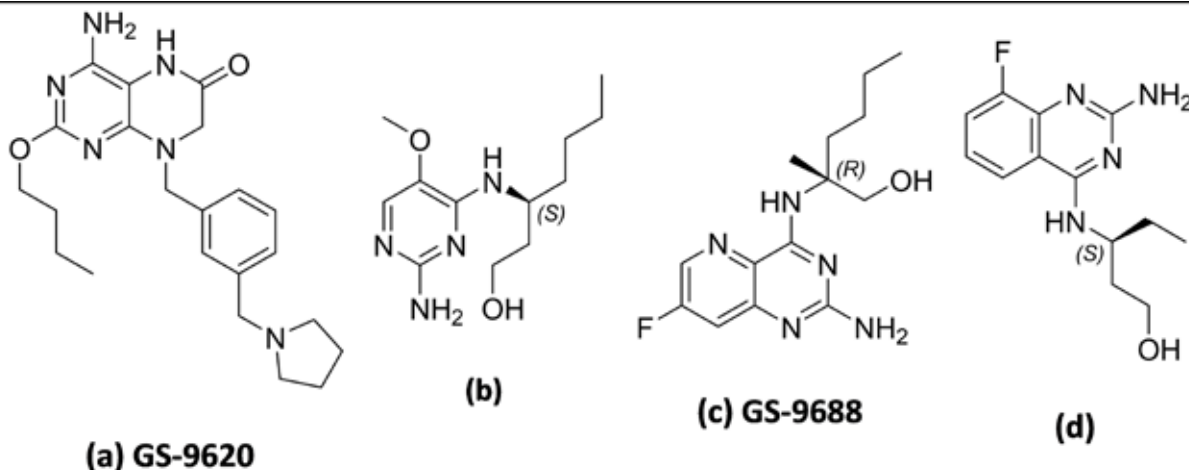
4.3 Ανοσοθεραπεία

4.3.1 Εγγενής Ανοσία

Το σύστημα εγγενούς ανοσίας αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας των κυττάρων του ξενιστή απέναντι σε παθογόνα και περιλαμβάνει μεμβρανικούς και ενδοκυττάριους υποδοχείς PRRs (pattern recognition receptors) οι σπουδαιότεροι από τους οποίους είναι οι κυτταροπλασματικοί υποδοχείς RIG-I (retinoic acid-inducible gene I receptors) και οι μεμβρανικοί υποδοχείς TLR (toll-like receptors), οι οποίοι αναγνωρίζουν συγκεκριμένες περιοχές των παθογόνων, τις PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) και επάγουν την παραγωγή προφλεγμονωδών παραγόντων όπως οι κυτοκίνες από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος⁸⁷⁻⁹⁰. Έτσι, μόρια-αγωνιστές των συγκεκριμένων υποδοχέων έχουν θεωρηθεί ως παράγοντες που μπορούν να συμβάλλουν στην αποτελεσματική θεραπεία της Ηπατίτιδας Β επάγοντας

τους μηχανισμούς της εγγενούς ανοσίας. Πλήθος μορίων που αποτελούν αγωνιστές των υποδοχέων TLR7/TLR8 βρίσκονται σήμερα σε στάδιο κλινικών δοκιμών, προκειμένου να διαπιστωθεί η ασφάλεια και αποτελεσματικότητά τους στην αντιμετώπιση της λοίμωξης⁹¹. Τα ανάλογα RO7020531, RG7795 (ANA773), RG7854 (Roche[®]) αποτελούν αγωνιστές του TLR7 και βρίσκονται σε φάση I κλινικών δοκιμών χωρίς να υπάρχουν ακόμη δημοσιευμένα αποτελέσματα, ενώ ο TLR7 αγωνιστής JNJ-64794964 (Janssen[®]) επέδειξε σε μια δοκιμή φάσης I καλά ανεκτό και ασφαλές προφίλ σε υγιείς ενήλικες⁹². Ένας ακόμη αγωνιστής TLR7, ο GS-9620, σε κλινικές δοκιμές φάσης II, επέδειξε πολύ μικρή μείωση επιπέδων HBsAg στον ορό του αίματος μετά από 24 εβδομάδες χορήγησης σε ασθενείς με χρόνια Ηπατίτιδα Β που λαμβάνουν ΝΑ⁹³ καθώς και αντίστοιχα μικρή μείωση όταν συγχρηγήθηκε με tenofovir σε ασθενείς που δεν είχαν λάβει καμία άλλη αντιϊκή θεραπεία⁹⁴. Αποτελέσματα κλινικών δοκιμών φάσης II αναμένονται επίσης και για τον TLR8 αγωνιστή GS-9688^{95,91}. Παράγωγα πυριμιδίνης⁹⁶ και, πιο πρόσφατα, παράγωγα 2,4-διαμινοκιναζολίνης αναγνωρίστηκαν ως διπλοί τροποποιητές των TLR7 και TLR8 υποδοχέων. Ανάλυση των σχέσεων δομής-δράσης τους φανέρωσε πως αλλαγή στη στερεοχημεία ενός χειρόμορφου κέντρου προσδίδει TLR8 εκλεκτικότητα (Πίνακας 4)⁹⁷. Τέλος, ο αγωνιστής του υποδοχέα RIG-I, το SB 9200 (Inarigivir), επέδειξε ιδιαίτερα ενθαρρυντι-

Πίνακας 4: Αγωνιστές υποδοχέων TLR7,TLR8: (a) Εκλεκτικός αγωνιστής TLR7 (b) Διπλός αγωνιστής TLR7/8 (c) Εκλεκτικός αγωνιστής TLR8 (d) Διπλός αγωνιστής TLR7/8-(R) στερεοχημεία οδηγεί σε εκλεκτική TLR8 αγωνιστική δράση.



κά αποτελέσματα σε μελέτες με αρκτόμυες⁹⁸⁻⁹⁹ και έτσι προχώρησε σε κλινικές δοκιμές φάσης IIa, με τα αποτελέσματα να δείχνουν αυξημένο όφελος από το συνδυασμό κλασικής αντιϊκής θεραπείας με ανοσοθεραπεία¹⁰⁰.

4.3.2 Επίκτητη ανοσία

Ο υποδοχέας PD-1 (programmed death-1) εκφράζεται από τα ειδικά για τον HBV T κύτταρα και έτσι μόρια που μπλοκάρουν την αλληλεπίδρασή του με τον ενδογενή προσδέτη του, PD-L1, μπορούν να οδηγήσουν σε αύξηση του αριθμού και της δράσης αυτών των T κυττάρων με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή αντισωμάτων από τα B κύτταρα¹⁰¹⁻¹⁰³. Η πιθανότητα εμφάνισης ηπατοτοξικότητας αποτελεί τον μείζονα περιορισμό για την ευρύτερη χρήση παραγόντων που αναστέλλουν τον PD-1¹⁰⁴, ωστόσο κλινικές δοκιμές φάσης 1 και 2 του PD-1 αναστολέα nivolumab, σε πάνω από 100 ασθενείς, δεν έδειξαν στοιχεία σοβαρής ηπατοτοξικότητας¹⁰⁵.

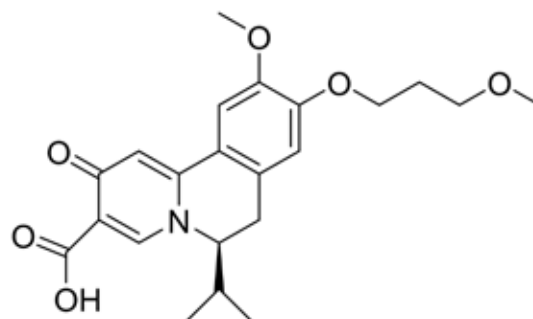
4.4 Παρεμβολή RNA – Μετα-μεταγραφικός έλεγχος

Η χρήση μορίων-ενώσεων για την αναστολή της

αναπαραγωγής του ιού HBV στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης αποτελεί μία καινοτόμο μέθοδο στη θεραπεία της χρόνιας ηπατίτιδας B. Αυτή η μέθοδος έχει αξιολογηθεί εκτενώς *in vitro* και επικυρώθηκε σε ζωικά μοντέλα παρόλο που στον άνθρωπο βρίσκεται ακόμα σε προκλινικό στάδιο^{7, 14, 47, 106}. Οι ενώσεις που δύνανται να χρησιμοποιηθούν πρέπει να έχουν την ικανότητα να προσδεθούν με υψηλή εξειδίκευση στο HBV RNA και κατ' επέκταση να διαταράξουν την έκφραση των πρωτεϊνών του HBV καταστέλλοντας τη μετάφραση του mRNA. Έτσι, θα μειωθεί η παραγωγή ιικών πρωτεϊνών, σωματιδίων και αντιγόνων, κυρίως του HBsAg^{19,47}. Τέτοιες ενώσεις φάνηκε να είναι: (i) ορισμένες παρεμβολές RNA, (ii) κάποια αντιπληροφοριακά ολιγονουκλεοτίδια (antisense oligonucleotides: ASOs) και (iii) συγκεκριμένα ένζυμα ριβονουκλεϊνικού οξέος (ριβοένζυμα)⁸¹. Κατά την είσοδο του ιού HBV στο κύτταρο, υβριδοποιείται σε ιικό mRNA και το προκύπτον δίκλωνο RNA στοχεύεται για αποικοδόμηση. Με τον όρο παρεμβολές RNA (RNA Interference: RNAi) εννοούνται μόρια RNA 20-30 νουκλεοτιδίων που στοχεύουν συγκεκριμένες ιικές αλληλουχίες του mRNA¹⁰⁷. Πλεονέκτημα των συγκεκριμένων είναι ότι πολλαπλά mRNA αντίγραφα του HBV μπορούν να στοχευθούν ταυτόχρονα με την προσεκτική επι-

λογή των αλληλουχιών των νουκλεϊκών οξέων των παρεμβολών RNA σε επικαλυπτόμενες περιοχές κωδικοποίησης⁸¹. Η απελευθέρωση του τμήματος siRNA (small interfering RNA) με σκοπό τη στόχευση του γονιδιώματος HBV εντός των ηπατοκυττάρων είναι η πρώτη «απόπειρα» χρήσης παρεμβολής RNA⁴⁷. Τρεις τύποι siRNA με διαφορετικούς τρόπους χορήγησης βρίσκονται υπό προκλινική αξιολόγηση ή/και κλινική δοκιμή πρώιμης φάσης⁷. Το siRNA διαμεσολαβεί στην αναστολή του HBV είτε με μεταγραφικό είτε με μετα-μεταγραφικό τρόπο¹⁰⁷. Ένα πρώιμο μόριο siRNA εναντίον του HBV, το πρώτο που δοκιμάστηκε σε κλινικές μελέτες στον άνθρωπο, είναι το ARC-520, το οποίο αποτελείται από 2 siRNA συζευγμένα με χοληστερόλη, για να βελτιωθεί η απελευθέρωσή του στα ηπατοκύτταρα, και χορηγήθηκε μέσα σε ένα σύστημα πολυμερούς που περιείχε *N*-ακετυλογαλακτοζαμίνη^{19, 47}. Η οδός χορήγησής του ήταν ενδοφλέβια στο ήπαρ, γεγονός που μαζί με τον κίνδυνο δέσμευσης εκτός στόχου, την πιθανή ηπατοτοξικότητα και τον κίνδυνο ανοσοενεργοποίησης από υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων, αποτελούν πιθανούς περιορισμούς για τη χρήση του⁷. Παρ' όλα τα προαναφερθέντα εμπόδια, το ARC-520 ύστερα από πειράματα σε χιμπατζήδες αποδείχθηκε να είναι πολύ αποτελεσματικό στη μείωση των επιπέδων του HBV DNA, του αντιγόνου HBeAg και του HBsAg (14) (106). Έτσι, αφού εγκρίθηκε η Φάση I, με λίγες αντιδράσεις υπερεικασίας, προχώρησε σε δοκιμές Φάσης II¹⁴. Ορισμένα προκαταρκτικά αποτελέσματα των δοκιμών φάσης II απέδειξαν ότι μία εφάπαξ δόση ARC-520 σε συνδυασμό με entecavir ή tenofovir disoproxil¹⁹ είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του HBV DNA τόσο στους HBeAg θετικούς όσο και στους HBeAg αρνητικούς ασθενείς, αλλά του HBsAg μόνο σε HBeAg θετικούς ασθενείς⁷. Συνιστάται, ακόμα, μελλοντική συγχορήγησή του με αντισταμινικά φάρμακα¹⁴. Εξέλιξη αυτού αποτέλεσε το JNJ-3989 (πρώην ARO-HBV), που χαρακτηρίζεται ως η επόμενη γενιά siRNA που στοχεύει σε διαφορετική θέση στο γονιδίωμα HBV. Χορηγείται υποδόρια, και σκοπός του είναι να στοχεύσει ιικά αντίγραφα τόσο από cccDNA όσο και από ενσωματωμένο HBV DNA, ενώ αξιολογείται σε μια κλινική δοκιμή Φάσης II^{19, 47}. Ένα επιπλέον μό-

Πίνακας 5: Μόριο αναστολέας της μεταγραφής του HBV.



(a) RG7834

ριο, το RG7834, μελετήθηκε για τη δράση του στην ηπατίτιδα Β και αποδείχθηκε ότι δεν λειτουργεί ως RNAi, αλλά καταφέρνει να καταστέλλει τη μεταγραφή του HBV με ειδικό, άγνωστο όμως, τρόπο για τον ιό¹⁴. **(Πίνακας 5)** Ο συνδυασμός του RG7834, entecavir και PEG-IFNα φάνηκε να μειώνουν σε μεγάλο βαθμό το HBV DNA και το HBsAg⁸¹. Το AB-729 (Arbutus) αποτελεί ένα μόριο siRNA, επίσης, το οποίο όμως χορηγείται υποδόρια συζευγμένο με *N*-ακετυλογαλακτοζαμίνη. Το τελευταίο κατέδειξε σημαντική καταστολή του HBsAg σε μοντέλα ποντικών που ήταν μολυσμένα από τον ιό HBV⁴⁷.

Τα αντιπληροφοριακά ολιγονουκλεοτίδια (antisense oligonucleotides: ASOs) είναι η δεύτερη κατηγορία μορίων που μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο έναντι της ηπατίτιδας Β. Τα ASOs είναι νουκλεοτίδια που θέτουν ως στόχο τους τις αλληλουχίες που παράχθηκαν από την μεταγραφή του ιικού HBV DNA και συνεπώς μπλοκάρουν την έκφραση της ιικής πρωτεΐνης μέσω στερικού αποκλεισμού της, που οδηγεί σε αναστολή του ιικού πολλαπλασιασμού και της παραγωγής ιικών αντιγόνων⁷. Η διαφορά στο μηχανισμό δράσης με τα siRNA είναι ότι τα ASOs μόλις συνδεθούν με την αλληλουχία που είναι συμπληρωματικά, η αποικοδόμηση του μεταγραφόμενου RNA τελικά πραγματοποιείται από την ριβονουκλεάση H.

4.5 Αναστολή Ριβονουκλεάσης H (RNaseH: ribonuclease H)

Οι ριβονουκλεάσες H είναι ένζυμα που καταστρέφουν το RNA, όταν αυτό βρίσκεται συνδεδεμένο με DNA¹⁰⁸. Η HBV RNaseH αποδομεί το ιϊκό pgRNA, αφού έχει αντιγραφεί σε DNA από την αντίστροφη μεταγραφή, επιτρέποντας έτσι τη σύνθεση του δεύτερου κλώνου του ιϊκού rcDNA¹⁰⁹. Αναστολή της HBV RNaseH οδηγεί σε συσώρευση RNA:DNA αλυσίδων μεγάλου μήκους και αναστολή της σύνθεσης του rcDNA, με αποτέλεσμα τα νέα ιϊκά σωματίδια που συντίθενται να εξέρχονται από τα ηπατοκύτταρα έχοντας ελλατωματικό γενετικό υλικό¹¹⁰. Φάρμακα, επομένως, που αναστέλλουν την HBV RNaseH μπορεί να αποτελέσουν εξαιρετική επιλογή για την αποτελεσματική αντιμετώπιση της λοίμωξης.

Το ενεργό κέντρο των RNaseH περιλαμβάνει μια αλληλουχία αμινοξέων 'DEDD' (ασπαρτικό οξύ - γλουταμικό οξύ - ασπαρτικό οξύ - ασπαρτικό οξύ), η οποία με τη μεσολάβηση δυο κατιόντων Mg^{2+} καταλύει την αντίδραση υδρόλυσης του RNA, η οποία φαίνεται πως απαιτεί και τα δύο κατιόντα Mg^{2+} ⁽¹¹¹⁾ ⁽¹¹²⁾. Οι μέχρι σήμερα γνωστοί αναστολείς της HBV RNaseH διαθέτουν τρία άτομα ηλεκτρονιοδότες (O ή N) στη σειρά, δημιουργώντας χηλικές αλληλεπιδράσεις με τα δύο κατιόντα Mg^{2+} ¹¹³. Τα ανάλογα που έχουν αναγνωριστεί ως αναστολείς της HBV RNaseH αποτελούν είτε παράγωγα α-υδροξυτροπολόνης (α-HTs) είτε N-υδροξυϊμίδια όπως παράγωγα N-υδροξυϊσοκινολινοδιόνης (HID), N-υδροξυναφθυριδιόνης (HNO), N-υδροξυπυριδινοδιόνης (HPyD) και N-υδροξυπυριμιδινοδιόνης (HPD)¹¹⁴.

Το πρώτο μόριο που διαπιστώθηκε πως μπορεί να αναστείλει το ένζυμο ήταν το φυσικό προϊόν **β-thujaplicinol**, που απομονώθηκε από τον ξυλώδη ιστό κέδρου και αναστέλλει την HBV RNase H των γονοτύπων D και H με τιμές IC_{50} 5,9 και 2,3 μM , αντίστοιχα¹¹⁵. Η ανακάλυψη αυτή οδήγησε σε σχεδιασμό και σύνθεση πλήθους νεότερων υδροξυλιωμένων παραγώγων τροπολόνης, τα οποία μπορούν να αναστείλουν την αναπαραγωγή του ιού με τιμές EC_{50} έως και 0,34 μM (ανάλογο **#110**¹¹⁶) και χαμηλή κυτταροτοξικότητα με τιμές CC_{50} έως και >100 μM , αποδίδοντας έτσι τιμές θεραπευτικού δείκτη

($TI = CC_{50}/EC_{50}$) έως και >200¹¹⁷. Περαιτέρω μελέτες των σχέσεων δομής-δράσης στον υδροξυλιωμένο δακτύλιο τροπολόνης έδειξαν πως το α-OH είναι απαραίτητο για την αναστολή της HBV RNaseH. Ογκώδεις υποκαταστάτες στις θέσεις R¹, R² και R³ φαίνεται να μειώνουν τη δραστικότητα, οδηγώντας στο συμπέρασμα πως η αποτελεσματικότητα μπορεί να αυξηθεί με την εισαγωγή σουλφονυλο- ή λακτονικών υποκαταστατών¹¹⁶⁻¹¹⁸. Τα δεδομένα αυτά επικυρώθηκαν και από πιο πρόσφατες μελέτες με τα αποτελέσματα να καταδεικνύουν επίσης τη μεγάλη αποτελεσματικότητα παραγώγων με αμιδικούς υποκαταστάτες στο δακτύλιο της α-OH-τροπολόνης¹¹⁹⁻¹²¹.

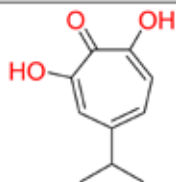
Τρεις κατηγορίες N-υδροξυϊμιδίων έχει βρεθεί πως μπορούν να αναστείλουν την HBV RNaseH: N-υδροξυϊσοκινολινοδιόνης (HID), N-υδροξυναφθυριδιόνης (HNO), N-υδροξυπυριδινοδιόνης (HPyD) και N-υδροξυπυριμιδινοδιόνης (HPD). Και οι τρεις αυτές κατηγορίες ενώσεων διαθέτουν άτομα N ή O στις κατάλληλες θέσεις προκειμένου να σχηματίσουν χηλικές αλληλεπιδράσεις με τα δυο ιόντα Mg^{2+} αναστέλλοντας με τον τρόπο αυτό τη φυσιολογική δράση του ενζύμου, όπως ακριβώς και τα παράγωγα α-OH-τροπολόνης¹¹³. Πλήθος αναλόγων έχουν συντεθεί και αξιολογηθεί φαρμακολογικά μέχρι σήμερα αποδίδοντας πολύ χαμηλές τιμές EC_{50} ακόμη και κοντά στα 100 nM, κυτταροτοξικότητα της τάξης $CC_{50} = 25-100 \mu M$ και τιμές θεραπευτικού δείκτη (TI) έως και >300^{24, 122, 123, 124, 125}. Αρκετά από τα μόρια αυτά μελετήθηκαν επίσης *in vivo* σε μύες, με τα αποτελέσματα να επιβεβαιώνουν πως ανάλογα της κατηγορίας αυτής μπορούν να αναστείλουν τη λοίμωξη και πως το ένζυμο HBV RNaseH αποτελεί ένα βιώσιμο στόχο για ανάπτυξη περισσότερων καινοτόμων φαρμάκων με σκοπό την αποτελεσματική θεραπεία της Ηπατίτιδας B¹²⁶. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αναστολέων της HBV RNaseH που έχουν μελετηθεί ως σήμερα φαίνονται στον **Πίνακα 6**.

4.6 Τροποποιητές/Αναστολείς Συναρμολόγησης Νουκλεοκαψιδίου

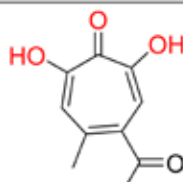
Ο πυρήνας του νουκλεοκαψιδίου διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στον κύκλο αναπαραγωγής του ιού HBV.

Πίνακας 6: Μόρια που αναστέλλουν το ένζυμο HBV RNaseH. Με κόκκινο χρώμα τονίζονται τα άτομα που δημιουργούν χηλικές αλληλεπιδράσεις με τα δυο κατιόντα Mg^{2+} στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. HID: N-hydroxyisoquinolinediones, HNO: N-hydroxynaphththyridinone, HPD: N-hydroxypyrimidinedione, HPyD: N-hydroxypyridinedione, EC₅₀: effective concentration 50%, CC₅₀: cytotoxic concentration 50%, TI: therapeutic index.

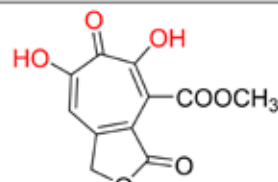
α-υδροξυτροπολόνες



46
EC₅₀ = 1,0 μM
CC₅₀ = 25 μM
TI = 25

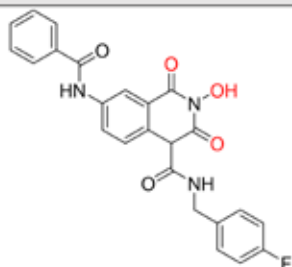


110
EC₅₀ = 0,34 μM
CC₅₀ = 32 μM
TI = 128

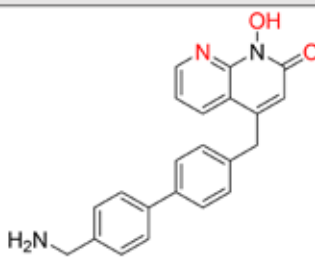


280
EC₅₀ = 0,5 μM
CC₅₀ = >77 μM
TI = >154

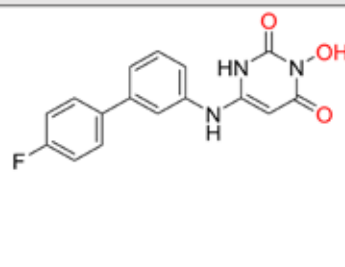
N-υδροξυϊμίδια



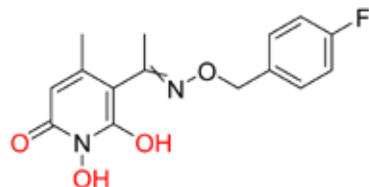
86
HID
EC₅₀ = 1,4 μM
CC₅₀ = 99 μM
TI = 71



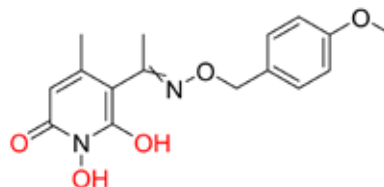
12
HNO
EC₅₀ = 3,4 μM
CC₅₀ = 7,1 μM
TI = 2



17
HPD
EC₅₀ = 5,5 μM
CC₅₀ = >100 μM
TI = >18



A23
HPyD
EC₅₀ = 0,11 μM
CC₅₀ = 33 μM
TI = 300



A24
HPyD
EC₅₀ = 0,29 μM
CC₅₀ = 100 μM
TI = 345

Απαιτείται για τη μεταφορά του ιϊκού γονιδιώματος προς και από τον πυρήνα του μολυσμένου ηπατοκυττάρου, καθώς και για την επιτυχή αντίστροφη μεταγραφή του pgRNA σε rcDNA¹⁹. Παράλληλα, η βασική πρωτεΐνη του πυρήνα (Cp) που συναρμολογείται στο ιϊκό καψίδιο εμπλέκεται και εκείνη με τη σειρά της σε πολλές πτυχές του κύκλου ζωής του HBV, επομένως αποτελεί και έναν πολλά υποσχόμενο στόχο για τα αντιικά φάρμακα⁸. Οι νέοι ρυθμιστές ή αναστολείς συναρμολόγησης του νουκλεοκαψιδίου και της πρωτεΐνης του πυρήνα μπορούν να επηρεάσουν διάφορα στάδια του κύκλου αντιγραφής του HBV, συμπεριλαμβανομένης της συναρμολόγησης του καψιδίου, της αντίστροφης μεταγραφής, καθώς και της πρόσδεσης πρωτεΐνης pgRNA και πολυμεράσης¹⁴. Έχουν αναπτυχθεί δύο κατηγορίες τέτοιων αναλόγων με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των καψιδίων τους όταν έλθουν σε επαφή με την ένωση. Η πρώτη αφορά τους αλλοστερικούς ρυθμιστές την πρωτεΐνης του πυρήνα (Core protein allosteric modulators- CpAMs), που αντιπροσωπεύονται από τις ετεροαρυδιϋδροπυριμιδίνες (HAPs), όπως το GLS4, RO7049389 και Bay41¹⁴. Αποτέλεσμα της δράσης αυτών αποτελεί η συναρμολόγηση του πολυμερούς του πυρήνα χωρίς καψίδια ή ο σχηματισμός συσσωματωμένων και παραμορφωμένων δομών καψιδίων^{8, 19, 81, 83}. Η επόμενη κατηγορία είναι οι ρυθμιστές συγκρότησης καψιδίων, όπως τα φαινυλοπροπενάμια (PP) ή σουλφαμοϋλοβενζαμίδια (SBA), κύριοι εκπρόσωποι των οποίων είναι τα: AT-130, NVR-3778, JNJ6379, JNJ0440, JNJ-632, JNJ56136379 και AB-423^{14,81}. Το ABI-H0731 σηματοδότησε την έναρξη μίας νέας κατηγορίας ενώσεων. Είναι παράγωγο διβενζοθειαζεπινωκαρβοξαμίδιου και δείχνει να επιφέρει σημαντικές μειώσεις του DNA και RNA του ιού HBV στη δοκιμή Φάσης Ι¹⁹. Σχηματίζουν μορφολογικά φυσιολογικά καψίδια που στερούνται όμως ιϊκού νουκλεϊκού οξέος. Και οι δύο ομάδες φαρμάκων αναστέλλουν την απελευθέρωση ιϊκών σωματιδίων, μειώνοντας έτσι την ποσότητα του HBV DNA και RNA που εξέρχεται από το ηπατοκύτταρο. Εμποδίζοντας, ακόμα, τη μεταφορά των εισερχόμενων νουκλεοκαψιδίων στον πυρήνα, αποτρέπουν και το σχηματισμό του cccDNA, αλλά ταυτόχρονα παρεμποδίζεται και ο *de novo* σχηματισμός cccDNA λόγω της αποσυναρμολόγησης των νουκλεοκαψιδίων που

πραγματοποιείται⁸¹. Το NVR-3778 είναι παράγωγο σουλφαμοϋλοβενζαμίδιου (SBA) το οποίο αναπτύχθηκε στις ΗΠΑ, χορηγείται *per os* και βρίσκεται σε κλινική δοκιμή Φάσης Ια (NCT02112799, NCT02401737) επιδεικνύοντας πολύ ικανοποιητικό συνεργιστικό αποτέλεσμα σε συνδυασμό με PEG-IFN, ύστερα από αξιολόγηση σε ποντίκια με εξανθρωπισμένο ήπαρ^{7, 14, 19}. Πολύ πρόσφατες *in vitro* μελέτες σε πρωτεύοντα ανθρώπινα ηπατοκύτταρα, έδειξαν ότι το JNJ-632 (SBA) και το Bay41 (HAP) αποτρέπουν το σχηματισμό του cccDNA και μειώνουν τα επίπεδα τόσο του ενδοκυτταρικού HBV RNA, όσο και των αντιγόνων HBeAg και HBsAg¹⁴. Περαιτέρω *in vitro* μελέτες που διεξήχθησαν, απέδειξαν ότι τα παράγωγα του φαινυλοπροπενάμινου καταδεικνύουν πολύ πιο αποτελεσματική αντιϊκή δράση όταν συνδυαστούν με NA (83). Οι δομές των παραπάνω ενώσεων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7**.

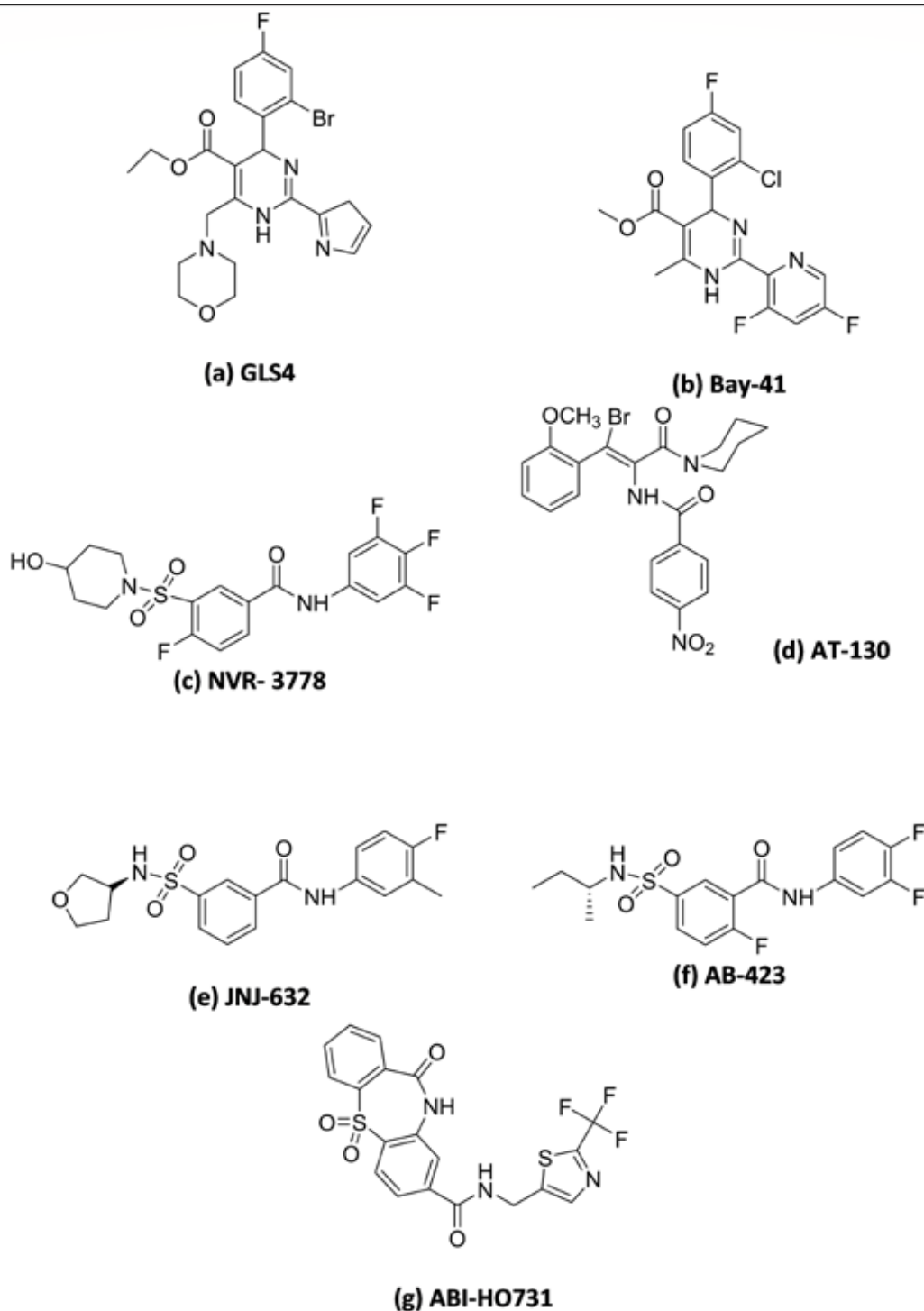
4.7 Επίλογος

Ο χρόνος για την ανάπτυξη και εφαρμογή μιας ασφαλούς, προσιτής και ευρέως διαθέσιμης θεραπείας για την χρόνια ηπατίτιδα Β, που επηρεάζει παγκοσμίως 257 εκατομμύρια άτομα, είναι τώρα. Τα εμβόλια της ηπατίτιδας Β και τα από του στόματος αντιικά φάρμακα είναι πολύ αποτελεσματικά στην πρόληψη και τον έλεγχο της ηπατίτιδας Β, αντίστοιχα, ωστόσο η πρόσβαση σε αυτά παραμένει μια πρόκληση για μεγάλα ποσοστά του παγκόσμιου πληθυσμού. Συνεπώς, η ανάγκη εύρεσης θεραπευτικής αγωγής έναντι της χρόνιας ηπατίτιδας Β είναι σήμερα πιο επίκαιρη από ποτέ. Λειτουργική θεραπεία, με εξάλειψη του μετρήσιμου στο αίμα HBsAg και HBV DNA, μετά από μια ολοκληρωμένη θεραπεία, παραμένει ο πιο άμεσος στόχος για την επιστημονική κοινότητα. Διάφορες στρατηγικές προς αυτή την κατεύθυνση βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές, από τις οποίες προκύπτει πως η θεραπεία πιθανότατα θα απαιτεί συνδυασμό αντιϊκών παραγόντων-φαρμάκων. □

Ευχαριστίες

Οι συγγραφείς ευχαριστούν την Ερωφίλη Γιαννακούλου για τη δημιουργία και παροχή της Εικόνας 2.

Πίνακας 7: Διαμορφωτές - Αναστολείς Νουκλεοκαψιδίου / Nucleocapsid Assembly Modulators.



Therapeutic Approaches for the Treatment of Hepatitis B

Dimitrios Moianos, Georgia-Myrto Prifti, Grigoris Zoidis*

School of Health Sciences, Department of Pharmacy, Division of Pharmaceutical Chemistry, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimiopolis Zografou, 15771, Athens, Greece

KEYWORDS:

Hepatitis B; HBV; cure; antiviral agents; novel drug targets

*CORRESPONDING

AUTHOR: Grigoris Zoidis,
zoidis@pharm.uoa.gr

ABSTRACT

Hepatitis B is a liver infection caused by Hepatitis B Virus (HBV) leading to more than 800.000 deaths annually. Although an excellent, safe and effective vaccine is available, it is still a major worldwide public health burden and among the main causes of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Currently approved anti-HBV therapies include interferons and nucleoside analogs. However, those compounds do not achieve significant inhibition of virus replication or elimination of the cccDNA reservoir and cure the infection only partially. Thus, search for new drugs and targets with the ultimate purpose of an “effective

cure” is the subject of extensive scientific research internationally. Novel approaches including virus entry inhibitors, epigenetic control of cccDNA, immune therapy, RNA interference molecules, RNaseH inhibitors and capsid assembly modulators have shown great results both in vitro and in vivo and many compounds are currently ongoing clinical trials. This review provides an overview of the treatment regimens available to date and examines, recent therapeutic approaches that are currently being evaluated in preclinical and clinical stage.

REFERENCES

- Trépo C., Chan H.L.Y., Lok A. Hepatitis B virus infection. *The Lancet*. 384, 9959, 2053-2063, 2014.
- World Health Organization. Hepatitis B, Key Facts. 2020.
- World Health Organization . GLOBAL HEPATITIS REPORT, 2017. Geneva, Switzerland : s.n., 2017.
- Blumberg B.S., Alter H.J. A "New" Antigen in Leukemia Sera. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 191, 17, 541-546, 1965.
- Blumberg B.S., Gerstley B.J., Hungerford D.A., London W.T., Sutnick A.I. A serum antigen (Australia Antigen) in Down's syndrome, leukemia and hepatitis. *Ann. Intern. Med.* 66, 5, 924-931, 1967.
- Krugman S., Giles J.P., Hammond J. Infectious Hepatitis: Evidence for Two Distinctive Clinical, Epidemiological, and Immunological Types of Infection. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 200, 5, 365-373, 1967 .
- Lok A., Zoulim F., Dusheiko G., Ghany M. Hepatitis B cure: From discovery to regulatory approval. *J. Hepatol.* 67, 4, 847-861, 2017.
- Ko C., Michler T., Protzer U. Novel viral and host targets to cure hepatitis B. *Curr. Opin. Virol.* 24, 38-45, 2017.
- Dane D.S., Cameron C.H., Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated Hepatitis. *The Lancet*. 295, 7649, 695-698, 1970.
- Tsukuda S., Watashi K. Hepatitis B virus biology and life cycle. *Antiviral Res.* 182, 2020.
- Li H., Yan L., Shi Y., Lv D., Shang J., Bai L., Tang H. Hepatitis B Virus Infection: Overview. [book auth.] Tang H. Hepatitis B Virus Infection. Singapore : Springer, Vol. 1179, 1, pp. 4-5.
- Yan H., Zhong G, Xu G. et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLIFE*. 1, 1-28, 2012.
- Iwamoto M., Saso W., Nishioka K. et al. The machinery for endocytosis of epidermal growth factor receptor coordinates the transport of incoming hepatitis B virus to the endosomal network. *PNAS*. 116, 17, 8487-8492, 2019 .
- Schinazi R.F., Ehteshami M., Bassit L., Asselah T. Towards HBV curative therapies. *Liver International*. 38, S1, 102-114, 2018.
- Cui X., McAllister R., Boregowda R., Sohn J.A., Ledesma F.A., Caldecott K.W., Seeger C., Hu J. Does Tyrosyl DNA Phosphodiesterase-2 play a Role in Hepatitis B Virus Genome Repair? *PLOS One*. 10, 6, 1-15, 2015.
- Königer C., Wingerta I., Marsmanna M., Röslera C., Becka J., Nassala M. Involvement of the host DNA-repair enzyme TDP2 in formation of the covalently closed circular DNA persistence reservoir of hepatitis B viruses. *PNAS PLUS*. 111, 40, 4244-4253, 2014.
- Tu T., Budzinska M.A., Vondran F., Shackel N.A., Urban S. Hepatitis B virus DNA integration occurs early in the viral life cycle in an in vitro infection model via NTCP-dependent uptake of enveloped virus particles. *J. Virol.* 92, 11, e02007-17, 2018.
- Seeger C., Mason W.S. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology*. 479-480, 672-686, 2015.
- Tang L., Kottlil S., Wilson E. Strategies to eliminate HBV infection: an update. *Future Virology*. 15, 1, 35-51, 2020.
- Decorsière A., Mueller H., van Breugel P.C., Abdul F., Gerossier L., Beran R.K., Livingston C.M., Niu C., Fletcher S.P., Hantz O., Strubin M. Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. *Nature*. 531, 386-389, 2016.
- Lucifora J., Arzberger S., Durantel D., Belloni L., Strubin M., Levrero M., Zoulim F., Hantz O., Protzer U. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J. Hepatol.* 55, 996-1003, 2011.
- Feitelson M.A., Bonamassa B., Arzumanyan A. The roles of hepatitis B virus-encoded X protein in virus replication and the pathogenesis of chronic liver disease. *Exp. Opin. Ther Targets*. 18, 3, 293-306, 2014.
- Clark D.N., Hu J. Unveiling the roles of HBV poly-

- merase for new antiviral strategies. *Future Virol-ogy*. 10, 3, 283-295, 2015.
24. Edwards T.C., Lomonosova E., Patel J.A., Li Q., Villa J.A., Gupta A.K., Morrison L.A., Bailly F., Cotelte P., Giannakopoulou E. Zoidis, G., Tavis J.E. Inhibition of hepatitis B virus replication by N-hydroxyisoquinolinediones and related polyoxygenated heterocycles. *Antiviral Res.* 25, 143, 205-217, 2017.
 25. Hu J., Liu K. Complete and Incomplete Hepatitis B Virus Particles: Formation, Function, and Application. *Viruses*. 9, 3, 1-17, 2017.
 26. Hepatitis B Foundation. Hepatitis B Foundation. *Hepatitis B-Treatment and Management-Approved Drugs for Adults*. [Online] [Cited: November 17, 2020.] <https://www.hepb.org/treatment-and-management/treatment/approved-drugs-for-adults/>.
 27. Woo A.S.J., Kwok R., Ahmed T. Alpha-interferon treatment in hepatitis B. *ATM: Ann. Transl. Med.* 5, 7, 2017.
 28. Yuan Y., Yuan H., Yang G., Yun H., Zhao M., Liu Z., Zhao L., Geng Y., Liu L., Wang J., ZHANG H., Wang Y., Zhang X.D. IFN- α confers epigenetic regulation of HBV cccDNA minichromosome by modulating GCN5-mediated succinylation of histone H3K79 to clear HBV cccDNA. *Clin. Epigenetics*. 12, 1, 1-16, 2020.
 29. Belloni L., Allweiss L., Guerrieri F., Pediconi N., Volz T., Pollicino T., Petersen J., Raimondo G., Dandri M., Levrero M. IFN- α inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome. *J. Clin. Invest.* 122, 2, 529-537, 2012.
 30. Lucifora J., Xia Y., Reisinger F., Zhang K., Stadler D., Cheng X., Sprinzl M.F., Koppensteiner H., Makowska Z., Volz T., Remouchamps C., Chou W.M., Thasler W.E., Huser N., Durantel D., Liang T.J., Munk C., Heim M.H., Browning J.L., Dejardin E. et al. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science*. 343, 6176, 1221-1228, 2014.
 31. Kwon H., Lok A.S. Hepatitis B therapy. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 8, 275-284, 2011.
 32. Zoulim F., Lebosse F., Levrero M. Current treatments for chronic hepatitis B virus infections. *Curr. Opin. Virol.* 18, 109-116, 2016.
 33. Bayliss J., Yuen L., Rosenberg G., Wong D., Littlejohn M., Jackson K., Gaggar A., Kitrinis K.M. et al. Deep sequencing shows that HBV basal core promoter and precore variants reduce the likelihood of HBsAg loss following tenofovir disoproxil fumarate therapy in HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Gut*. 66, 11, 2013-2023, 2017.
 34. Rouviere C.P., Doussona C.B., Tavis J. HBV replication inhibitors. *Antiviral Res.* 179, 104815, 2020.
 35. Liaw Y., Sung J., Chow W.C. et al. Lamivudine for Patients with Chronic Hepatitis B and Advanced Liver Disease. *New Eng. J. Med.* 351, 15, 1521-1531+1587, 2004.
 36. Su M., Lu A., Li S. et al. Long-term lamivudine for chronic hepatitis B and cirrhosis: A real-life cohort study. *World J. Gastroenterol.* 21, 46, 13087-13094, 2015.
 37. Kwon J.H., Jang J.W., Choi J.Y., Park C., Yoo S.H., Bae S.H., Yoon S.K. Should Lamivudine Monotherapy be Stopped or Continued in Patients Infected With Hepatitis B With Favorable Responses After More Than 5 Years of Treatment? *J. Med. Virol.* 85, 1, 35-42, 2013.
 38. Eun J.R., Lee H.J., Kim T.N., Lee K.S. Risk assessment for the development of hepatocellular carcinoma: According to on-treatment viral response during long-term lamivudine therapy in hepatitis B virus-related liver disease. *J. Hepatol.* 53, 1, 118-125, 2010.
 39. Abd El Aziz M.A., Sacco R., Facciorusso A. Nucleos(t)ide analogues and Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: A literature review. *Antivir. Chem. Chemother.* 28, 1-8, 2020.
 40. Kim J.H., Sinn D.H., Kang W. et al. Low-level viremia and the increased risk of hepatocellular carcinoma in patients receiving entecavir treatment. *Hepatology*. 66, 2, 335-343, 2016.
 41. Liaw Y., Gane E., Leung N. et al. 2-Year GLOBE Trial Results: Telbivudine Is Superior to Lamivudine in Patients With Chronic Hepatitis B. *Gastroenterology*. 136, 2, 486-495, 2009.
 42. Hou J., Yin Y., Xu D. et al. Telbivudine Versus Lamivudine in Chinese Patients with Chronic Hepa-

- titis B: Results at 1 Year of a Randomized, Double-Blind Trial. *Hepatology*. 47, 2, 447-454-2008.
43. Lai C., Gane E., Liaw Y. et al. Telbivudine versus Lamivudine in Patients with Chronic Hepatitis B. *New Eng. J. Med.* 357, 25, 2576-2588, 2007.
44. Tsai M.C., Chen C.H., Hung C.H., Lee C.M., Chiu K.W., Wang J.H., Lu S.N., Tseng P.L., Chang K.C., Yen Y.H., Hu T.H. A comparison of efficacy and safety of 2-year telbivudine and entecavir treatment in patients with chronic hepatitis B: a match-control study. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 2, 90-100, 2014.
45. Yip C., Wong W., Chan L., Tse Y.K., Lui C., Wong L.H. Tenofovir is Associated With Lower Risk of Hepatocellular Carcinoma Than Entecavir in Patients With Chronic HBV Infection in China. *Gastroenterology*. 158, 1, 215-225, 2020.
46. Zhang Z., Zhou Y., Yang J., Hu K., Huang Y. The effectiveness of TDF versus ETV on incidence of HCC in CHB patients: a meta analysis. *BMC Cancer*. 19, 511, 1-9, 2019.
47. Lopatin, U. Drugs in the Pipeline for HBV. *Clin. Liver Dis.* 23, 3, 535-555, 2019.
48. Brodski M., Bäckström B., Horvath K., Larsson T., Malmgren H., Pelcman M., Wehling H., Wallberg H., Wennerberg J. Synthesis of the hepatitis B nucleoside analogue lagociclovir valactate. *Org. Process Res. Dev.* 15, 5, 1027-1032, 2011.
49. Rijckborst V., Sonneveld M.J., Janssen H.L.A. Review article: Chronic hepatitis B - Anti-viral or immunomodulatory therapy? *Aliment. Pharmacol. Ther.* 33, 5, 501-513, 2011.
50. Marcellin P., Ahn S.H., Ma X., Caruntu F.A., Tak W.Y., Elkashab M. et al. Combination of Tenofovir Disoproxil Fumarate and Peginterferon α -2a Increases Loss of Hepatitis B Surface Antigen in Patients with Chronic Hepatitis B. *Gastroenterology*. 150, 1, 134-144, 2016.
51. Kim V., Abreu R.M., Nakagawa D.M., Baldassare R.M., Carrilho F.J., Ono S.K. Pegylated interferon alfa for chronic hepatitis B: Systematic review and meta-analysis. *J. Viral Hepat.* 23, 3, 154-169, 2016.
52. Zhu F., Zhang Q., Zhang Q., Zhang D. Effects of IFN monotherapy versus combined therapy on HBeAg seroconversion or seroclearance in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients: A meta-analysis. *Microb. Pathog.* 139, 103912, 2020.
53. Gripon P., Canine I., Urban S. Efficient Inhibition of Hepatitis B Virus Infection by Acylated Peptides Derived from the Large Viral Surface Protein. *J. Virol.* 79, 3, 1613-1622, 2005.
54. Glebe D., Urban S., Knoop E., Cag N., Krass P., Grun S., Bulavaite A., Sasnauskas K., Gerlich W. Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes. *Gastroenterology*. 129, 1, 234-245, 2005.
55. Petersen J., Dandri M., Mier W., Lutgehetmann M., Volz T., Weizsacker F.v., Haberkorn U. Fischer, L., Pollok J., Erbes B., Seitz S., Urban S. Prevention of hepatitis B virus infection in vivo by entry inhibitors derived from the large envelope protein. *Nature Biotechnology*. 26, 3, 335-341, 2008.
56. Passioura T., Watashi K., Fukano K., Shimura S., Saso W., Morishita R., Ogasawara Y., Tanaka Y., Mizokami M., Sureau C., Suga H., Wakita T. De Novo Macrocyclic Peptide Inhibitors of Hepatitis B Virus Cellular Entry. *Cell Chem.Biol.* 25, 7, 906-915, 2018.
57. Schulze A., Schieck A., Ni Y., Mier W., Urban S. Fine Mapping of Pre-S Sequence Requirements for Hepatitis B Virus Large Envelope Protein-Mediated Receptor Interaction. *J. Virol.* 84, 4, 1989-2000, 2010.
58. Volz T., Allweiss L., MBareck M.B., Warlich M., Lohse A.W., Pollok J.M., Alexandrov A., Urban S., Petersen J., Lutgehetmann M., Dandri M. The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks intrahepatic virus spreading in humanized mice previously infected with hepatitis B virus. *J. Hepatol.* 58, 5, 861-867, 2013.
59. Zhao K., Liu S., Chen Y., Yao Y., Zhou M., Yuan Y., Wang Y., Pei R., Chen J., Hu X., Zhou Y., Zhao H., Lu M., Wu C., Chen X. Upregulation of HBV transcription by sodium taurocholate cotransporting polypeptide at the postentry step is inhibited by the entry inhibitor Myrcludex B. *Emerg. Microbes & Infect.* 7, 1, 1-14, 2018.
60. Blank A., Markert C., Hohmann N., Carls A., Mikus G., Lehr T., Alexandrov A., Haag M., Schwab M., Ur-

- ban S., Haefeli W.E. First-in-human application of the novel hepatitis B and hepatitis D virus entry inhibitor myrcludex B. *J. Hepatol.* 65, 3, 483-489, 2016.
61. Uhl P., Helm F., Hofhaus G., Brings S., Kaufman C., Leotta K., Urban S., Haberkorn U., Mier W., Fricker G. A liposomal formulation for the oral application of the investigational hepatitis B drug Myrcludex B. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 103, 159-166, 2016.
 62. Blank A., Meier K., Urban S., Haefeli W.E., Weiss J. Drug-drug interaction potential of the HBV and HDV entry inhibitor myrcludex B assessed in vitro. *Antivir. Ther.* 23, 3, 267-275, 2018.
 63. Lucifora J., Esser K., Protzer U. Ezetimibe blocks hepatitis B virus infection after virus uptake into hepatocytes. *Antiviral Res.* 97, 2, 195-197, 2013.
 64. Watashi K., Sluder A., Daito T., Matsunaga S., Ryo A., Nagamori S., Iwamoto M., Nakajima S., Tsukuda S., Borroto-Esoda K., Sugiyama M., Tanaka Y., Kanai Y., Kusuhara H., Mizokami M., Wakita T. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter, sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). *Hepatology.* 59, 5, 1726-1737, 2014.
 65. Nkongolo S., Ni Y., Lempp F.A., Kaufman C., Lindner T., Esser-Nobis K., Lohmann V., Mier W., Mehrle S., Urban S. Cyclosporin A inhibits hepatitis B and hepatitis D virus entry by cyclophilin-independent interference with the NTCP receptor. *J. Hepatol.* 60, 4, 723-731, 2014.
 66. Fukano K., Tsukuda S., Oshima M., Suzuki R., Aizaki H., Ohki M., Park S., Muramatsu M., Wakita T., Sureau C., Ogasawara Y., Watashi K. Troglitazone impedes the oligomerization of sodium taurocholate cotransporting polypeptide and entry of hepatitis B virus into hepatocytes. *Front. Microbiol.* 10, 1-14, 2019.
 67. Wang X., Hu W., Zhang T., Mao Y., Liu N., Wang S. Irbesartan, an FDA approved drug for hypertension and diabetic nephropathy, is a potent inhibitor for hepatitis B virus entry by disturbing Na⁺-dependent taurocholate cotransporting polypeptide activity. *Antiviral Res.* 120, 140-146, 2015.
 68. Donkers J.M., Zehnder B., Westen G.J.P.v., Kwakkenbos M.J., Ijzerman A.P., Elferink R.P.J.O., Beuers U., Urban S., Graaf S.F.J.v.d. Reduced hepatitis B and D viral entry using clinically applied drugs as novel inhibitors of the bile acid transporter NTCP. *Sci. Rep.* 7 (1), 1-13, 2017.
 69. Iwamoto M., Watashi K., Tsukuda S., Aly H.H., Fukasawa M., Fujimoto A., Suzuki R., Aizaki H., Ito T., Koiwai O., Kusuhara H., Wakita T. Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443, 3, 808-813, 2014.
 70. Huang H., Tao M., Hung T., Chen J., Lin Z., Huang C. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits entry of hepatitis B virus into hepatocytes. *Antiviral Res.* 111, 100-111, 2014.
 71. Matsunaga H., Kamisuki S., Kaneko M., Yamaguchi Y., Takeuchi T., Watashi K., Sugawara F. Isolation and structure of vanitaracin A, a novel anti-hepatitis B virus compound from *Talaromyces* sp. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015, Vol. 25, 19, pp. 4325-4328.
 72. Kaneko M., Watashi K., Kamisuki S., Matsugana H., Iwamoto M., Kawai F., Ohashi H., Tsukuda S., Shimura S., Suzuki R., Aizaki H., Sugiyama M., Park S., Ito T., Ohtani N., Sugawara F., Tanaka Y., Mizokami M., Sureau C., Wakita T. A Novel Tricyclic Polyketide, Vanitaracin A, Specifically Inhibits the Entry of Hepatitis B and D Viruses by Targeting Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide. *J. Virol.* 89, 23, 11945-11953, 2015.
 73. Xiang H., Chen Y., Zhang J., Zhang J., Pan D., Liu B., Ouyang L. Discovery of a novel sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) inhibitor: Design, synthesis, and anti-proliferative activities. *Chin. Chem. Lett.* 31, 6, 1422-1426, 2020.
 74. Wi J., Jeong M.S., Hong H.J. Construction and characterization of an anti-hepatitis B virus preS1 humanized antibody that binds to the essential receptor binding site. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 7, 1336-1344 2017.
 75. Hong H.J., Ryu C.J., Hur H., Kim S., Oh H.K., Oh M.S., Park S.Y. In vivo neutralization of hepatitis B virus infection by an anti-preS1 humanized antibody in

- chimpanzees. *Virology*. 318, 1, 134-141, 2004.
76. Zhang T., Yuan Q., Zhao J., Zhang Y., Yuan L., Lan Y., Lo Y., Sun C., Wu C., Zhang J., Zhang Y., Cao J., Guo X., Liu X., Mo X., Luo W., Cheng T., Chen Y., Tao M., Yuan Y., Xia N. Prolonged suppression of HBV in mice by a novel antibody that targets a unique epitope on hepatitis B surface antigen. *Gut*. 65, 4, 658-671, 2016 .
77. Li D., He W., Liu X., Zheng S., Qi Y., Li H., Mao F., Liu J., Sun Y., Pan L., Du K., Ye K., Li W., Sui J. A potent human neutralizing antibody Fc-dependently reduces established HBV infections. *eLife*. 6, 1-30, 2017.
78. Neumann A.U., Phillips S., Levine I., Ijaz S., Dahari H., Eren R., Dagan S., Naoumov N.V. Novel mechanism of antibodies to hepatitis B virus in blocking viral particle release from cells. *Hepatology*. 52, 3, 875-885, 2010.
79. Galun E., Eren R., Safadi R., Ashour Y., Terrault N., Keeffe E.B., Matot E., Mizrachi S., Terkieltaub D., Zohar M., Lubin I., Gopher J., Shouval D., Dagan S. Clinical Evaluation (Phase I) of a Combination of Two Human Monoclonal Antibodies to HBV: Safety and Antiviral Properties. *Hepatology*. 35, 3, 673-679, 2002.
80. Revill P.A., Chisari F.V., Block J.M. et al. A global scientific strategy to cure hepatitis B. *Lancet Gastroenterol. Hepatol*. 4, 7, 545-558, 2019 .
81. Fanning G.C., Zoulim F., Hou J., Bertoletti A. Therapeutic strategies for hepatitis B virus infection: towards a cure. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2019, Vol. 18, 11, pp. 827-844.
82. Seeger C., Sohn J.A. Complete spectrum of CRISPR/Cas9-induced mutations on HBV cccDNA. *Mol. Ther*. 24, 7, 1258-1266, 2016.
83. Morikawa K., Suda G., Sakamoto N. Viral life cycle of hepatitis B virus: Host factors and druggable targets. *Hepatology Res*. 46, 9, 871-877, 2016 .
84. Cai D., Mills C., Yu W., Yan R., Aldrich C., Saputelli J., Mason W., Xu X., Guo J., Block T., Cuconati A., Guo H. Identification of disubstituted sulfonamide compounds as specific inhibitors of hepatitis B virus covalently closed circular DNA formation. *Antimicrob. Agents Chemother*. 56, 8, 4277-4288, 2012.
85. Cradick T., Keck K., Bradshaw S., Jamieson A., McCaffrey A. Zinc-finger nucleases as a novel therapeutic strategy for targeting hepatitis B virus DNAs. *Mol. Ther*. 18, 5, 947-954, 2010.
86. Chen J., Zhang W., Lin J., Wang F., Wu M., Chen C., Zheng Y., Peng X., Li J., Yuan Z. An efficient antiviral strategy for targeting hepatitis B virus genome using transcription activator-like effector nucleases. *Mol. Ther*. 22, 2, 303-311, 2014.
87. Bertoletti A., Gehring A.J. The immune response during hepatitis B virus infection. *J. Gen. Virol*. 87, 6, 1439-1449, 2006.
88. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 124, 4, 783-801, 2006.
89. Sulsov A., Wieland S., Menne S. Modulators of innate immunity as novel therapeutics for treatment of chronic hepatitis B. *Curr. Opin. Virol*. 30, pp. 9-17, 2018.
90. Du K., Liu J., Broering R., Zhang X., Yang D., Dittmer U., Lu M. Recent advances in the discovery and development of TLR ligands as novel therapeutics for chronic HBV and HIV infections. *Exp. Opin. Drug Discov*. 13, 7, 661-670, 2018 .
91. Meng Z., Chen Y., Lu M. Advances in Targeting the Innate and Adaptive Immune Systems to Cure Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Front. Immunol*. 10, 1-16, 2020 .
92. Gane E., Pastagia M., De Creus A., Schwabe C., Vandenbossche J., Slaets L., Fevery B., Wu L.S., Li R., Siddiqui S., Oey A., Musto C., Bryan B., Van Remoortere P. A Phase 1, double-blind, randomized, placebo-controlled, first-in-human study of the safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral JNJ-64794964, a toll-like receptor-7 agonist, in healthy adults. *J. Hepatol*. 70, 478, 2019 .
93. Janssen H.L.A., Brunetto M.R., Kim Y.J., Ferrari C., Massetto B., Nguyen A., Joshi A., Woo J., Lau A.H., Gaggar A., Subramanian G.M., Yoshida E.M., Ahn S.H., Tsai N.C.S., Fung S., Gane E.J. Safety, efficacy and pharmacodynamics of vesatolimod (GS-9620) in virally suppressed patients with chronic hepatitis B. *J. Hepatol*. 68, 3, 431-440, 2018.
94. Agarwal K., Ahn S.H., Elkhatab M., Lau A.H., Gag-

- gar A., Bulusu A., Tian X., Cathcart A.L., Woo J., Subramanian G.M., Andreone P., Kim H.J., Chuang W.L., Nguyen M.H. Safety and efficacy of vesatolimod (GS-9620) in patients with chronic hepatitis B who are not currently on antiviral treatment. *J. Viral Hepat.* 25, 11, 1331-1340, 2018.
95. Mackman R., Mish M., Chin G. et al. Discovery of GS-9688 (Selgantolimod) as a Potent and Selective Oral Toll-Like Receptor 8 Agonist for the Treatment of Chronic Hepatitis B. *J. Med. Chem.* 63, 18, 10188-10203, 2020.
 96. McGowan D., Herschke F., Pauwels F. Stoops B., Last S., Pieters S., Scholliers A., Thone T., Van Schoubroeck B., De Pooter D., Mostmans W., Khamlichi M.D., Embrechts W., Dhuyvetter D., Smyej I., Arnoult E., Demin S., Borghys H., Fanning G., Vlach J. Novel Pyrimidine Toll-like Receptor 7 and 8 Dual Agonists to Treat Hepatitis B Virus. *J. Med. Chem.* 59, 17, 7936-7949, 2016.
 97. Embrechts W., Herschke F., Pauwels F. et al. 2,4-Diaminoquinazolines as Dual Toll-like Receptor (TLR) 7/8 Modulators for the Treatment of Hepatitis B Virus. *J. Med. Chem.* 61, 14, 6236-6246, 2018.
 98. Korolowicz K., Iyer R., Czerwinski S. et al. Antiviral efficacy and host innate immunity associated with SB 9200 treatment in the woodchuck model of chronic hepatitis B. *PLoS ONE.* 11, 8, 1-21, 2016.
 99. Suresh M., Korolowicz K., Balarezo M. et al. Antiviral efficacy and host immune response induction during sequential treatment with SB 9200 followed by entecavir in woodchucks. *PLoS ONE.* 12, 1, 1-20, 2017.
 100. Locarnini S., Wong D., Jackson K., Walsh R., Edwards R., Hammond R., Macfarlane C., Iyer R.P., Afdhal N.H., Yuen M. Novel anti-viral activity of SB 9200, a rigi agonist; results from cohort 1 of the achieve trial. *Hepatology.* 66, 6, 1269A-1270A, 2017.
 101. Burton A., Pelletier N., Maini M. et al. Circulating and intrahepatic antiviral B cells are defective in hepatitis B. *J. Clin. Invest.* 128, 10, 4588-4603, 2018.
 102. Fiscaro P., Valdatta C., Massari M. et al. Antiviral Intrahepatic T-Cell Responses Can Be Restored by Blocking Programmed Death-1 Pathway in Chronic Hepatitis B. *Gastroenterology.* 138 (2), 682-693, 2010.
 103. Liu J., Zhang E., Ma Z. et al. Enhancing Virus-Specific Immunity In Vivo by Combining Therapeutic Vaccination and PD-L1 Blockade in Chronic Hepadnaviral Infection. *PLoS Pathogens.* 10, 1, 1-14, 2014.
 104. Dong H., Zhu G., Tamada K., Flies D.B., van Deursen J.M.A., Chen L. B7-H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic CD8+ T lymphocytes. *Immunity.* 20, 3, 327-336, 2004.
 105. El-Khoueiry A., Sangro B., Yau T. et al. Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *The Lancet.* 389, 10088, 2492-2502, 2017.
 106. Gish R., Yuen M., Chan H., Given B., Lai C., Locarnini S., Lau J., Wooddell C., Schluep T., Lewis D. Synthetic RNAi triggers and their use in chronic hepatitis B therapies with curative intent. *Antiviral Res.* 121, 97-108, 2015.
 107. Grimm D., Thimme R., Blum H. HBV life cycle and novel drug targets. *Hepatol. Int.* 5 (2), 644-653, 2011.
 108. Tavis J., Lomonosova E. The hepatitis B virus ribonuclease H as a drug target. *Antiviral Res.* 118, 132-138, 2015.
 109. Edwards T.C., Ponzar N., Tavis J. Shedding light on RNaseH: a promising target for hepatitis B virus (HBV). *Exp. Opin. Ther. Targets.* 23, 7, 559-563, 2019.
 110. Gerelsaikhon T., Tavis J., Bruss V. Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. *J. Virol.* 20, 7, 4269-4274, 1996.
 111. Nowotny M., Gaidamakov S., Crouch R., Yang W. Crystal structures of RNase H bound to an RNA/DNA hybrid: Substrate specificity and metal-dependent catalysis. *Cell.* 121, 7, 1005-1016, 2005.
 112. Nowotny M., Yang W. Stepwise analyses of metal ions in RNase H catalysis from substrate destabilization to product release. *EMBO J.* 25, 9, 1924-1933, 2006.

113. Tavis J., Zoidis G., Meyers M. Murelli R. Chemical Approaches to Inhibiting the Hepatitis B Virus Ribonuclease H. *ACS Infectious Diseases*. 5, 5, 655-658, 2019.
114. Tramontano E., Corona A., Mendez-Arias L. Ribonuclease H, an unexploited target for antiviral intervention against HIV and hepatitis B virus. *Antiviral Res.* 171, 104613, 2019 .
115. Hu Y., Cheng X., Cao F., Huang A., Tavis J. b -Thujaplicinol inhibits hepatitis B virus replication by blocking the viral ribonuclease H activity. *Antiviral Res.* 99, 221-229, 2013 .
116. Lu G., Lomonosova E., Cheng X. et al. Hydroxylated Tropolones Inhibit Hepatitis B Virus Replication by Blocking Viral Ribonuclease H Activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 2, 1070-1079, 2015.
117. Lomonosova E., Daw J., Garimallaprabhakaran A., Agyemang N., Ashani Y., Murelli R., Tavis J. Efficacy and cytotoxicity in cell culture of novel α -hydroxytropolone inhibitors of Hepatitis B virus ribonuclease H. *Antiviral Res.* 144, 164-172, 2017.
118. Agyemang N., Kukla C., Li Q. et al. Divergent synthesis of a thiolate-based α - hydroxytropolone library with a dynamic bioactivity profile. *RSC Advances*. 9, 59, 34227-34234, 2019.
119. Berkowitz A., Abdelmessih R., Murelli R. Amidation strategy for final-step α -hydroxytropolone diversification. *Tetrahedron Lett.* 59, 31, 3026-3028, 2018.
120. Li Q., Lomonosova E., Dollin M. et al. Amide-containing α -hydroxytropolones as inhibitors of hepatitis B virus replication. *Antiviral Res.* 177, 104777, 2020.
121. Bak E., Miller J., Noronha A., Tavis J., Gallicchio E., Murelli R., Grice S. 3,7-Dihydroxytropolones inhibit initiation of hepatitis B virus minus-strand DNA synthesis. *Molecules*. 25, 19, 1-14, 2020.
122. Cai C., Lomonosova E., Moran E., Cheng X., Patel K., Bailly F., Cotel P., Meyers M., Tavis J. Hepatitis B virus replication is blocked by a 2-hydroxyisoquinoline-1,3(2H, 4H)-dione (HID) inhibitor of the viral ribonuclease H activity. *Antiviral Res.* 108, 48-55, 2014.
123. Huber A., Michailidis E., Tang J. et al. 3-hydroxypyrimidine-2,4-diones as novel hepatitis b virus antivirals targeting the viral ribonuclease H. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, 6, 1-10, 2017.
124. Edwards T., Mani N., Dorsey B., Kakarla R., Rijnbrand R., Sofia M., Tavis J. Inhibition of HBV replication by N-hydroxyisoquinolinedione and N-hydroxypyridinedione ribonuclease H inhibitors. *Antiviral Res.* 164, 70-80, 2019.
125. Tavis J., Cheng X., Hu Y. et al. The Hepatitis B Virus Ribonuclease H Is Sensitive to Inhibitors of the Human Immunodeficiency Virus Ribonuclease H and Integrase Enzymes. *PLoS Pathogens*. 9, 1, 1-15, 2013.
126. Long K., Lomonosova E., Li Q. et al. Efficacy of hepatitis B virus ribonuclease H inhibitors, a new class of replication antagonists, in FRG human liver chimeric mice. *Antiviral Res.* 149, 41-47, 2018.

Το *Portulaca oleracea* είναι θεραπευτικό φυτό; Νεότερα δεδομένα

Ελισάβετ-Φωτεινή Βαρβούνη^α, Κωνσταντία Γκραίκου^α, Γεώργιος Α. Καρίκας^β, Ιωάννα Χήνου^{α,*}

“Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας,
Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου, 157 01 Αθήνα

^bΤμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Αθήνα 12243

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:

Portulaca oleracea:

Χημικά συστατικά; Ω-3

λιπαρά οξέα:

Βιολογικές δράσεις:

Θεραπευτικές εφαρμογές

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το είδος *Portulaca oleracea* αποτελεί ένα αρκετά διαδεδομένο φυτό που χρησιμοποιείται ως βρώσιμο (υπέργεια μέρη), αλλά και ως φαρμακευτικό για τις διατροφικές και θεραπευτικές του ιδιότητες, χάρις στα βιοδραστικά συστατικά του, αλλά και τη δια-θεραπευτική του αξία. Έχει ήδη αναφερθεί από την αρχαιότητα με το όνομα «αντράκλα» για την ανακούφιση ευρέως φάσματος παθήσεων, όπως: αντιμετώπιση πονοκεφάλων, φλεγμονών, στομαχικών και αναπνευστικών παθήσεων, πυρετού, πληγών και ελκών. Περιέχει μεγάλη ποικιλία μεταβολιτών όπως: φαινολικές ουσίες, λιπαρά οξέα, στερόλες, αλκαλοειδή, τερπενοειδή, οργανικά οξέα, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία, ενώ τα σπέρματα θεωρούνται πλούσια πηγή ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων. Πρόσφατα δεδομένα των φαρμακολογικών του δράσεων από *in vitro/in vivo* πειράματα και κλινικές μελέτες αναφέρουν υπογλυκαιμική, υπολιπιδική, νευροπροστατευτική και ηπατοπροστατευτική δράσεις, ενώ στην παρούσα ανασκόπηση αναλύονται οι παραδοσιακές χρήσεις, η φυτοχημεία, οι τεκμηριωμένες φαρμακολογικές δράσεις και η ασφαλής χρήση του. Λόγω του ιδιαίτερου φυτοχημικού του προφίλ και του εύρους των φαρμακολογικών δράσεων του, το είδος *P. oleracea* συμπεριλαμβάνεται στην καθημερινή διατροφή σε πολλές χώρες, αλλά επίσης χρησιμοποιείται εφαρμοσμένα στη κοσμητολογία καθώς και σε συμπληρώματα διατροφής.

*ΣΥΓΓΡΑΦΕΑΣ

ΑΛΛΗΛΟΓΡΑΦΙΑΣ:

I. Xήνου, ichinou@pharm.uoa.gr

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το είδος *Portulaca oleracea*, η γνωστή αντράκλα ή γλιστρίδα, καταναλώνεται σε πολλές περιοχές της Ευρώπης και της Μεσογείου. Χαρακτηρίζεται από

ευρεία γεωγραφική εξάπλωση σε εύκρατες χώρες του κόσμου ^{1,2}.

Η *P. oleracea* είναι θεραπευτικό φυτό της Ευρώπης, του Ιράν και της Ινδίας, με ιστορία αρχαιότερη των 2.000 ετών. Κατατάσσεται από τον Παγκόσμιο

Οργανισμό Υγείας (WHO) ως ένα από τα πλέον χρησιμοποιούμενα φυτοθεραπευτικά και σύμφωνα με πολλούς ερευνητές θεωρείται “παγκόσμια πανάκεια”³. Εμφανίζει εύρος θεραπευτικών ιδιοτήτων με ποικίλες αναφορές στην παραδοσιακή θεραπευτική και χρήσεις για τη θεραπεία εγκαυμάτων, πονοκεφάλων, αλλά και διαφόρων γαστρεντερικών και αναπνευστικών νοσημάτων^{1,4}. Έχει σημαντικές εφαρμογές στη φυτοθεραπεία, λόγω των μυοχαλαρωτικών και αντιφλεγμονωδών δράσεών της⁴.

Κατατάσσεται ανάμεσα στις πλούσιες φυτικές πηγές ω-3 λιπαρών οξέων και ειδικότερα του alpha-linolenic acid (ALA). Ως γνωστόν, τα ω-3 αποτελούν απαραίτητα λιπαρά οξέα για τη διατήρηση της υγείας, δρώντας προληπτικά, αλλά και θεραπευτικά στην αντιμετώπιση παθήσεων όπως, στεφανιαίας νόσου, υπέρτασης, διαβήτη, αρθρίτιδας, και άλλων φλεγμονωδών και αυτοάνοσων παθήσεων^{1,5}, λόγω της χαμηλής σχέσης ω-6/ω-3 λιπαρών, που της προσδίδει υψηλή δια-θεραπευτική αξία, με σημαντικό ρόλο και στην φυσιολογική λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος⁶.

Το φυτικό αυτό είδος συνιστά σημαντική πηγή βιο-δραστικών μεταβολιτών με αντιοξειδωτική δράση. Οι τοκοφερόλες, οι βιταμίνες A, C και του συμπλέγματος B, δρουν προληπτικά σε καρδιαγγειακές παθήσεις και σε λοιμώδη νοσήματα, ενώ η βιταμίνη A είναι πολύτιμη στην λειτουργία της όρασης. Το φαινολικό φορτίο του φυτού συμβάλλει επίσης θετικά έναντι της αθηροσκλήρωσης και του διαβήτη⁷. Μειονέκτημα αποτελεί η ύπαρξη οργανικών οξέων στα υπέργεια μέρη του φυτού όπως π.χ. οξαλικού και κιτρικού, που μπορούν να συνδεθούν με μεταλλικά ιόντα με σχηματισμό αδιάλυτων αλάτων (π.χ. οξαλικού ασβεστίου), αυξάνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης νεφρολιθίαςης¹.

Τα τελευταία χρόνια η *P. oleracea* προσελκύει φυτοθεραπευτικό ενδιαφέρον σε σχέση με τη δυναμική αξιοποίηση διαφορετικών τμημάτων, πέραν της βρώσης του, σε συνάρτηση με τις πολλές βιολογικές του δράσεις.

1.1 Βοτανική Περιγραφή

Η *P. oleracea* είναι μονοετές φυτικό είδος, μέτρι-



Εικόνα 1. Καρποί *P. oleracea*, κάψα με μικροσκοπικά μαύρα σπέρματα.

Πηγή: <https://www.onlyfoods.net/wp-content/uploads/2012/04/Portulaca-Oleracea-Seeds.jpg>

ας ανάπτυξης, με σαρκώδεις βλαστούς και φύλλα. Συνήθως εμφανίζει έρπουσα ανάπτυξη. Τα φύλλα είναι λεία, σαρκώδη και φύονται κατ' εναλλαγή στο στέλεχος. Τα άνθη είναι κίτρινα και μικρά και συναντώνται στις μασχάλες των φύλλων ή στα σημεία διακλαδώσεων του βλαστού, εξελίσσονται σε σφαιροειδείς κάψες με πολλά μικροσκοπικά, μαύρα γυαλιστερά σπέρματα (**Εικόνα 1**)^{2,8}.

1.2 Δρογογετυμολογία

Η συνήθης κοινή ελληνική ονομασία είναι «αντράκλα», ενώ σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές αναφέρεται και ως: αντραχλίδα, σκλημίτσα, χοιροβότανο, τρευλό ή γλιστρίδα⁹. Κοινές αγγλικές ονομασίες είναι: purslane, duckweed, little hogweed, parsley, ενώ σε Αυστραλία και Η.Π.Α. αναφέρεται ως pigweed (επειδή έχει χρησιμοποιηθεί ως τροφή χοίρων), αλλά και purslane, στη Γαλλία pourpier potager και στη Κίνα ως Ma-Chi-Xian⁸.

Το όνομα *Portulaca* θεωρείται ότι προέρχεται από τη λατινική λέξη «porto» που σημαίνει «φέρω», και «lac» που σημαίνει «γάλα», αφού το φυτό εκκρίνει

γαλακτώδη χυμό ², ενώ άλλοι ερευνητές αναφέρουν ότι προέρχεται από την λατινική λέξη «portula» που σημαίνει «μικρή πόρτα», παραπέμποντας στο άνοιγμα του καρπού.

1.3 Δρογοϊστορία

Το είδος *P. oleracea* αναφέρεται για τη θεραπεία πολυάριθμων νόσων από την αρχαιότητα, καθώς και ως βότανο κατά της μαγειρίας, αφού διασκορπισμένο γύρω από το κρεβάτι θεωρείτο ότι παρέχει προστασία από κακά πνεύματα και εφιάλτες ². Στην αρχαία Ρώμη το είδος χρησιμοποιούταν για την αντιμετώπιση πονοκεφάλων και δυσεντερίας, σκωλήκων των εντέρων και δηγμάτων σαυρών. Περιγράφεται ότι έχει ορεξιόγόνες ιδιότητες, ενώ παλαιότερα στην Κρήτη το συνιστούσαν στους πάσχοντες από αιμορροΐδες. Αναφορές από την παραδοσιακή κινεζική ιατρική συνιστούν τη χρήση των φύλλων του στην αντιμετώπιση δηγμάτων από έντομα ή φίδια, την επούλωση πληγών, τη βακτηριακή δυσεντερία, τις αιμορροΐδες, αιμορραγία μετά τον τοκετό κ.ά. Αναφορές των θεραπευτικών ιδιοτήτων του φυτού υπάρχουν από τον Θεόφραστο (372-287 π.Χ.), που το μνημονεύει ως φάρμακο για την καρδιακή ανεπάρκεια, τον πονόλαιμο, ωταλγίες, αρθρικά οιδήματα και ξηροδερμία. Ο Διοσκουρίδης (40 μ.Χ. - 90 μ.Χ.) στο βιβλίο του “Περί ύλης Ιατρικής” (De Materia Medica) προτείνει τη χρήση του σε έλκος στομάχου και πονοκέφαλο, ως αναλγητικό, καταπραϋντικό, αντιπυρετικό και αντιυπερτασικό, κατά της δυσεντερίας, σε δήγματα σαυρών και φιδιών και σε παθήσεις του ουροποιητικού και πεπτικού συστήματος. Ο Πλίνιος (1^{ος} αιώνας μ.Χ.) ανέφερε το είδος με το όνομα «porcilaca» και το θεωρούσε ως πραγματική πανάκεια στο έργο του, “Naturalis Historia” ¹⁰. Ακόμα, ο Άγγλος συγγραφέας και βοτανικός, Evelyn, στο βιβλίο του «Acetaria» (1699), αναφέρει το φυτό ως «Purslain» και «Portulaca» και το περιγράφει ως ενυδατικό και δροσιστικό στην αντιμετώπιση της δίψας και ως ενισχυτικό της όρεξης ¹¹.

2. ΕΘΝΟΒΟΤΑΝΙΚΗ-ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΕΣ ΧΡΗΣΕΙΣ

Το φυτό χρησιμοποιήθηκε για διατροφή, αλλά και για την αντιμετώπιση ασθενειών από τους αρχαί-

ους Έλληνες και τους Ρωμαίους (Κεφ. 1.3), ενώ αναφέρεται συχνά και σε εναλλακτικά συστήματα θεραπευτικής, όπως σε Ayurveda και Unani. Η πρώτη καταγεγραμμένη χρήση του χρονολογείται περί του 500 μ.Χ., στην Κίνα. Παραδοσιακά, αναφέρεται ως ξινό στη γεύση, με ανακουφιστικές, αποτοξινωτικές και αιμοστατικές ιδιότητες. Ιθαγενείς πληθυσμοί της Αμερικής (Ινδιάνοι) χρησιμοποιούσαν το φυτό στη θεραπεία του κρυολογήματος και ως αφέψημα στην αντιμετώπιση αρθρίτιδας και κεφαλαλγίας, ενώ ο χυμός του σε φλεγμονές των γεννητικών οργάνων άρρενος ή έγχυμα των φύλλων με λινέλαιο (αλοιφή) σε μυϊκούς πόνους του αυχένα. Στην παραδοσιακή Κινεζική Ιατρική είναι γνωστό ως «λαχανικό για μεγάλη διάρκεια ζωής», λαμβάνεται από το στόμα για τη θεραπεία δυσεντερίας και εξωτερικά σε οιδήματα, αιμορραγίες (μήτρας, αιμορροΐδων, πληγών), σε ερυσίτελας, εκζέματα, δήγματα φιδιών/εντόμων. Προτείνεται επίσης στη θεραπεία καρδιαγγειακών παθήσεων, δυσουρίας, δυσεντερίας και στοματικών ελκών. Φρέσκα φύλλα εφαρμόζονταν εξωτερικά για αναλγησία και ως δροσιστικό, ή για τη διουρητική του δράση (έγχυμα).

Στην Παραδοσιακή Ιατρική της Ευρώπης έχει χρησιμοποιηθεί στην Ιταλία, έναντι κεφαλαλγίας, δυσεντερίας, εντερικών παράσιτων, ουροποιογεννητικών λοιμώξεων, δήγματα ερπετών, αιμορροΐδες, σε ουλίτιδες, δερματικά εξανθήματα και ακμή. Στην Ελλάδα καταναλωνόταν νωπό ή μαγειρεμένο, κατά τους χειμερινούς μήνες, αποξηραμένο ως τσάι για πονόλαιμο και ωταλγία, καθώς και για την αντιμετώπιση υψηλών επιπέδων χοληστερόλης. Στην Ισπανία τα σπέρματα λαμβάνονταν από του στόματος σε αναπνευστικά προβλήματα, βήχα, ανορεξία, υψηλό πυρετό και εξωτερικά σε άφθες. Τα υπέργεια μέρη για την αντιμετώπιση βήχα, συχνουρίας, υπέρτασης, κεφαλαλγίας και αρθραλγίας. Στην Κύπρο τα υπέργεια μέρη χορηγούνται για ανακούφιση ψυχικών διαταραχών, μυοσκελετικών προβλημάτων και σε καρδιαγγειακές παθήσεις. Στην Αφρική έχει επίσης πολλές παραδοσιακές χρήσεις όπως έναντι: υπερχοληστερολαιμίας, δύσπνοιας, γαστρικών προβλημάτων, διαβήτη, υπέρτασης, ιγμορίτιδας, ωταλγίας, πονόδοντου, ως παρασιτοκτόνο κ.ά.

Συνοπτικά, οι πιο συχνές αναφορές σε παραδο-

σιακές χρήσεις της *P. oleracea* φαίνεται να είναι για τη θεραπεία πονοκέφαλου, φλεγμονών, οδοντικών προβλημάτων, στομαχικών και αναπνευστικών παθήσεων, εντερικών παρασίτων, πυρετού, καθώς και για την επούλωση μικρών πληγών και ελκών^{12,13}.

3. ΦΥΤΟΧΗΜΕΙΑ-ΚΥΡΙΑ ΧΗΜΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, μέχρι σήμερα έχει απομονωθεί/ανιχνευθεί μεγάλο εύρος χημικών συστατικών, όπως φλαβονοειδή, αλκαλοειδή, κουμαρίνες, τερπενοειδή, οργανικά οξέα, αλλά και λιπαρά οξέα, στερόλες, πολυσακχαρίτες, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία [Εικόνα 2].

3.1 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μία από τις κύριες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών, με τα επίπεδά τους να ποικίλουν ανάλογα με τα τμήματα του φυτού. Τα υψηλότερα ποσοστά εμφανίζονται στις ρίζες και ακολούθως σε βλαστούς και φύλλα.

6 είδη φλαβονοειδών έχουν αναφερθεί, (καιμπερόλη, απιγενίνη, λουτεολίνη, μυρικετίνη, κερκετίνη, γενιστεΐνη)^{12,14}. Ακόμα, τα ομο-ισοφλαβονοειδή portulacaponones A–D, από υπέργεια μέρη του φυτού αποτελούν μια ξεχωριστή κατηγορία¹⁵.

Τα φλαβονοειδή είναι γνωστά βιοδραστικά συστατικά και συσχετίζονται με την αντιοξειδωτική δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος¹⁶, ενώ τα ομο-ισο-φλαβονοειδή έχουν εμφανίσει κυτταροτοξική δράση, έναντι κυτταρικών σειρών¹⁷.

3.2 Αλκαλοειδή

Τα αλκαλοειδή αποτελούν κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών με μεγάλο ενδιαφέρον στο φυτό. Τα πρωταλκαλοειδή (νευρομεταβιβαστές) L-Dopa, ντοπαμίνη και νοραδρεναλίνη είναι μερικά από αυτά που έχουν ανιχνευθεί¹³, με τα επίπεδά τους να είναι υψηλότερα στα φύλλα συγκριτικά βλαστούς και σπέρματα. Επιπρόσθετα, ο διαλύτης εκχύλισης επηρεάζει ποσοτικά την παραλαβή τους¹⁸. Οι μεταβολίτες *oleraceins* A, B, C, D και E και πολλοί άλλοι, όπως οι (3R)-3,5-bis(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)-

2,3-dihydro-2(1H)-pyridinone και 1,5-dimethyl-6-phenyl-1,2-dihydro-1,2,4-triazin-3(2H)-one αποτελούν νέα αλκαλοειδή που απομονώθηκαν από το φυτό^{19,20} και έχουν εμφανίσει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση²¹. Τέλος, ο μεταβολίτης *oleracone* έχει παρουσιάσει ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση²².

3.3 Λιπαρά οξέα

Το είδος *P. oleracea*, αποτελεί πλούσια φυτική πηγή ω-3 λιπαρών οξέων που συνήθως συναντώνται σε ιχθυέλαια και σπανιότερα σε φυτά. Τα ω-3 λιπαρά κατέχουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς και στην πρόληψη και θεραπεία υπέρτασης, στεφανιαίας νόσου και άλλων φλεγμονωδών διαταραχών^{23,24}. Περιέχει σε ποσοστό μέχρι και 30% α-linolenic acid (ALA) (ω-3), αλλά και άλλα απαραίτητα λιπαρά οξέα, όπως τα palmitoleic (ω-7), palmitic, linoleic (ω-6), oleic (ω-9), stearic, eicosapentaenoic και docosahexaenoic^{6,13,20}.

3.4 Τερπενοειδή

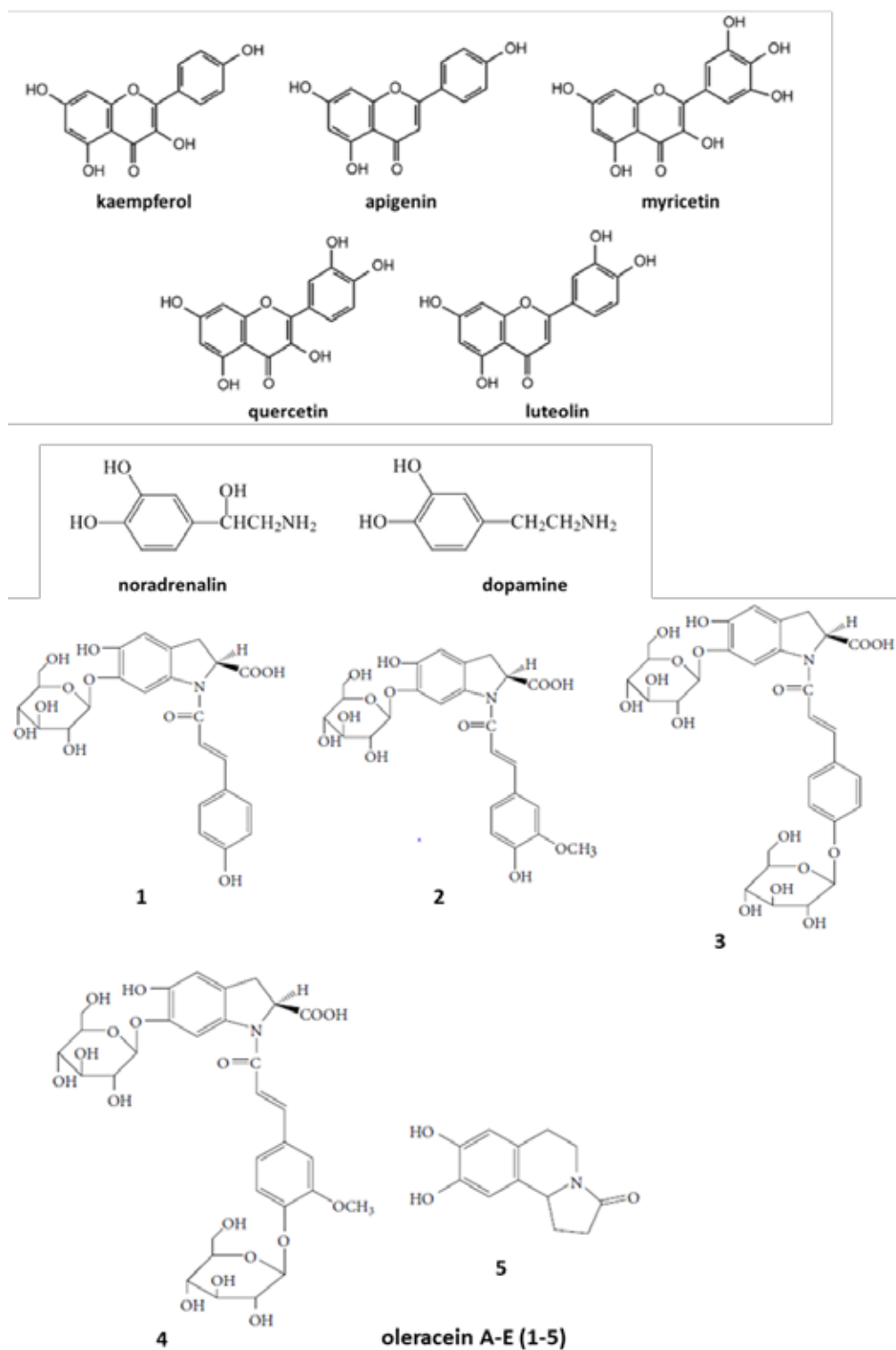
Οι μεταβολίτες portuloside A και B, αλλά και άλλοι μονοτερπενικοί γλυκοσίδες και το διτερπένιο portulene έχουν απομονωθεί από το είδος *P. oleracea*, ενώ περιέχονται και διάφορα τριτερπένια, όπως η ουσία portulacerebroside A¹³.

3.5 Άλλα συστατικά

Το φυτό είναι πλούσια πηγή βιταμίνης A, βιταμινών του συμπλέγματος B (ριβοφλαβίνη, νιασίνη και πυριδοξίνη), βιταμίνης C και α-τοκοφερόλης. Επίσης, περιέχει ιχνοστοιχεία: K, Mg, Mn, Ca, P, Fe, αμινοξέα (ισολευκίνη, προλίνη, λευκίνη, λυσίνη, φαυνυλαλίνη, μεθειονίνη, κυστεΐνη, βαλίνη, θρεονίνη, τυροσίνη), καθώς και β-καροτένιο (καροτενοειδές), bergapten (φουρανοκουμαρίνη) και μελατονίνη (ορμόνη)^{7,12}.

4. ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΑΞΙΑ-ΥΓΕΙΑ

Η *P. oleracea* έχει υψηλή δια-θρεπτική αξία, περιέχο-



Εικόνα 2. Χημικές δομές βιοδραστικών συστατικών του *P. oleracea*.

ντας φυτικές ίνες, πλήθος βιταμινών και ιχνοστοιχείων, με χαμηλό θερμιδικό φορτίο και με υψηλά επίπεδα β-carotene, βιταμίνης C και alpha-linolenic acid (ALA)^{12,25}. Αποτελεί εξαιρετική πηγή βιταμίνης A (44% του RDA)²⁰, βιταμινών του συμπλέγματος B (riboflavin, niacin, pyridoxine), καθώς και μέταλλα (Fe, Mg, Ca, K και P)¹². Έχει αναφερθεί ότι περιέχει 5 φορές υψηλότερα ποσοστά σε ω-3 λιπαρά οξέα από το σπανάκι. Τα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα ανήκουν στα απαραίτητα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα για την ανθρώπινη ανάπτυξη, την πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων, συμβάλλοντας στη τόνωση του ανοσοποιητικού συστήματος²⁶.

Τα ψάρια και τα ιχθυέλαια θεωρούνται οι πλουσιότερες πηγές ω-3 λιπαρών οξέων και συνιστάται η κατανάλωσή τους σε τακτική βάση για την κάλυψη ημερήσιων αναγκών. Η *P. oleracea* ως πλούσια φυτική πηγή ALA⁴ μπορεί να θεωρηθεί αναγκαία πηγή παροχής ω-3 λιπαρών κυρίως σε διατροφικές ομάδες πληθυσμού (π.χ. χορτοφάγοι, vegan κ.ά.) που δεν καταναλώνουν ζωικής προέλευσης πρώτες ύλες. Για τους παραπάνω λόγους παράλληλα με την ευρεία γεωγραφική εξάπλωση το φυτικό αυτό είδος κατατάσσεται ανάμεσα στα πλέον αξιοπρόσεκτα για περαιτέρω χρήσεις¹².

5. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ

Η *P. oleracea* πέρα από τη χρήση της ως βιολεϊτουργικό τρόφιμο²⁰ έχει χρησιμοποιηθεί όπως αναφέρθηκε θεραπευτικά, εμφανίζοντας πληθώρα φαρμακολογικών δράσεων όπως αντιοξειδωτική, ηπατοπροστατευτική, αναλγητική, επίδραση στο μεταβολισμό, αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή, κυτταροτοξική και νευροπροστατευτική δράση^{12,13}.

5.1 Αντιδιαβητική δράση

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί διαταραχή του μεταβολισμού των υδατανθράκων, με αποτέλεσμα την αύξηση της τιμής της γλυκόζης του αίματος, προκαλώντας προβλήματα σε διάφορα άλλα όργανα και συστήματα όπως νεφρούς, ήπαρ και νευρικό σύστημα²⁷. Υπάρχουν αναφορές από την παραδο-

σιακή θεραπευτική του Ιράν για χρήση ριζών, φύλλων και σπερμάτων *αντράκλας* στην αντιμετώπιση σακχαρώδους διαβήτη. Σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα *in vivo* σε επαγόμενο διαβήτη με Alloxan εμφανίστηκε υπογλυκαιμική και υπολιπιδαιμική δράση με χορήγηση υδρο-αιθανολικού εκχυλίσματος σπερμάτων του²⁸. Πολυσακχαρίτες του φυτού έχουν αναφερθεί για τη δράση τους στη ρύθμιση της γλυκόζης του αίματος και του μεταβολισμού των λιπιδίων σε *in vivo* πειράματα σε διαβητικούς ποντικούς²⁹. Ακόμα, από του στόματος η χορήγηση ακατέργαστων υδατοδιαλυτών πολυσακχαριτών από τις ρίζες του φυτού παρουσίασε αξιοσημείωτη αύξηση του σωματικού βάρους και στατιστικά σημαντική βελτίωση της ανοχής στη γλυκόζη σε διαβητικούς αρουραίους³⁰. Μελέτες που υποστηρίζουν την αντιδιαβητική δράση και την αντίσταση στην ινσουλίνη διαπίστωσαν βελτίωση της ανοχής στη γλυκόζη και του μεταβολισμού των λιπιδίων σε αρουραίους με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2³¹. Τέλος, σε πρόσφατη επισκόπηση και μετα-ανάλυση από τους Hadi et al.³² αναφέρονται οι θετικές επιδράσεις *P. oleracea* ως προς τους γλυκαιμικούς δείκτες και των επιπέδων των λιπιδίων στο αίμα, μετά από χορήγηση (συμπληρώματος σε μορφή κόνεως) σε διαβητικά άτομα.

5.2 Αντιοξειδωτική δράση

Συστατικά και εκχυλίσματα με αντιοξειδωτική δράση θεωρούνται ότι συμβάλουν θετικά στην προστασία έναντι ελευθέρων ριζών και άλλων παραπροϊόντων μεταβολικών διαδικασιών, που προκαλούν οξειδωτικές αλλοιώσεις και κυτταρικές βλάβες. Η *αντράκλα* όπως έχει αποδειχτεί, φυτοχημικά αποτελεί μία πηγή υψηλής δια-θεραπευτικής αξίας με υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Αυτή η δράση οφείλεται στα βιοδραστικά συστατικά όπως: ω-3 λιπαρά, βιταμίνη C, α-τοκοφερόλες, και φλαβονοειδή¹⁴. Μελέτες έχουν δείξει ότι εκχυλίσματα του φυτού βελτιώνουν τα επίπεδα δεικτών οξειδωτικού stress (GSH και TAS) και της άμυνας του οργανισμού σε διαβητικούς αρουραίους, χάρις στη μείωση της παραγωγής των ελευθέρων ριζών σε επαγόμενο από streptozotocin διαβήτη³³.

5.3 Αντιφλεγμονώδης δράση

Μελέτες αναφέρουν τη θετική δράση του φυτού στη φλεγμονή. Σε *in vivo* έρευνα σε αρουραίους επαγόμενης αρθρίτιδας με από του στόματος χορήγηση εκχυλίσματος των φύλλων *P. oleracea* L., εμφανίσε παρόμοια δράση με τους περισσότερους μη στεροειδείς αντιφλεγμονώδεις παράγοντες¹². Αιθανολικό εκχύλισμα (10%) υπέργειων τμημάτων (ξηρά φύλλα και βλαστοί) *P. oleracea* L. παρουσίασε στατιστικά σημαντική αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση, μετά από ενδοπεριτοναϊκή και τοπική χορήγηση του εκχυλίσματος, συγκριτικά με θεραπεία αναφοράς (diclofenac sodium)³⁴. Επίσης, έχει αξιολογηθεί η αντιφλεγμονώδης δράση του αλκαλοειδούς oleracimine εμφανίζοντας πολύ ισχυρή δράση, με αναστολή της παραγωγής νιτρικού οξειδίου και δοσο-εξαρτώμενη μείωση των επιπέδων ιντερλευκίνης 6 και άλλων παραγόντων (παράγοντας νέκρωσης όγκων-TNF-α, νιτρικό οξύδιο και προσταγλανδίνες E2) σε κυτταρικές καλλιέργειες³⁵.

5.4 Αντιμικροβιακή δράση

Σε πλήθος ερευνών έχει επιβεβαιωθεί αξιόλογη αντιβακτηριακή δράση από τα υπέργεια μέρη του φυτού (υδρο-αλκοολικό εκχύλισμα) και ειδικότερα του φλαβονοειδούς arigenin έναντι διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών, με σημαντικότερη αυτής έναντι των *S. typhimurium* και *P. mirabilis*³⁶. Σε άλλες μελέτες επισημαίνεται η δράση εκχυλίσματος υπέργειων τμημάτων του φυτού έναντι των στελεχών *S. aureus*, *K. pneumonia*, *B. cereus* και *A. fumigates*³⁷, καθώς και ανθεκτικών στελεχών σε αντιβιοτικά (erythromycin, cefixime, ceftazidime, tetracycline, κ.ά) *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. saprophyticus*, *H. alvei*, *A. baumannii*, *E. faecalis*, *P. mirabilis*, *S. marcescens* και *S. aureus*, αποτελώντας εναλλακτική λύση στις περιπτώσεις αυτές³⁸. Επίσης έχει εμφανίσει αντιμυκητιασική δράση έναντι δερματόφυτων του γένους *Trichophyton*³⁹.

5.5 Δράση στην υπερλιπιδαιμία

Η διαταραχή των φυσιολογικών επιπέδων των λι-

πιδίων του αίματος (χοληστερόλη-TC, τριγλυκερίδια-TG, LDL-χοληστερόλη-LDL-C) συμβάλλει σημαντικά στην αύξηση καρδιαγγειακών παθήσεων και σακχαρώδους διαβήτη. Η φαρμακευτική προσέγγιση με τα διαθέσιμα από την αγορά σκευάσματα (φιμπράτες και στατίνες) ναι μεν οδηγεί σε αντιλιπιδαιμική δράση, αλλά τα συνθετικά αυτά φάρμακα φυσικά δεν αποτελούν ήπια προσέγγιση στη θεραπεία, εξαιτίας των ανεπιθύμητων δράσεων που εμφανίζουν⁴⁰. Γι' αυτό το λόγο η προσπάθεια εύρεσης και χρήσης φυτικής προέλευσης δραστικών συστατικών εκδηλώνεται ολοένα και πιο δημοφιλής.

Πολλές έρευνες έχουν στραφεί σε παρασκευάσματα *P. oleracea* με αξιολόγηση της δράσης τους στην υπερλιπιδαιμία. Σε ενήλικους αρουραίους μετά από χορήγηση dexamethasone για 8 ημέρες εμφανίστηκε ότι αιθανολικό εκχύλισμα φύλλων του φυτού (200 και 400 mg/kg) παρουσίασε στατιστικά σημαντική παρεμπόδιση της δράσης dexamethasone, διατηρώντας τα επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων σε φυσιολογικά επίπεδα⁴¹. Σε άλλη *in vivo* μελέτη αρουραίοι σιτίστηκαν με σιτηρέσιο υψηλό σε χοληστερόλη για επαγωγή υπερλιπιδαιμίας. Σε συγκεκριμένες ομάδες ζώων χορηγήθηκαν στατίνες (lovastatin) και σε άλλες υδατικό εκχύλισμα του φυτού. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων TC, LDL-C, VLDL-C, ενώ παράλληλα σημειώθηκε αύξηση των επιπέδων HDL-C στις ομάδες χορήγησης του φυτικού εκχυλίσματος, συμπεραίνοντας ότι η χορήγηση εκχυλίσματος σε δόση 150 mg/kg βάρους σώματος εμφανίζει καρδιοπροστασία με προληπτική και θεραπευτική δράση έναντι της υπερλιπιδαιμίας⁴². Παράλληλα, σε άλλη μελέτη εμφανίστηκε υπολιπιδαιμικό αποτέλεσμα από τρία διαφορετικά παρασκευάσματα βλαστών *P. oleracea*, κονιοποιημένη δρόγη, έγχυμα και 70% αιθανολικό εκχύλισμα, σε ζώα (Wister Albino rats), που λάμβαναν σιτηρέσιο υψηλών θερμίδων. Η χορήγηση των παρασκευασμάτων αυτών βελτίωσε το σωματικό βάρος, τα επίπεδα TC, TL (ολικά λιπίδια), LDL-C, VLDL-C και μείωσε την αναλογία κινδύνου συγκριτικά με υπερλιπιδαιμικό μάρτυρα⁴³.

5.6 Ηπατοπροστατευτική δράση

Η *P. oleracea* έχει μελετηθεί και ως προς τη προστατευτική της δράση έναντι επαγόμενης ηπατοτοξικότητας από cisplatin σε εμβρυϊκό ήπαρ νεοσσών. Η cisplatin οδήγησε σε αύξηση με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο διαφόρων βιοχημικών παραμέτρων που εξετάστηκαν, (π.χ. επίπεδα τρανσαμινάσης αλανίνης, τρανσαμινάσης ασπαρτικού αλκαλικής φωσφατάσης κ.ά) και μείωση των επιπέδων αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως υπεροξειδίου της δισμουτάσης, περοξειδάση γλουταθειόνης, αναγωγή γλουταθειόνης και τρανσφεράση-s-γλουταθειόνης, εν αντιθέσει με την προ-επεξεργασία με εκχύλισμα *αντράκλας* (ένεση 1 και 3 mg) όπου παρουσιάστηκε προστατευτική δράση έναντι της επαγόμενης ηπατοτοξικότητας, όπως φάνηκε από τα επίπεδα των βιοχημικών παραμέτρων ⁴⁴.

5.7 Αντιελκωτική δράση

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία υδατικό εκχύλισμα *P. oleracea* έχει εμφανίσει αντι-ελκωτική δράση σε επαγόμενο έλκος *in vivo* σε albino rats και η δράση αυτή αποδόθηκε στα φλαβονοειδή που περιέχει (καμπφερόλη, απιγενίνη, μυρικετίνη, κερκετίνη και λουτεολίνη) ¹⁵. Σε άλλη *in vivo* μελέτη αξιολογήθηκε η γαστροπροστατευτική δράση αιθανολικού εκχυλίσματος 50% του είδους σε επαγόμενο έλκος, όπου εμφανίστηκε ότι έχει την ικανότητα να παρεμποδίζει την οξειδωτική βλάβη του γαστρικού βλεννογόνου αναστέλλοντας την υπεροξειδωση των λιπιδίων, αυξάνοντας την δράση της καταλάσης και μειώνοντας στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα υπεροξειδίου της δισμουτάσης επιβεβαιώνοντας τη γαστροπροστατευτική του δράση ⁴⁵. Σε άλλη μελέτη αναφέρεται ότι υδατικό και αιθανολικό εκχύλισμα φύλλων του φυτού εμφάνισε μείωση της σοβαρότητας των επαγόμενων με HCl ελκών, δοσο-εξαρτώμενα *in vivo* σε ποντικούς και τα αποτελέσματα αυτά ήταν συγκρίσιμα με εκείνα πρότυπης ουσίας αναφοράς (sucralfate 0.1 g/kg) για τις υψηλές χορηγούμενες δόσεις των εκχυλισμάτων (0.8 g/kg υδατικού και 1.4 g/kg αιθανολικού), υποστηρίζοντας την εμφανιζόμενη γαστροπροστασία ⁴⁶.

Παρακάτω παρουσιάζονται σε πίνακες [Πίνακας 1, 2] ορισμένες εκ των *in vitro/in vivo* προκλινικών και κλινικών μελετών, που έχουν πραγματοποιηθεί στο είδος αυτό.

6. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

6.1 Χρήση σε καλλυντικά

Το φυτό έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε προϊόντα περιποίησης προσώπου και σώματος. Οι αποδεδειγμένες δράσεις του είναι: αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδης, συνεισφέρουν στην υγεία της επιδερμίδας και την πρόληψη από τα σημάδια της γήρανσης. Στα δραστικά συστατικά συγκαταλέγονται τα ω-3 λιπαρά οξέα, η βιταμίνη C και τα ιχνοστοιχεία Cu και Mn, ισχυρά αντιοξειδωτικά που διεγείρουν την παραγωγή κολλαγόνου, συνεισφέροντας στην αντιγήρανση. Ειδικότερα, τα καλλυντικά προϊόντα με αντράκλα εστιάζουν κυρίως στα ακόλουθα ⁷⁶:

- βελτίωση εμφάνισης δέρματος (κηλίδων γήρανσης), μείωση ρυτίδων
- προστασία δέρματος από τις ακτίνες UV, αντιοξειδωτική δράση
- αύξηση ανάπλασης δέρματος, επιτάχυνση επούλωσης ουλών
- βελτίωση ανάπτυξης του τριχωτού, λόγω Fe και Cu

6.2 Συμπληρώματα διατροφής

Στη διεθνή αγορά (εκτός Ελλάδας) απαντώνται σκευάσματα με *αντράκλα* ως συμπληρώματα διατροφής, για χρήση από το στόμα. Τα περισσότερα αφορούν εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του φυτού (κυρίως φύλλα) και απαντώνται σε μορφή καψακίων ή βάμματος, αξιοποιώντας τα οφέλη που εμφανίζει ή αυτά που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν περαιτέρω, όπως περιγράφονται παρακάτω:

- πλούσια πηγή ω-3 λιπαρών οξέων
- πηγή βιταμινών και ιχνοστοιχείων
- υψηλό αντιοξειδωτικό φορτίο
- ενίσχυση καρδιακής υγείας
- υποστήριξη γαστρεντερικής λειτουργίας

7. ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΧΡΗΣΗΣ –ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ-ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ

Το φυτό θεωρείται ασφαλές για ανθρώπινη κατανάλωση είτε μαγειρεμένο, είτε ωμό σε σαλάτες, αλλά και ως φυτοθεραπευτικό. Οι περισσότερες κλινικές δοκιμές δεν αναφέρουν ανεπιθύμητες δράσεις. Γενικά, το φυτό θεωρείται καλώς ανεκτό στους περισσότερους χρήστες. Ωστόσο, σε μεμονωμένη έρευνα που χρησιμοποιήθηκε μείγμα πολλών φυτών με *αντράκλα*, μεταξύ των αναφερόμενων ανεπιθύμητων ενεργειών ήταν δερματικό εξάνθημα, θυρεοειδίτιδα και παράλυση νεύρων του προσώπου ⁷⁷. Σε άλλη κλινική δοκιμή αναφέρθηκε δυσκοιλιότητα ως η μόνη παρενέργεια ⁷⁸. Ακόμα, επισημαίνεται ότι οι γυναίκες κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης δεν συνιστάται να λαμβάνουν το φυτό σε θεραπευτικές δόσεις, καθώς προκαλεί συσπάσεις της μήτρας, γι' αυτό και αποκλείονται σε κλινικές μελέτες με *per os* χορήγηση *P. oleracea* ⁶⁴. Επιπλέον, σε μελέτες οξείας τοξικότητας του μεθανολικού εκχυλίσματος *in vivo* σε ποντίκια, παρουσιάστηκε μέτρια τοξικότητα, ενώ σε ιστοπαθολογικές έρευνες το ίδιο εκχύλισμα φαίνεται να εμφάνισε ηπατική και νεφρική τοξικότητα, γι αυτό και απαιτούνται περισσότερες μελέτες, ειδικά για την αξιολόγηση της χρονίας τοξικότητας του φυτικού αυτού είδους ¹³.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, επειδή στα υπέργεια μέρη του φυτού, περιέχονται άφθονα οργανικά οξέα, οξαλικό και κιτρικό, μπορούν να συνδεθούν κυρίως με Ca προς σχηματισμό οξαλικού ασβεστίου (αδιάλυτες μορφές), με παράλληλη αύξηση κινδύνου εμφάνισης νεφρολιθίασης ⁷⁹. Κατά συνέπεια, καλό είναι να αποφεύγεται η υπερκατανάλωση των υπέργειων μερών από άτομα με ουρολιθίαση.

8. ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΖΩΑ

Παρόλο που η *αντράκλα* περιέχει πολλά θρεπτικά στοιχεία και είναι ευχάριστο για ανθρώπινη κατανάλωση, έχει διαπιστωθεί ότι μπορεί να εμφανίσει τοξικές επιδράσεις σε ζώα. Συγκεκριμένα

εμφανίζει τοξικότητα σε αγροτικά ζώα, ζώα συντροφιάς (σκύλους, γάτες) και άλογα.

Η συμπτωματολογική εικόνα της τοξικότητας σε σκύλους, γάτες και άλογα περιλαμβάνει μυϊκή αδυναμία, κατάθλιψη και διάρροια, εξαιτίας του οξαλικού ασβεστίου που περιέχεται στο φυτό ⁸⁰. Ακόμα σύμφωνα με έρευνες, χορήγηση *P. oleracea* σε αίγες σε δόσεις των 5 g/kg σωματικού βάρους ή με σιτηρέσιο τύπου *ad libitum* (μέχρι κορεσμού) για περιόδους 15-40 ημερών προκάλεσε τυμπανισμό, διάρροια, απώλεια όρεξης, υπνηλία, αδυναμία των άκρων και κατάκλιση, ακολουθούμενη από θάνατο εντός ολίγων ημερών, με νεφρική και ηπατική βλάβη ⁸¹. Επιπλέον, αναφορές για δηλητηρίαση από *P. oleracea* έχουν γίνει λόγω των νιτρικών και νιτρωδών αλάτων σε πρόβατα ^{81,82}, αίγες ^{81,83} και βοοειδή ^{84,85}. Συμπτωματολογικά κατά τη νεκροψία παρατηρήθηκε κυάνωση, σε συνδυασμό με βαθύ καστανό αίμα στο μυϊκό σύστημα, υποδηλώνοντας δηλητηρίαση από νιτρικά και νιτρώδη ⁸¹.

9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με την παρούσα ανασκόπηση και λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα των φαρμακολογικών ερευνών, *in vitro* και *in vivo* μοντέλων, όσο και των κλινικών μελετών, το είδος *Portulaca oleracea*, η γνωστή μας *αντράκλα*, εμφανίζει πολλές θετικές δράσεις στην ανθρώπινη υγεία. Μεταξύ άλλων παρουσιάζει αντιδιαβητική, αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή, νευροπροστατευτική, ηπατοπροστατευτική και αντιελκωτική δράση. Οι δράσεις αυτές αποδίδονται στην ποικιλία των χημικών κατηγοριών μεταβολιτών που ανιχνεύονται στο φυτό αυτό. Περιέχοντας υψηλά επίπεδα ω-3 λιπαρών, αποτελεί μία από τις πλουσιότερες φυτικές πηγές. Οι σύγχρονες ανάγκες της αγοράς για εναλλακτικές πηγές ω-3 λιπαρών οξέων και η περιορισμένη παραγωγή ιχθυελαίων, δικαιολογεί τη στροφή προς την ανεύρεση και χρήση άλλων επίγειων πηγών PUFA, με το είδος της *Portulaca* να μπορεί δυνητικά να αποτελέσει ένα πιθανό υποψήφιο-ανταγωνιστή τους. Ταυτόχρονα απαι-

Πίνακας 1: Προ-κλινικές μελέτες *in vitro/in vivo* στο είδος *P. oleracea*.

Θεραπευτικός στόχος	Δραστική ουσία/φυτικό παρασκεύασμα	Δόσεις/τρόπος χορήγησης	Υποκείμενα μελέτης/κυτταρικές σειρές	Μελέτη (πειραματικό μοντέλο, διάρκεια)	Πειραματικό αποτέλεσμα	Βιβλιογραφία
Νεφροπροστατευτική	Υδατικό & αιθανολικό εκχύλισμα (υπέργειων μερών)	0.2, 0.4 και 0.8 g/kg / 0.5, 1 και 2 g/kg, ενδοπεριτοναϊκά	Αρσενικά wistar rats	Διάρκεια: 10 εβδομάδων. Πρόκληση επαγόμενης νεφροτοξικότητας από cisplatin	Μειωμένα επίπεδα ουρίας και κρεατινίνης στο πλάσμα του αίματος	Karimi <i>et al.</i> , 2010 αναφορά 47
	Υδατικό εκχύλισμα (υπέργεια μέρη)	400 mg/kg, <i>per os</i>	Albino rats (<i>Rattus norvegicus</i>)	Διάρκεια: 15 ημέρες. Πρόκληση επαγόμενης νεφροτοξικότητας από gentamicin	Μειωμένα επίπεδα ουρίας, ουρικού οξέος και κρεατινίνης στο πλάσμα του αίματος	Hozayen <i>et al.</i> , 2011 αναφορά 48
	Αιθανολικό εκχύλισμα	100, 200 και 400 mg/kg/ημέρα <i>per os</i>	Rats	Διάρκεια: 15 ημέρες. Πρόκληση επαγόμενου σχηματισμού οξαλικού ασβεστίου και ουρολιθίαςης από ethylene glycol και ammonium chloride	Δράση κατά ουρολιθίαςης	Kishore <i>et al.</i> , 2013 αναφορά 49
Δράση στο νευρικό σύστημα	Εκχύλισμα purslane (δεν προσδιορίζεται τμήμα ή είδος εκχυλίσματος)	Τελικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος 0%, 5%, 10%, 20%	PC-12 κυτταρικές σειρές	Υποξία	Αυξήθηκε η βιωσιμότητα των νευρικών κυττάρων υπό συνθήκες υποξίας	Wang <i>et al.</i> , 2007 αναφορά 50
	Εκχύλισμα purslane (δεν προσδιορίζεται τμήμα ή είδος εκχυλίσματος)	1 g/ημέρα <i>per os</i>	Αρσενικά BALB/c mice	Διάρκεια: 7 ημέρες. Συνθήκες υποξίας	Αύξηση των επιπέδων ATP, lactate dehydrogenase (LDH), phosphofructokinase (PFK) και pyruvate kinase (PK) σε υποξική εγκεφαλική βλάβη του φλοιού/ αύξηση της έκφρασης του mRNA της ερυθροποιητίνης	Wang <i>et al.</i> , 2007 αναφορά 50

Πίνακας 1, συνέχεια.

Δράση στο νευρικό σύστημα	Αιθανολικό εκχύλισμα (υπέργειων μερών)	2 mg/kg <i>per os</i>	ICR mice	Διάρκεια: 7 ημέρες. Συνθήκες υποξίας	Διεγέρθηκε η έκφραση ερυθροποιητίνης σε επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης/ μειώθηκαν επίπεδα ενολάσης και δράση ενζύμου κασπάση-3	Wanyin <i>et al.</i> , 2012 αναφορά 51
	Υδατικό εκχύλισμα (υπέργεια μέρη)	1.5 mL/kg, <i>per os</i>	Rat	Πρόκληση επαγόμενης από rotenone εγκεφαλικής βλάβης	Αναστολή μεταβολισμού dopamine και της απόπτωσης στο ραβδωτό σώμα	Abdel Moneim, 2013 αναφορά 23
	Υδατικό εκχύλισμα (υπέργεια μέρη)	2.5–10 mg/kg/ημέρα, υποδόρια ένεση	SD αρσενικά mice	Διάρκεια: 10 εβδομάδες. Πρόκληση επαγόμενης από D-galactose νευροτοξικότητας	Ανατροπή χρόνιας νευροτοξικότητας από d-gal και βελτίωση αποτελεσμάτων κατά την παρατήρηση της συμπεριφοράς	Hongxing <i>et al.</i> , 2007 αναφορά 52
	Υδατικό εκχύλισμα (βλαστοί και φύλλα)	1.5 mL/kg, <i>per os</i>	Ενήλικα αρσενικά wistar albino rats	Διάρκεια: 12 ημέρες. Αξιολόγηση επίδρασης στους νευροδιαβιβαστές	Αύξηση επιπέδων serotonin, norepinephrine dopamine και acetyl cholinesterase σε μέρη του εγκεφάλου	Moneim <i>et al.</i> , 2012 αναφορά 53
	Πολυσακχαρίτες (από υδατικό εκχύλισμα του φυτού)	100, 200 και 400 mg/kg, <i>per os</i>	Αρσενικά Kumming mice	Διάρκεια: 30 ημέρες. Δοκιμή καταναγκαστικής κολύμβησης	Αύξηση του χρόνου κολύμβησης και αντοχής	Xu & Shan, 2014 αναφορά 54

Πίνακας 1, συνέχεια.

Δράση στο μεταβολισμό	Πρωτεϊνικής φύσεως συστατικά του υδατικού εκχυλίσματος (όλου το φυτού)	77.5 mg/kg, ενδοπεριτοναϊκά	Υγιή αρσενικά ενήλικα mice	Λήψη δειγμάτων αίματος μετά τις 2 ώρες χορήγησης	Συστατικά με δράση παρόμοια ινσουλίνης. Μείωση επιπέδων γλυκόζης ορού, χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων ολικών λιπιδίων και επίπεδα γλυκογόνου στο ήπαρ	AL-Chalabi, 2005 αναφορά 55
	Μείξη σπερμάτων Purslane/pumpkin (γλυστρίδα/ κολοκύθα)	2 g/100g σιτηρεσίου	Υγιή αρσενικά ενήλικα albino rats (Sprague-Dawley)	Διάρκεια: 6 εβδομάδων. Υπερχοληστερολαιμία	Επίδραση με μείωση λιπιδαιμίας, τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης σε υποκείμενα με πρόσληψη σιτηρεσίων υψηλής χοληστερόλης	Barakat & Mahmoud, 2011 αναφορά 56
	Υδατικό εκχύλισμα (υπέργειων μερών)	300 mg/kg/ημέρα, <i>per os</i>	Αρσενικά C57BL/KsJ-db/db mice και wild-type C57BL/6J mice	Διάρκεια: 10 εβδομάδων Διαβήτης	Αντιυπεργλυκαιμική δράση, αποτροπή ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας	Lee et al., 2012 αναφορά 57
Ηπατοπροστατευτική δράση	Υδατικό-αιθανολικό εκχύλισμα (80% v/v) (υπέργειων τμημάτων)	0.01, 0.05, 0.1 και 0.15 g/kg	Male Wistar rats	Διάρκεια: 30 ημερών. Επαγόμενη ηπατοτοξικότητα από CCl ₄	Ηπατοπροστατευτική δράση σε προκαλούμενη βλάβη (CCl ₄) αποκατάσταση ενζυμικών επιπέδων ορού	Eidi et al., 2015 αναφορά 58
Κυτταροτοξική δράση	Υδατικό και αιθανολικό ακατέργαστο εκχύλισμα φύλλων	Συγκεντρώσεις: 10.000, 1000, 100, 10, 1 και 0.1 µg/mL	Καρκινικές κυτταρικές σειρές: AMN3, RD και κύτταρα Vero	Κυτταρογενετική δράση	Αποτελεσματική κυτταροτοξική δράση έναντι AMN3 και πρόκληση απόπτωσης	Zakaria & Hazha, 2013 αναφορά 59

Πίνακας 1, συνέχεια.

Αντιοξειδωτική & αντιπολλαπλασιαστική δράση	Έλαιο σπερμάτων purslane	Διαφορετικές συγκεντρώσεις για την αντιοξειδωτική δράση. Για την αντιπολλαπλασιαστική δράση: 12.5, 50, 200, 800, 1600 και 3200 µg/mL	Καρκινικές σειρές: HeLa (καρκίνου του τραχήλου), Eca-109 (καρκίνου του οισοφάγου) και MCF-7 (καρκίνου του μαστού)	Ανασταλτικές επιδράσεις στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων	Αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική και κυτταροτοξική δράση του ελαίου έναντι καρκινικών κυττάρων MCF	Guo <i>et al.</i> , 2016 αναφορά 60
Αντιφλεγμονώδης δράση	Αιθανολικό εκχύλισμα όλου του φυτού	0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 και 400 µg/ml του εκχυλίσματος στο μέσο ανάπτυξης	Κύτταρα μακροφάγων mouse RAW 264.7	Lipopolysaccharide (LPS)- διεγερμένα κύτταρα RAW 264.7	Μείωση δοσοεξαρτώμενα της παραγωγής NO (νιτρικού οξειδίου) (φλεγμονώδης διαμεσολαβητής) και κυκλοοξυγενάσης 2 (COX-2). Μείωση TNF-α και IL-6. Μείωση επιπέδων P65, p-P65, pMEK και p-IκB-α δοσοεξαρτώμενα	Miao <i>et al.</i> , 2019 αναφορά 61

τείται προσοχή στην κατανάλωσή του από ορισμένες πληθυσμιακές ομάδες εξαιτίας των οξαλικών οξέων που υπάρχουν απαντώνται σε μεγάλες ποσότητες στα υπέργεια μέρη του.

Συμπερασματικά, η κατανάλωση *P. oleracea* πέρα από το ότι προσφέρει πολύ χαμηλό θερμιδικό φορτίο και υψηλή διαθρεπτική αξία, συνάμα δείχνει να αποτελεί ασπίδα έναντι νοσημάτων όπως, εμφάνισης στεφανιαίας νόσου και εγκεφαλικών επεισοδίων και έναν ανεκτίμητο σύμμαχο της υγείας μας. Όλα τα παραπάνω ευρήματα θα μπορούσαν να αποτελέσουν εφαλτήριο στην επιστημονική κοινότητα,

ώστε να διεξαχθούν περισσότερες κλινικές μελέτες, αλλά και να αξιοποιηθούν όλα τα προϊόντα από το φυτό με παράλληλες προσπάθειες εύρεσης μεθόδων χειρισμού των υπέργειων τμημάτων του, που η υψηλή περιεκτικότητά τους κυρίως σε οξαλικό οξύ, δρα δυνητικά αποτρεπτικά σε ευρεία εκμετάλλυσή τους στην ανθρώπινη διατροφή: Η *αντράκλα*, αποτελεί αδιαμφισβήτητα ένα φαρμακευτικό φυτό άξιο προσοχής στον 21^ο αιώνα με πολλαπλά οφέλη από την αξιοποίησή του, που όμως μέχρι και σήμερα δεν έχει λάβει την απαραίτητη προσοχή και δεν έχει αναγνωρισθεί στο βαθμό που θα έπρεπε. □

Πίνακας 2: Κλινικές μελέτες *P. oleracea*.

Θεραπευτικός στόχος	Είδος μελέτης	Είδος φυτικού παρασκευάσματος, φαρμακευτική μορφή, οδός χορήγησης	Χρόνος μελέτης/πειραματικής διαδικασίας	Αποτελέσματα	Βιβλιογραφία
Μη φυσιολογική αιμορραγία μήτρας (Abnormal uterine Bleeding-AUB)	Κλινική μελέτη σε 10 προ-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες, 43-51 ετών, χωρίς απόκριση σε συμβατικές θεραπείες (υποψήφιες υστερεκτομής)	5 g κόνις σπερμάτων / 150ml νερό κάθε 4 ώρες <i>per os</i> , 48 ώρες μετά την έναρξη εμμήνου ρύσεως για 3 ημέρες	3 μήνες	Μείωση ποσότητας και διάρκειας αιμορραγίας, ομαλοποίηση έμμηνου ρύσεως (80% συνόλου), καμία επίδραση 20 % ασθενών	Shobeiri et al., 2009 αναφορά 62
Ομαλός λειχήνας (<i>Lichen planus</i> -OLP)	Τυχαιοποιημένη διπλή τυφλή ελεγχόμενη κλινική μελέτη με εικονικό φάρμακο σε 37 ασθενείς, 21 θήλεα και 16 άρρενα	Υπέργεια μέρη (αιθανολικό εκχύλισμα) κατεργασία με λακτόζη σε caps 235 mg εκχυλ. <i>per os</i>	6 μήνες	Χωρίς ανεπιθύμητες ενέργειες, αποτελεσματική εναλλακτική συμπληρωματική θεραπεία σε <i>Lichen planus</i>	Agha-Hosseini et al., 2010 αναφορά 63
Δράση στο μεταβολισμό	Διπλή τυφλή, ελεγχόμενη κλινική μελέτη 30 ατόμων, ηλικίας 40±3.2, 20 άρρενα, 10 θήλεα με διαβήτη τύπου 2 σε συνδυασμό με παχυσαρκία, υπερχοληστερολαιμία, υπερλιπιδαιμία και ηπατική δυσλειτουργία	Σπέρματα, 5 g 2 φορές την ημέρα, <i>per os</i>	8 εβδομάδες/ 10 μήνες	Ασφαλή συμπληρωματική θεραπεία στην αντιμετώπιση σακχαρώδους διαβήτη. Αξιοσημείωτη υπογλυκαιμική και υπολιπιδαιμική δράση, μείωση της αντίστασης στην ινσουλίνη	El-Sayed, 2011 αναφορά 64
Υπερχοληστεριναιμία	Κλινική μελέτη 93 ασθενών (LDL-C ≥120 mg/dl). Αξιολόγηση δράσης της θεραπείας με Iovastatin στα επίπεδα λιπιδίων, λιποπρωτεϊνών και δράση ενζύμου paraoxonase1(PON1)	50 g φρέσκα φύλλα και βλαστοί	45 ημέρες	Μείωση επιπέδων χοληστερόλης, LDL-C, OxLDL και τριγλυκεριδίων. Αύξηση HDL-C, δράσης ενζύμου PON1	Moradi et al., 2012 αναφορά 65
Δράση στο νευρικό σύστημα	Τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη 60 ασθενών με χρόνια σχιζοφρένεια υπό θεραπεία με risperidone. Αξιολόγηση επίδρασης purlane σε ψυχοσικά συμπτώματα και επίπεδα malondialdehyde (MDA)	Ξηρό αιθανολικό εκχύλισμα, 1 g/ημέρα, <i>per os</i>	8 εβδομάδες	Η ταυτόχρονη χορήγηση respridone και purlane οδήγησε σε βελτίωση ψυχολογίας και μείωση επιπέδων MDA σε ασθενείς με χρόνια σχιζοφρένεια	Parvin et al., 2013 αναφορά 66

Πίνακας 2, συνέχεια.

Δράση στο μεταβολισμό	Τριπλή-τυφλή ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο κλινική μελέτη. Αξιολόγηση των αντι-δυσλιπιδαιμικών δράσεων σε 74 εφήβους 12-18 ετών με παχυσαρκία: μη καπνιστές, με διαγνωσμένη δυσλιπιδαιμία	Σπέρματα, κάψουλα 500 mg, 2 φορές την ημέρα <i>per os</i>	11 μήνες	Αξιοσημείωτη μείωση επιπέδων LDL-C και τριγλυκεριδίων	Sabzghabae <i>et al.</i> , 2014 αναφορά 67
Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2	Τυχαιοποιημένη-ελεγχόμενη διασταυρούμενη κλινική μελέτη σε 48 ασθενείς, 35-65 ετών, με σακχαρώδη διαβήτη 2. Αξιολόγηση γλυκαιμικού προφίλ και επιπέδων λιπιδίων	Σπέρματα, φακελίσκος 10 g/ημέρα μαζί με διατροφή σε χαμηλά λιπαρά	12 εβδομάδες (3 μήνες)	Βελτίωση ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών (στατιστικά σημαντική μείωση βάρους, δείκτη μάζας σώματος, τριγλυκεριδίων, πίεσης. Καμία επίδραση επιπέδων ινσουλίνης και HDL-C, LDL-C, ολικής χοληστερόλης	Esmailzadeh <i>et al.</i> , 2015 αναφορά 68
Οξειδωτικό stress & διαβήτης τύπου 2	Τυχαιοποιημένη, ελεγχόμενη διασταυρούμενη κλινική μελέτη σε 40 ασθενείς με διαβήτη τύπου 2, ηλικίας 35-65. Αξιολόγηση της επίδρασης σπερμάτων purlane σε βιοδείκτες που σχετίζονται με το οξειδωτικό stress	10 g/ημέρα κονιοποιημένων σπερμάτων purlane	12 εβδομάδες (3 μήνες)	Η κατανάλωση σπερμάτων από διαβητικούς ασθενείς τύπου 2 αναποτελεσματική έναντι οξειδωτικού stress	Zakizadeh <i>et al.</i> , 2015 αναφορά 69
Επαναλαμβανόμενη αφθώδης στοματίτιδα (recurrent aphthous stomatitis-RAS)	Τυχαιοποιημένη, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο τριπλή-τυφλή κλινική μελέτη 50 ασθενών με ήπια αφθώδη εξέλκωση (MiRAS), εκ 22 άρρενα - 28 θήλεα άτομα, 19-55 ετών	Υπέργεια μέρη και σπέρματα (αιθανολικό εκχύλισμα). Κάψουλες 235 mg εκχυλίσματος εκάστη, 2 φορές ημερησίως (πρωί, βράδυ)	3 μήνες	Αποτελεσματικό στην αντιμετώπιση της RAS, θετική επίδραση στην ένταση πόνου και περιόδου επούλωσης, χωρίς ανεπιθύμητες ενέργειες	Mohammadzadeh <i>et al.</i> , 2016 αναφορά 70

Πίνακας 2, συνέχεια.

Αθηροσκλήρωση	Κλινική μελέτη σε 196 γυναίκες με διαβήτη τύπου 2 με επίπεδα γλυκόζης ≥ 200 mg/dL. Αξιολόγηση λήψης σπερμάτων και αερόβιας άσκησης σε βιοδείκτες σχετικούς με αθηροσκλήρωση	Κονιοποιημένα σπέρματα, 5 g/κάψουλα. 2.5 g σπερμάτων με το μεσημεριανό και 5g σπερμάτων στο βραδινό καθημερινά	16 εβδομάδες	Η κατανάλωση σπερμάτων ή/και αερόβιας άσκησης βελτίωσε τιμές βιοδεικτών αθηροσκλήρωσης σε γυναίκες με διαβήτη τύπου 2 μέσω ενεργοποίησης των οδών AMP και AMPK	Dehghan et al., 2016 αναφορά 71
Σιδηροπενική αναιμία	Μονή-τυφλή τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη επί 53 εφήβων θήλεα 15-18 ετών με σιδηροπενική αναιμία. Αξιολόγηση σπερμάτων vs θειϊκού σιδήρου (ferrous sulfate-FS) στα επίπεδα αιμοσφαιρίνης (Hb)	0.3 g/kg κονιοποιημένων σπερμάτων	4 εβδομάδες	Αύξηση των επιπέδων Hb, ασθενέστερης δράσης από τη χορήγηση FS. Για χρήση σε ήπιες μορφές αναιμίας	Mokhtarifar et al., 2017 αναφορά 72
Υψηλή εμμηνορροϊκή αιμορραγία (heavy menstrual bleeding-HMB)	Τυχαιοποιημένη διπλή-τυφλή ελεγχόμενη κλινική μελέτη με εικονικό φάρμακο σε 95 θήλεα με HMB	Σπέρματα, χορήγηση σε κάψουλες 500 mg (υδατικό εκχύλισμα) ισοδύναμο 5 g σπερμάτων	2 μήνες	Ενίσχυση δράσης mefenamic acid και μείωση συμπτωμάτων σε γυναίκες με HMB	Mirzaei et al., 2018 αναφορά 73
Μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD)	Τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη κλινική μελέτη 54 άτομα. Αξιολόγηση δράσης σπερμάτων σε μεταβολικούς παράγοντες (αντίσταση στην ινσουλίνη, λιπιδαιμικό προφίλ, δείκτες οξειδωτικού stress)	Σπέρματα, 10 g/ημέρα σε φακελίσκο με διατροφή χαμηλού θερμιδικού φορτίου, 2 φορές/ημέρα, πριν πρωινό και βραδινό γεύμα	8 εβδομάδες	Κατανάλωση σπερμάτων με διατροφή χαμηλών θερμίδων σε υπέρβαρα/ παχύσαρκα άτομα με νόσο NAFLD, επέφερε μείωση επιπέδων ολικής χοληστερόλης, τιμών FBS (Νηστεία σακχάρου στο αίμα), HOMA-IR, QUICKI και LDL-C	Gheflati et al., 2018 αναφορά 74
Αποκατάσταση της θηλής κατά τη γαλουχία	Διπλή-τυφλή τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή σε 86 γυναίκες που θηλάζουν	Κρέμα Purslane 2% (w/w) από αιθανολικό εκχύλισμα φύλλων και cold cream (USP). Εξωτερική χρήση	8 ημέρες	Δεν παρουσιάστηκαν ανεπιθύμητες δράσεις και η κρέμα θα μπορούσε να επιταχύνει την αποκατάσταση της θηλής σε γυναίκες κατά τη γαλουχία	Niazi et al., 2019 αναφορά 75

Is *Portulaca oleracea* a medicinal plant? Overview of recent data

Elisavet-Foteini Varvouni^a, Konstantia Graikou^a, George A. Karikas^b, Ioanna Chinou^{a,*}

^aDivision of Pharmacognosy and Chemistry of Natural Products, Dept. of Pharmacy, National & Kapodistrian University of Athens, Zografou, 157 71 Athens, Greece

^bDepartment of Biomedical Sciences, University of West Attica, Athens, 12243, Greece

KEYWORDS:

Portulaca oleracea;
Phytochemicals; Omega-3
fatty acids; Bio-activities;
Therapeutic applications

ABSTRACT

Portulaca oleracea is a widely distributed sp., used as an edible plant (aerial parts), as well as for its nutritional and therapeutic applications, due to its high nutritional value and content in bioactive metabolites. *P. oleracea* is mentioned since antiquity with the name of “andrachne”, suggested for the relief of a wide spectrum of diseases such as: headaches, inflammatory diseases, gastrointestinal and respiratory problems, fever, wounds and ulcers. The plant is a rich source of primary and secondary metabolites such as: phenolics, sterols, alkaloids, terpenoids and organic acids, combined with vitamins and minerals, while its seeds are plenty of omega-3 and omega-6

fatty acids. Recent *in vitro/in vivo* pharmacological data, and clinical/pro clinical trials, have reported various beneficial activities such as anti-hyperglycemic, anti-hyperlipidemic, neuroprotective and hepatoprotective ones. This review aims to provide the most recent literature data on traditional use, phytochemistry, pharmacological activities and safety. Due to its very interesting phytochemical profile, as well as its wide range of pharmacological activities, *P. oleracea* could be recommended as a therapeutic plant, essential in the daily diet of humans, but also to be further exploited in cosmetics, food supplements and other applications.

*CORRESPONDING

AUTHOR: E-mail address:
ichinou@pharm.uoa.gr
(I. Chinou).

REFERENCES

- Nemzer B., Al-Taher F., & Abshiru N. Phytochemical composition and nutritional value of different plant parts in two cultivated and wild purslane (*Portulaca oleracea* L.) genotypes. *Food Chem.* 320, Article ID 126621, 2020.
- Masoodi M. H., Ahmad B., Mir S. R., Zargar B. A., & Tabasum N. *Portulaca oleracea* L. A review. *J. Pharm. Res.* 4(9), 3044-3048, 2011.
- Naeem F., & Khan S. H. Purslane (*Portulaca oleracea* L.) as phytochemical substance—A review. *J. Herbs, Spices & Med. Plants* 19(3), 216-232, 2013.
- Uddin M., Juraimi A. S., Hossain M. S., Un A., Ali M., & Rahman M. M. Purslane weed (*Portulaca oleracea*): a prospective plant source of nutrition, omega-3 fatty acid, and antioxidant attributes. *Sci. World J.*, 1-6, 2014.
- Simopoulos A. P. Omega-3 fatty acids and antioxidants in edible wild plants. *Biol. Res.* 37(2), 263-277, 2004.
- Petropoulos S., Karkanis A., Martins N., & Ferreira I. C. Phytochemical composition and bioactive compounds of common purslane (*Portulaca oleracea* L.) as affected by crop management practices. *Trends Food Sci. Technol.* 55, 1-10, 2016.
- Sicari V., Loizzo M. R., Tundis R., Mincione A., Pellicano T. M. *Portulaca oleracea* L. (Purslane) extracts display antioxidant and hypoglycaemic effects. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 91, 39-46, 2018.
- Καλαϊτζή X. (2004). Η αντράκλα (*Portulaca oleracea* L.) ως ζιζάνιο και λαχανοφυτό. Πτυχιακή εργασία, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Καλαμάτας. Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας.
- Καββάδας Σ. Δ. (1956). Εικονογραφημένο Βοτανικό Φυτολογικό Λεξικό. Τόμος 6 σελ. 3241-3242, Αθήνα.
- Bosi G., Guarrera P. M., Rinaldi R., & Bandini Mazzanti, M. Ethnobotany of purslane (*Portulaca oleracea* L.) in Italy and morfo-biometric analyses of seeds from archaeological sites of Emilia Romagna (Northern Italy). *Plants and Culture: seeds of the cultural heritage of Europe*, 129-139, 2009.
- Evelyn, J. (1699). *Acetaria: A Discourse of Sallets* Gale.
- Chugh V., Mishra V., Dwivedi S. V., Sharma K. D. Purslane (*Portulaca oleracea* L.): An underutilized wonder plant with potential pharmacological value. *Pharma Innovation* 8(6), 236-246, 2019.
- Iranshahy M., Javadi B., Iranshahi M., Jahanbakhsh S. P., Mahyari S., Hassani F. V., Karimi G. A review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Portulaca oleracea* L. *J. Ethnopharmacol.* 205, 158-172, 2017.
- Zhu H., Wang Y., Liu Y., Xia Y., Tang T. Analysis of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-vis spectrophotometry with comparative study on different extraction technologies. *Food Anal. Methods* 3(2), 90-97, 2010.
- Xu X., Yu L., Chen G. Determination of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41(2), 493-499, 2006.
- Salehi P., Asghari B., Esmaeili M. A., Dehghan H., Ghazi I. -Glucosidase and-amylase inhibitory effect and antioxidant activity of ten plant extracts traditionally used in Iran for diabetes. *J. Med. Plants Res.* 7(6), 257-266, 2013.
- Yan, J., Sun, L. R., Zhou, Z. Y., Chen, Y. C., Zhang, W. M., Dai, H. F., & Tan, J. W. Homoisoflavonoids from the medicinal plant *Portulaca oleracea*. *Phytochemistry* 80, 37-41, 2012.
- Yue M. E., Jiang T. F., Shi Y. P. Simultaneous determination of noradrenaline and dopamine in *Portulaca oleracea* L. by capillary zone electrophoresis. *J. Sep. Sci.*, 28(4), 360-364, 2005.
- Tian J. L., Liang X., Gao P. Y., Li D. Q., Sun Q., Li L. Z., Song S. J. Two new alkaloids from *Portulaca oleracea* and their cytotoxic activities. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 16(3), 259-264, 2014.
- Zhou Y. X., Xin H. L., Rahman K., Wang S. J., Peng C., Zhang H. *Portulaca oleracea* L.: a review of phytochemistry and pharmacological effects.

- BioMed Res. Int.* Article ID 925631, 11 pages, 2015.
21. Yang Z., Liu, C., Xiang L., Zheng Y. Phenolic alkaloids as a new class of antioxidants in *Portulaca oleracea*. *Phytother. Res.: Intern. J. Dev. Pharmacol. Toxicol. Eval. Nat. Prod. Deriv.* 23(7), 1032-1035, 2009.
 22. Meng Y., Ying Z., Xiang Z., Hao D., Zhang W., Zheng Y., Ying X. The anti-inflammation and pharmacokinetics of a novel alkaloid from *Portulaca oleracea* L. *J. Pharm. Pharmacol.* 68(3), 397-405, 2016.
 23. Abdel Moneim E. A. The neuroprotective effects of purslane (*Portulaca oleracea*) on rotenone-induced biochemical changes and apoptosis in brain of rat. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets (Formerly Curr. Drug Targ.-CNS & Neurol Disord)* 12(6), 830-841, 2013.
 24. Simopoulos A. P., Tan D. X., Manchester L. C., Reiter R. J. Purslane: a plant source of omega-3 fatty acids and melatonin. *J. Pineal Res.* 39(3), 331, 2005.
 25. Liu L., Howe P., Zhou Y. F., Xu Z. Q., Hocart, C., Zhang R. Fatty acids and β -carotene in Australian purslane (*Portulaca oleracea*) varieties. *J. Chromatogr. A* 893(1), 207-213, 2000.
 26. Gill I., Valivety R. Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications. *Trends Biotechnol.* 15(10), 401-409, 1997.
 27. Nathan D. M., Meigs J., Singer D. E. The epidemiology of cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: how sweet it is... or is it?. *The Lancet* 350, S4-S9, 1997.
 28. Ghahramani, R., Eidi, M., Ahmadian, H., Hamidi Nomani, M., Abbasi, R., Alipour, M., & Anissian, A. Anti-diabetic effect of *Portulaca oleracea* (Purslane) seeds in alloxan-induced diabetic rats. *IJML* 3(4), 282-289, 2016.
 29. Li F., Li Q., Gao D., Peng Y., Feng C. Preparation and antidiabetic activity of polysaccharide from *Portulaca oleracea* L. *Afr. J. Biotechnol.*, 8(4), 569-573, 2009.
 30. Bai Y., Zang X., Ma J., Xu G. Anti-diabetic effect of *Portulaca oleracea* L. Polysaccharide and its mechanism in diabetic rats. *Int. J. Mol. Sci.* 17(8), 1201, 2016.
 31. Lan S., Fu-er L. U. Effects of *Portulaca oleracea* on insulin resistance in rats with type 2 diabetes mellitus. *Chin. J. Integr. Med.* 9(4), 289-292, 2003.
 32. Hadi A., Pourmasoumi M., Najafgholizadeh A., Kafeshani M., Sahebkar A. Effect of purslane on blood lipids and glucose: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Phytother. Res.* 33(1), 3-12, 2019.
 33. Samarghandian S., Borji A., Farkhondeh T. Attenuation of oxidative stress and inflammation by *Portulaca oleracea* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.* 22(4), 562-566, 2017.
 34. Chan K., Islam M. W., Kamil M., Radhakrishnan R., Zakaria M. N. M., Habibullah M., Attas A. The analgesic and anti-inflammatory effects of *Portulaca oleracea* L. subsp. *sativa* (Haw.) Celak. *J. Ethnopharmacol.* 73(3), 445-451, 2000.
 35. Li C. Y., Meng Y. H., Ying Z. M., Xu N., Hao D., Gao M. Z., Ying, X. X. Three novel alkaloids from *Portulaca oleracea* L. and their anti-inflammatory effects. *J. Agric. Food Chem.* 64(29), 5837-5844, 2016.
 36. Nayaka H. B., Londonkar R. L., Umesh M. K., Tukappa A. Antibacterial attributes of apigenin, isolated from *Portulaca oleracea* L. *Int. J. Bacteriol.* 175851, 2014. doi: 10.1155/2014/175851.
 37. Londonkar R., Nayaka H. B. Phytochemical and antimicrobial activities of *Portulaca oleracea* L. *J. Pharm. Res.* 4(10), 3553-3555, 2011.
 38. Mousavi S. M., Bagheri G., Saeidi S. Antibacterial activities of the hydroalcoholic extract of *Portulaca oleracea* leaves and seeds in sistán region, Southeastern Iran. *Int. J. Infect.* 2(2):e23214, 2015. doi: 10.17795/iji-23214.
 39. Oh K. B., Chang I. M., Hwang K. J., Mar W. Detection of antifungal activity in *Portulaca oleracea* by a single-cell bioassay system. *Phytother. Res.* 14(5), 329-332, 2000.
 40. Alsheikh-Ali A. A., Kuvin J. T., Karas R. H. Risk of adverse events with fibrates. *Am. J. Cardiol.* 94(7), 935-938, 2004.

41. Pragda S. S., Kuppast I. J., Mankani K. L., Ramesh L. Evaluation of antihyperlipidemic activity of leaves of *Portulaca oleracea* Linn against dexamethasone induced hyperlipidemia in rats. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 4(4), 279-283, 2012.
42. Niharika S., Sukumar D. Hypolipidemic Effect of Purslane (*Portulaca oleracea* L.) in Rats Fed on High Cholesterol Diet. *J. Nutr. Food Sci.* 6(6), 1-8, 2016.
43. El-Newary S. A. The hypolipidemic effect of *Portulaca oleracea* L. stem on hyperlipidemic Wistar Albino rats. *Ann. Agric. Sci.* 61(1), 111-124, 2016.
44. Sudhakar D., Kishore R. K., Parthasarathy P. R. *Portulaca oleracea* L. extract ameliorates the cisplatin-induced toxicity in chick embryonic liver. *Indian J. Biochem. Biophys.* 47, 185-189, 2010.
45. Kumar A., Sharma A., Vijayakumar M., Rao Ch. V. Antiulcerogenic effect of ethanolic extract of *Portulaca oleracea* experimental study. *Pharmacologyonline* 1, 417-432, 2010.
46. Karimi G., Hosseinzadeh H., Ettehad N. Evaluation of the gastric antiulcerogenic effects of *Portulaca oleracea* L. extracts in mice. *Phytother. Res.* 18(6), 484-487, 2004.
47. Karimi G., Khoei A., Omidi A., Kalantari M., Babaei J., Taghiabadi E., Razavi B. M. Protective effect of aqueous and ethanolic extracts of *Portulaca oleracea* against cisplatin induced nephrotoxicity. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 13(2), 31-35, 2010.
48. Hozayen W., Bastawy M., Elshafeey H. Effects of aqueous purslane (*Portulaca oleracea*) extract and fish oil on gentamicin nephrotoxicity in albino rats. *Nat. Sci.* 9, 47-62, 2011.
49. Kishore D. V., Moosavi F., Varma R. K. Effect of ethanolic extract of *Portulaca oleracea* linn. on ethylene glycol and ammonium chloride induced urolithiasis. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 5(2), 134-140, 2013.
50. Wang W., Gu L., Dong L., Wang X. Protective effect of *Portulaca oleracea* extracts on hypoxic nerve tissue and its mechanism. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 16, 227, 2007.
51. Wanyin W., Liwei D., Lin, J., Hailiang X., Changquan L., Min L. Ethanol extract of *Portulaca oleracea* L. protects against hypoxia-induced neuro damage through modulating endogenous erythropoietin expression. *J. Nutr. Biochem.* 23(4), 385-391, 2012.
52. Hongxing Z., Nancai Y., Guofu H., Jianbo S., Yanxia W., Hanju H., Hao H. Neuroprotective effects of purslane herb aqueous extracts against D-galactose induced neurotoxicity. *Chem. Biol. Interact.* 170(3), 145-152, 2007.
53. Moneim A. E. A., Al Nasr I., Dkhil M. A., & Al-Quraishy, S. Neuronal activities of *Portulaca oleracea* in adult rats. *J. Med. Plants Res.* 6(16), 3162-3168, 2012.
54. Xu Z., Shan Y. Anti-fatigue effects of polysaccharides extracted from *Portulaca oleracea* L. in mice. *Indian J. Biochem. Biophys.* 51, 321-325, 2014.
55. AL-Chalabi N. S. Effect of proteinous compounds from *Portulaca oleracea* L. plant on some biochemical parameters in mice. *Med. J. Babylon.* 2(2), 169-176, 2005.
56. Barakat L. A., Mahmoud R. H. The antiatherogenic, renal protective and immunomodulatory effects of purslane, pumpkin and flax seeds on hypercholesterolemic rats. *N. Am. J. Med. Sci.* 3(9), 411, 2011.
57. Lee A. S., Lee Y. J., Lee S. M., Yoon J. J., Kim J. S., Kang D. G., Lee, H. S. *Portulaca oleracea* ameliorates diabetic vascular inflammation and endothelial dysfunction in db/db mice. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2012, Article ID 741824. doi:10.1155/2012/741824.
58. Eidi A., Mortazavi P., Moghadam J. Z., Mardani P. M. Hepatoprotective effects of *Portulaca oleracea* extract against CCl₄-induced damage in rats. *Pharm. Biol.* 53(7), 1042-1051, 2015.
59. Zakaria A. S., Hazha J. H. Cytogenetic toxicity effects of local purslane (*Portulaca oleracea*) leaf crude extracts on normal and cancer cell lines in vitro. *Int. J. Drug Discov.* 5(1), 173, 2013.
60. Guo G., Yue L., Fan S., Jing S., Yan L. J. Antioxidant and antiproliferative activities of Purslane seed oil. *J. Hypertens.*: open access, 5(2), 2016.
61. Miao L., Tao H., Peng, Y., Wang S., Zhong Z., El-Seedi H., Xiao J. The anti-inflammatory poten-

- tial of *Portulaca oleracea* L. (purslane) extract by partial suppression on NF-κB and MAPK activation. *Food Chem.* 290, 239-245, 2019.
62. Shobeiri S. F., Sharei S., Heidari A., Kianbakht S. *Portulaca oleracea* L. in the treatment of patients with abnormal uterine bleeding: a pilot clinical trial. *Phytother. Res.: Intern J. Dev. Pharmacol. Toxicol. Eval. Nat. Prod. Deriv.* 23(10), 1411-1414, 2009.
 63. Agha-Hosseini F., Borhan-Mojabi K., Monsef-Esfahani H. R., Mirzaei-Dizgah I., Etemad-Moghadam S., Karagah A. Efficacy of purslane in the treatment of oral lichen planus. *Phytother. Res.: Intern. J. Dev. Pharmacol. Toxicol. Eval. Nat. Prod. Deriv.* 24(2), 240-244, 2010.
 64. El-Sayed M. I. K. Effects of *Portulaca oleracea* L. seeds in treatment of type-2 diabetes mellitus patients as adjunctive and alternative therapy. *J. Ethnopharmacol.* 137(1), 643-651, 2011.
 65. Moradi M. T., Gatreh Samani K., Farrokhi E., Rafieian-Kopaei M., Karimi A. The effects of purslane (*Portulaca oleracea* L.) on serum level of lipids, lipoproteins and paraoxanase 1 (PON1) activity in hypercholesterolemia patients. *Life Sci.* 9(4), 5548-5552, 2012.
 66. Parvin N., Farzaneh S., Vardanjani L. R., Goodarzi I., Nikfarjam M. 423-The effects of *Portulaca oleracea* L (purslane) on psychologic symptoms of schizophrenic patients. *Eur. Psychiatry* 28(S1), 1-1, 2013.
 67. Sabzghabae A. M., Kelishadi R., Jelokhanian H., Asgary S., Ghannadi A., Badri S. Clinical effects of *Portulaca oleracea* seeds on dyslipidemia in obese adolescents: a triple-blinded randomized controlled trial. *Med. Arch.* 68(3), 195, 2014.
 68. Esmailzadeh A., Zakizadeh E., Faghihimani E., Gohari M., Jazayeri S. The effect of purslane seeds on glycemic status and lipid profiles of persons with type 2 diabetes: A randomized controlled cross-over clinical trial. *J. Res. Med. Sci. Official J. Isfahan Univ. Med. Sci.* 20(1), 47, 2015.
 69. Zakizadeh E., Faghihimani E., Saneai P., Esmailzadeh A. The effect of purslane seeds on biomarkers of oxidative stress in diabetic patients: A randomized controlled cross-over clinical trial. *Int. J. Prev. Med.* 6(1), 95, 2015.
 70. Mohammadzadeh M., Rezaei N., Kamran E., Abdolhoseinpour F., Moqadam I. F., Najafi S. Evaluation of antioxidant efficacy of Purslane extract in Patients with Recurrent Aphthous Stomatitis: a randomized, placebo-controlled, triple-blinded, clinical. *Braz. J. Oral Sci.* 15(3), 234-237, 2016.
 71. Dehghan F., Soori R., Gholami K., Abolmaesoomi M., Yusof A., Muniandy S., Farzanegi P. Purslane (*Portulaca oleracea*) seed consumption and aerobic training improves biomarkers associated with atherosclerosis in women with type 2 diabetes (T2D). *Sci. Rep.* 6(1), 1-11, 2016.
 72. Mokhtarifar A., Zeydabadi F. A., Asili J., Kooshyar M. M., Sahebkar A. The effect of *Portulaca oleracea* (purslane) seeds on hemoglobin levels in adolescent girls with iron deficiency anemia: a randomized comparative trial. *Comp. Clin. Path.* 26(1), 11-16, 2017.
 73. Mirzaei N., Moghaddam F. S., Ozgoli G., Sahranavard S., Ghasemi E. Purslane (*Portulaca oleracea*) effect on heavy menstrual bleeding (menorrhagia) in Iranian women. *Adv. Integr. Med.* 5(2), 56-62, 2018.
 74. Gheflati A., Adelnia E., & Nadjarzadeh A. The clinical effects of purslane (*Portulaca oleracea*) seeds on metabolic profiles in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A randomized controlled clinical trial. *Phytother. Res.* 33(5), 1501-1509, 2019.
 75. Niazi A., Yousefzadeh S., Rakhshandeh H., Esmaily H., Askari V. R. Promising effects of purslane cream on the breast fissure in lactating women: A clinical trial. *Complement. Ther. Med.* 43, 300-305, 2019.
 76. Jaiswal G. Purslane in Cosmetics: A Review. *IJSR*, 7 (11), 1341-1344, 2016.
 77. Leung W. K., Wu J. C., Liang S. M., Chan L. S., Chan F. K., Xie H., Sung J. J. Treatment of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome with traditional Chinese herbal medicine: a randomized placebo-controlled trial. *Am. J. Gastroenterol.* 101(7), 1574-1580, 2006.
 78. Wainstein J., Landau Z., Dayan Y. B., Jakubow-

- icz D., Grothe T., Perrinjaquet-Moccetti T., Boaz M. Purslane extract and glucose homeostasis in adults with type 2 diabetes: A double-blind, placebo-controlled clinical trial of efficacy and safety. *J. Med. Food* 19(2), 133-140, 2016.
79. Petropoulos S. A., Karkanis A., Fernandes Â., Barros L., Ferreira I. C., Ntatsi G., Khah E. Chemical composition and yield of six genotypes of common purslane (*Portulaca oleracea* L.): An alternative source of omega-3 fatty acids. *Plant Foods Hum. Nutr.* 70(4), 420-426, 2015.
80. <https://www.asPCA.org/>. (<https://www.asPCA.org/pet-care/animal-poison-control/toxic-and-non-toxic-plants/portulaca>). 2021 American Society for the Prevention of Cruelty to Animals
81. Simões João G., Medeiros R.M.T, Márcia A. Medeiros, Olinda R.B, Antônio Dantas F.M., Riet-Correa F. "Nitrate and nitrite poisoning in sheep and goats caused by ingestion of *Portulaca oleracea*." *Pesqui. Vet. Brasi.* 38, no. 8: 1549-1553, 2018.
82. Radostits Otto M., Gay C. C., Hinchcliff K. W., Constable P. D.. "A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats." *Vet. Med.* 10, 2045-2050, 2007.
83. Pugh D. G. "Clínica de ovinos e caprinos. 1rt edn Roca." *São Paulo*, 2004.
84. Jönck F., Gava A., Traverso S. D., Lucioli J., Furlan F. H., Gueller E. Intoxicação espontânea e experimental por nitrato/nitrito em bovinos alimentados com *Avena sativa* (aveia) e/ou *Lolium* spp.(azevém). *Pesq. Vet. Bras.* 33(9), 1062-1070, 2013.
85. Medeiros R. M., Riet-Correa F., Tabosa I. M., Silva Z. A., Barbosa R. C., Marques A. V., Nogueira F. R. Intoxicação por nitratos e nitritos em bovinos por ingestão de *Echinochloa polystachya* (capim-mandante) e *Pennisetum purpureum* (capim-elefante) no sertão da Paraíba. *Pesq Vet. Bras.*,23(1), 17-20, 2003.
86. Gonnella M., Charfeddine M., Conversa, G., Santamaria P. Purslane: a review of its potential for health and agricultural aspects. *Eur. J. Plant Sci. Biotech.* 4, 131-6, 2010.



Development and Validation of Spectrophotometric Method for Simultaneous Estimation of Valsartan and Atenolol in Binary Mixtures: Application to Tablets Analysis

Kateryna Peleshok, Olha Poliak, Liubomyr Kryskiw, Agyemang Fredua Sarpong, Nadiya Zarivna, Dmytro Korobko, Hryhorii Zahrychuk, Nataliy Horlachuk, Andriy Sverstiuk, Larysa Levytska, Liliya Logoyda*
I. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ternopil, Ukraine

KEYWORDS:

Valsartan, Atenolol,
Spectrophotometry,
Validation

ABSTRACT

Introduction. Rational combinations of drugs of different pharmacological groups in case of ineffectiveness of monotherapy to achieve the clinical effect of pharmacotherapy are clearly recommended in the world and domestic recommendations for the diagnosis and treatment of hypertension. **The aim of the study** was to develop simpler and cost effective spectrophotometric method for simultaneous estimation of valsartan and atenolol for routine analysis of formulation. **Research methods.** A spectrophotometric method for the determination of valsartan and atenolol was developed with the study of green profile assessment and validated as per ICH guidelines. **Results and discussion.** The drugs were found to obey beers law at the selected wavelength. The overlain spectra of the valsartan and atenolol in methanol were recorded and λ_{max} values of both drugs and isobestic wavelength were noted. The linear regression data for the calibration curves showed good linear relationship over the concentration range 0.015 - 0.045 mg/ml for valsartan. Linear regression equation was found to be $Y = 30.627X - 0.1347$ ($R^2=0.9997$). The linear regression data for the calibration curves showed good linear relationship over the concentration range 0.12 - 0.25 mg/ml for atenolol. Linear regression equation was found to be $Y = 5.3018X - 0.053$ ($R^2=0.999$). The % RSD values found to be less than 2, indicating that the proposed method is precise for the determination of valsartan and atenolol in formulations

* CORRESPONDING AUTHOR:

Liliya Logoyda
email: logojda@tdmu.edu.ua

The developed, validated method was successfully applied for the determination of valsartan and atenolol in their tablet dosage form. The results of proposed method found to be an excellent green analysis with a score of 90. **Conclusions.** A rapid, simple, green, accurate and precise spectrophotometric method was developed and validated for the simultaneous estimation of valsartan and atenolol in its tables dosage form. From the results of validation obtained it is concluded that the proposed UV spectrophotomertic method developed is relatively simple, rapid, and cost effective and therefore, could be applied as alternative method for routine quality control assay of valsartan and atenolol in pharmaceutical raw material, binary mixture and dosage forms.

INTRODUCTION

The urgency of hypertension as an issue is determined by its high population frequency, significant burden of the disease, risk of disability and impact on life expectancy. Rational combinations of drugs of different pharmacological groups in case of ineffectiveness of monotherapy to achieve the clinical effect of pharmacotherapy are clearly recommended in the world and domestic recommendations for the diagnosis and treatment of hypertension. For such purposes, effective and reliable methods for the analysis of the determination of active pharmaceutical ingredients (APIs) in bulk, model mixtures and drugs should be developed¹⁻³. In this study, valsartan and atenolol were chosen as representative examples.

Valsartan (**Fig. 1**) is chemically described as (2*S*)-3-methyl-2-[pentanoyl-[[4-[2-(2*H*-tetrazol-5-yl)phenyl]phenyl]methyl]amino]butanoic acid. Valsartan is an orally active nonpeptide triazole-derived antagonist of angiotensin (AT) II with antihypertensive properties.

Atenolol (**Fig. 2**) is a synthetic isopropylamino-propanol derivative used as an antihypertensive, hypotensive and antiarrhythmic. Atenolol is chemically known as 2-[4-[2-hydroxy-3-(propan-2-ylamino)propoxy]phenyl]acetamide.

Search of recent publications in Pubmed and ScienceDirect shows that there are no spectrophotometric method for simultaneous determination of

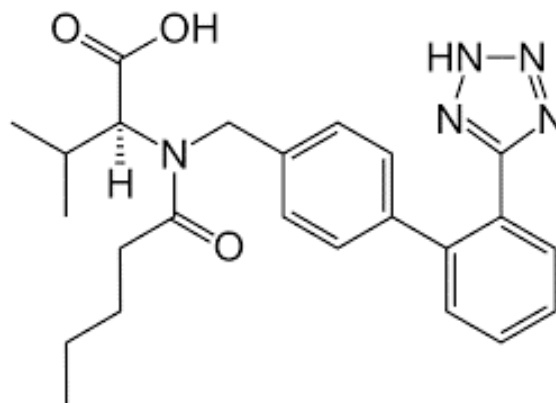


Figure 1: Chemical structure of valsartan

valsartan and atenolol in dosage forms⁴⁻³⁵. In the contemporary literature, only chromatographic methods published by our group are reported, for quantification of valsartan and atenolol in dosage forms³⁶⁻³⁸. These HPLC methods are accurate and precise with good reproducibility, but the cost of analysis is quite high owing to expensive instrumentation, reagent and expertise. Hence it is worthwhile to develop simpler and cost effective spectrophotometric method for simultaneous estimation of drugs for routine analysis of formulation. Pharmaceutical development of valsartan and atenolol by our scientific group proposes for using the ratio of (1/1) for valsartan (80 mg) and atenolol (100 mg). The pur-

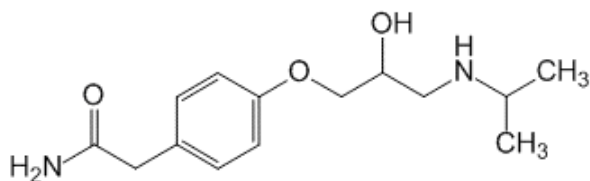


Figure 2: Chemical structure of atenolol

pose of this research was to establish such a method to be used for the analysis of the drug composition of tablets.

METHODS

Chemicals, reagents. instrument

Valsartan (purity 99.9%) and atenolol (purity 98.9%) were purchased from Sigma-Aldrich (Switzerland). Methanol used in experiments was HPLC gradient grade. Analytical Balance Mettler Toledo MPC227 was used for sample agitation.

A double-beam Shimadzu UV-Visible spectrophotometer, with spectral bandwidth of 1 nm wavelength accuracy ± 0.5 nm, Model -UV 1800 (Japan), Software UV-Probe 2.62, and a pair of 1 cm matched quartz cells, was used to measure absorbance of the resulting solution. Designed in accordance with the governing Japanese and European Pharmacopoeia, the new UV-1800 UV-VIS spectrophotometer achieves a resolution of 1 nm, the highest in its class, in a compact design.

Sample preparation

Twelve tablets of each preparation were studied to obtain statistically significant results. The tablets with declared contents of valsartan and atenolol were purchased from local drug store, pharmacy. The tablets were put in 100 mL volumetric flasks and dissolved in 50 mL methanol, ultrasound crushed and treated for 2 minutes and shaken 15 min with orbital shaker. After that volumetric flasks were filled to mark for 100 mL, the final concentrations were 0.5 mg/mL for atenolol and 0.4 mg/mL for valsartan.

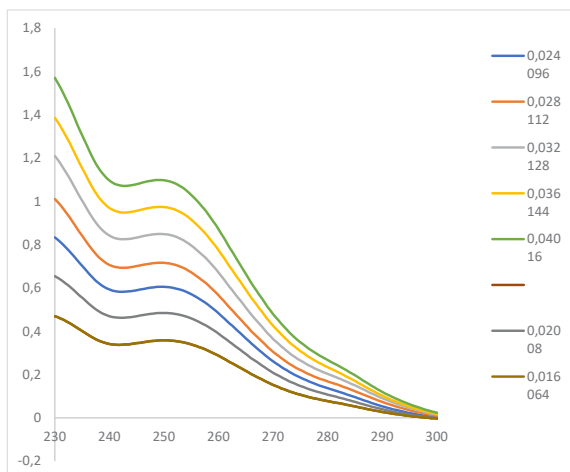


Figure 3: Absorption spectra of seven different concentrations of valsartan ($\lambda=230.5$ nm, 249.5nm)

RESULTS AND DISCUSSION

The drugs were found to obey Beer's law at the selected wavelength. The maximum absorption spectra of valsartan (**Fig. 3**), atenolol (**Fig. 4**) and their binary mixture (**Fig. 5**) were obtained. The overlaid spectra of the valsartan and atenolol in methanol were recorded and λ_{max} values of both drugs and isobestic wavelength were noted.

The method was validated according to the ICH guideline for the Validation of analytical procedures Q2((Q1A (R2) 2003, Q2A 1994, Q2B 1996)³⁹. The solutions of the drugs were prepared as per the procedure given in the Methods.

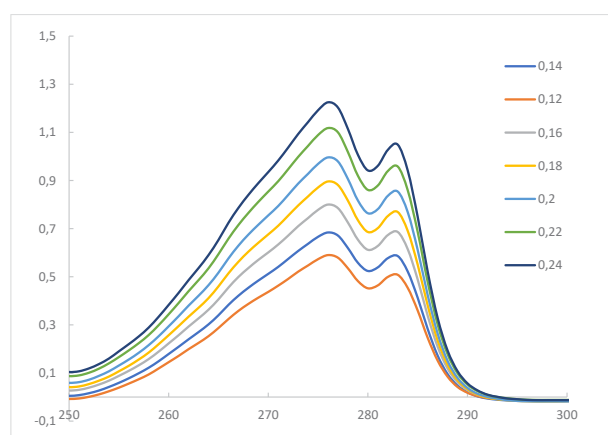
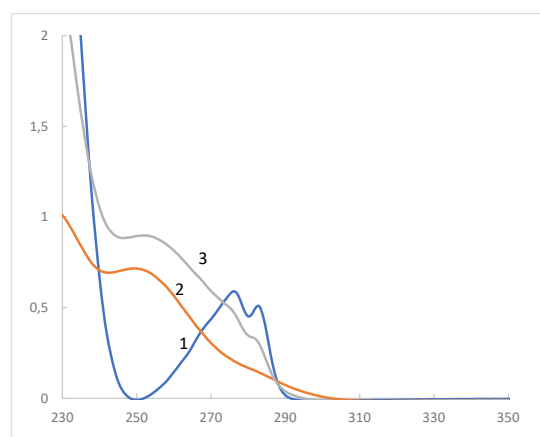
The calibration curve for valsartan showed good linear relationship over the concentration range 0.015 - 0.045 mg/mL. Linear regression equation was found to be $Y = 30.627X - 0.1347$ ($R^2=0.9997$). Calibration curve of valsartan is presented in **Fig. 6**.

The calibration curve for atenolol showed good linear relationship over the concentration range 0.12 - 0.25 mg/mL. The corresponding linear regression equation was found to be $Y = 5.3018X - 0.053$ ($R^2=0.999$). The calibration curve of atenolol is presented in **Fig. 7**.

The statistical data for both calibration curves are presented in **Table 1**.

Table 1: Calibration results data

Parameter	Results of valsartan	Results of atenolol
Regression equation; Slope (b)	0.1347	0.053
Intercept (a)	30.627	5.3018
Correlation coefficient	0.9997	0.999
Standard deviation on intercept(Sa)	0.0195	0.0099
Standard deviation on slope (Sb)	0.00212	0.00014
Standard error on estimation(Se)	0.0123	0.0071
Limits of Detection (LOD)[mg/ml]	0.004	0.04
Limits of Quantification [LOQ][mg/ml]	0.016	0.13

**Figure 4:** Absorption spectra of seven different concentrations of atenolol ($\lambda=276$ nm, 282nm)**Figure 5:** Electronic absorption spectra of the analytes in binary mixture in the 230-350 nm region (1 – atenolol, 2 – valsartan, 3 – binary mixture of valsartan and atenolol)

The precision of the developed method was expressed in terms of % relative standard deviation (%RSD). The % RSD values found to be less than 2, indicating that the proposed method is precise for the determination of valsartan and atenolol in formulations (**Table 2**).

The developed, validated method was successfully applied for the determination of valsartan and atenolol in their tablet dosage form. The assay result shows that the amount of the drugs was in excellent agreement with the labelled value of the formulation as illustrated in **Table 3**.

Analytical eco-scale for greenness assessment

Methanol is the most broadly used solvents in most analytical methods, and it is worth mentioning that methanol is rated by the U.S. Environmental Protection Agency as hazardous solvents, given their inherent toxicity and the fact that their disposal necessitates specialized treatment steps. Analytical eco-scale is a semi-quantitative assessment tool commonly used for examining the greenness of analytical methods in a comparative manner^{40, 41}. It is based on assigning a numerical

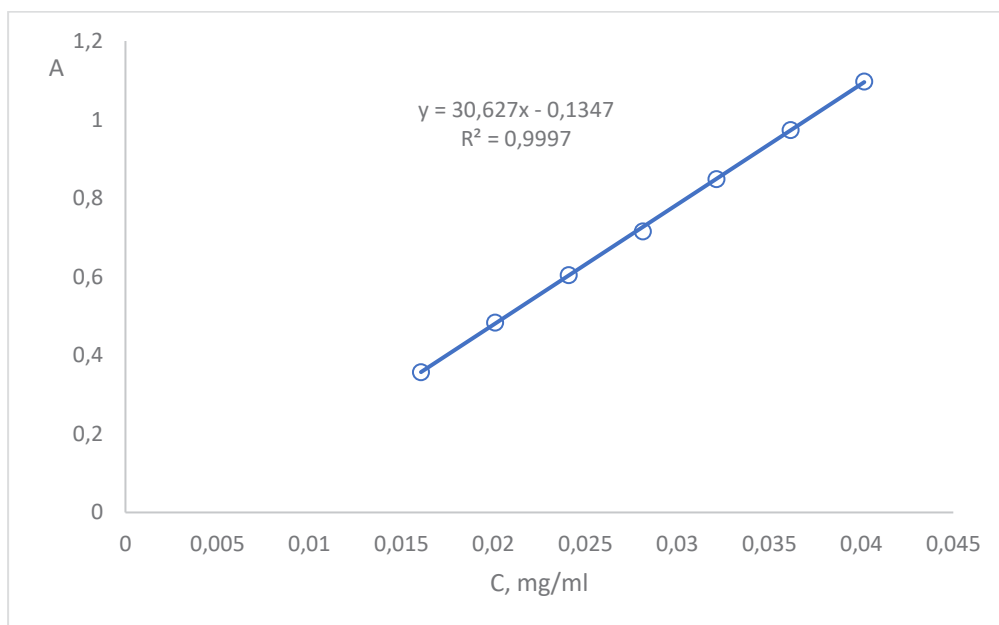


Figure 6: Calibration plot of valsartan

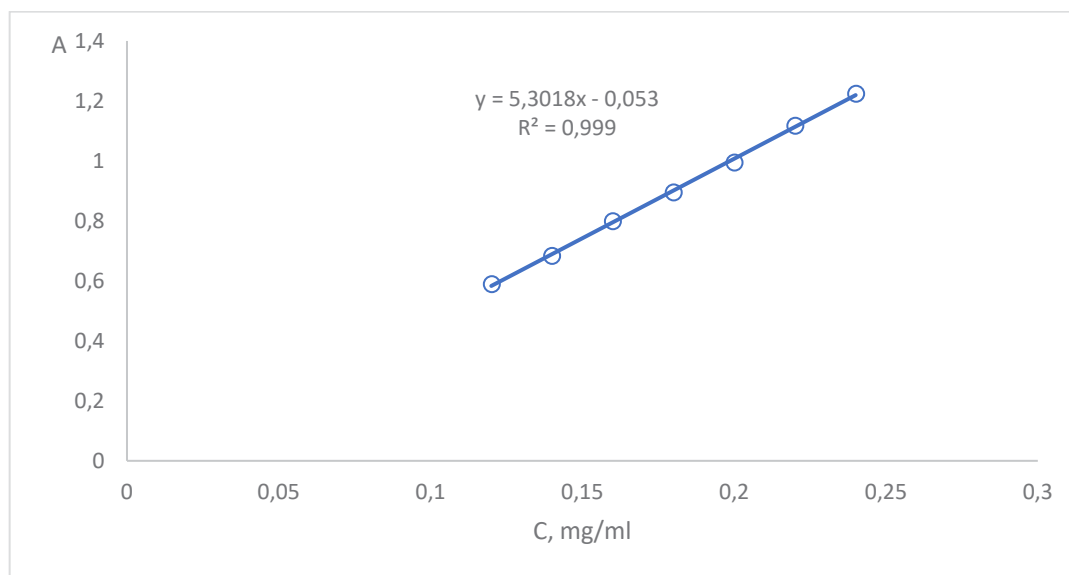


Figure 7: Calibration plot of atenolol

score, penalty points, for every step in the whole analytical method that may affect the green system such as solvents, their amounts, energy consumption, occupational risk and waste generated hazards.

The basis for concept of an analytical Eco-Scale

is that the ideal green analysis has a value of 100. For each of analytical procedure parameters (amount of reagents, hazards, energy and waste), penalty points are assigned if it departs from ideal green analysis [38]. The sum of penalty points for the whole procedure should be included in the

Table 2: Intra-and Inter-day accuracy and precision results for valsartan and atenolol

Analyte	Intra-day precision ^a		Inter-day precision ^b	
	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)
Valsartan	98.95	0.493	100.23	0.335
	100.91	0.117	100.93	0.364
	98.76	0.429	99.49	0.364
Atenolol	99.84	0.348	99.59	0.138
	100.19	0.125	99.17	0.364
	100.47	0.135	100.29	0.110

^an=6, ^bn=18.**Table 3: Results of analysis for valsartan and atenolol in formulations**

S. No	Formulation	Labelled amount, mg/tablet	Amount found, mg/tablet	Mean % assay±SD	% RSD
1	Valsartan tablets	80	79,98	99.97±0.1	0.100
2	Atenolol tablets	100	99.96	99.96±0.1	0.100

*Average of 5 determinations; SD: standard deviation; RSD: relative standard deviation

Table 4: Analytical eco-scale for greenness assessment of the proposed spectrophotometric method

Parameters	Penalty points (PP)
Reagents Methanol	6
Energy consumption	1
Occupational hazards	0
Waste	3
Total penalty points (PP)	10
Analytical Eco-scale score	90
Comment	Excellent green analysis

Eco-Scale calculation, according to the following formula: Analytical Eco-Scale $\frac{1}{4}$ 100 total penalty points. The result of calculation is ranked on a scale, where the score: >75 represents excellent green analysis, >50 represents acceptable green analysis⁴¹.

Table 4 summarizes the results of proposed method found to be an excellent green analysis with a score of 90.

CONCLUSION

In conclusion, a rapid, simple, green, accurate and precise spectrophotometric method was developed and validated for the simultaneous estimation of valsartan and atenolol in its tablets dosage form. From the results of validation obtained it is concluded that the proposed UV spectrophotometric method developed is relatively simple, rapid, and cost effective and therefore, could be

applied as alternative method for routine quality control assay of valsartan and atenolol in pharmaceutical raw material, binary mixture and dosage forms. Moreover, the chemicals and reagents used in the analysis are cheap and available. The proposed method can help research studies, quality control and routine analysis with lesser resources available. The results of the assay of pharmaceutical formulation of the developed method are highly reliable and reproducible and is in good agreement with the label claim of the drugs. □

Acknowledgement

Authors are grateful to the Ministry of Health of Ukraine Fund for providing scholarship for studies related to solutions for development of original combinations of antihypertensive agents, their analysis and standardization (0120U104201 (№509 date 24.02.2020)).

Source of Support: Nil.

Conflict of Interest: None declared.

REFERENCES

1. Gradman A.H., Basile J.N., Carter B.L., Bakris G.L. American Society of Hypertension Writing, Combination therapy in hypertension, *J. Am. Soc. Hypertens.* 4, 90-98, 2010.
2. Nahan R.L., Barnes P.M., Stussman, B.J., Bloom B. Costs of complementary and alternative medicine (CAM) and frequency of visits to CAM practitioners: *United States, 2007. National Health Statistics Reports no. 18. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics*; 2009, 2011.
3. Marushchak M., Maksiv K., Krynytska I. ACE gene I/D polymorphism and arterial hypertension in patients with COPD. *Pneumologia*, 68, 114-119, 2019.
4. Gupta K.R., Wadodkar A.R., Wadodkar S.G. UV-Spectrophotometric methods for estimation of Valsartan in bulk and tablet dosage form. *Int.J. ChemTech Res.* 2, 985-989, 2010.
5. Kalaimagal A., Jerad S.A., Niraimathi V. Spectrophotometric methods for the estimation of valsartan in bulk and oral dosage form. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 4, 481-483, 2012.
6. Rao G.S., Rao G.V., Vardhan S., Ramachandran D. Development and validation of new UV-spectrophotometric assay method for valsartan in pure and in formulations, *J. Chem. Pharm. Res.* 5, 229-232, 2013.
7. Nataraj K.S., Charya S.V.R., Goud E.S., Saigeethika S., Ramanjineyulu K. Simple quantitative method development and validation of valsartan in pureform and pharmaceutical dosage forms BYUV- spectroscopy. *Int.J. Pharm. Biol. Sci.* 1 (2), 2011.
8. Patel N.R., Patel S.K. First derivative spectrophotometric method for the simultaneous estimation of valsartan and hydrochlorthiazide in their combined dosage form. *Int. J. Pharm. Life Sci.* 3, 1828-1832, 2012.
9. Ramachandran S., Mandal B.K., Navalgund S.G. Simultaneous spectrophotometric determination of valsartan and ezetimibe in pharmaceuticals, *Trop. J. Pharm.Res.* 10, 809-815, 2011.
10. Nikam M.B., Dhamane H., Aligave A., Kondawar M.S. Simultaneous estimation of valsartan, amlodipine besylate and hydrochlorothiazide by first order derivative UV spectrophotometric method. *Int. J. Pharm. Technol.* 2, 642-650, 2010.
11. Selvan P.S., Gowda K.V., Mandal U., Solomon W.D.S., Pal T.K. Simultaneous determination of fixed dose combination of nebivolol and valsartan in human plasma by liquid chromatographic-tandem mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B* 858, 143-150, 2007.
12. Sabi-mouka E.M.B., Agbokponto J.E., Zhang R., Li Q., Ding L. Simultaneous determination of a fixed-dose combination of lercanidipine and valsartan in human plasma by LC-MS-MS:

- Application to a pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. Sci.* 54, 1553-1559, 2016.
13. Koseki N., Kawashita H., Hara H., Niina M., Tanaka M., Kawai R., Nagae Y., Masuda N. Development and validation of a method for quantitative determination of valsartan in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43, 1769-1774, 2007.
 14. Satana E., Altınay S., Göğçer N.G., Özkan S.A., Sentürk Z. Simultaneous determination of valsartan and hydrochlorothiazide in tablets by first-derivative ultraviolet spectrophotometry and LC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 5, 1009-1013, 2001.
 15. Tian D.F., Tian X.L., Tian T., Wang Z.Y., Mo F.K. Simultaneous determination of valsartan and hydrochlorothiazide in tablets by RP-HPLC. *Indian J. Pharm. Sci.* 70, 372-374, 2008.
 16. Chitlange, S.S., Bagri K., Sakarkar D.M. Stability Indicating RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Valsartan and Amlodipine in Capsule Formulation. *Asian J. Research Chem.* 1, 15-18, 2008.
 17. Galande V.R., Baheti K.G., Indraksha S., Dehghan M.H. Estimation of amlodipine besylate, valsartan and hydrochlorothiazide in bulk mixture and tablet by UV spectrophotometry. *Indian J. Pharm. Sci.* 74, 18-23, 2011.
 18. Liu F., Zhang J., Xu Y., Gao S., Guo Q. Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and valsartan in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Lett.* 41, 1348-1365, 2008.
 19. Thanusha G., Jose C., Babu G., Basavaraj K.P.C., Panditi V.R., Sharadha C. Validated RP-HPLC method for the quantitative estimation of valsartan in bulk and pharmaceutical dosage forms. *Int. J. ChemTech Res.* 2, 1194-1198, 2010.
 20. Kumar P.V.S., Sahu M., Prasad K.D., Shekhar M.C. Development and validation of analytical method for the estimation of valsartan in pure and tablet dosage form by RP-HPLC method. *Int. J. Res. Pharm. Chem.* 1, 945-949, 2011.
 21. Vinzuda D.U., Sailor G.U., Sheth N.R. RP-HPLC method for determination of valsartan in tablet dosage form. *Int. J. ChemTech Res.* 2, 1461-1467, 2010.
 22. Kendre M.D., Banerjee S.K. Precise and accurate RP-HPLC method development for quantification of valsartan in tablet dosage form. *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.* 4, 137-139, 2012.
 23. Macek J., Klima J., Ptacek P. Rapid determination of valsartan in human plasma by protein precipitation and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 832, 169-172, 2006.
 24. Gonzalez L., Lopez J.A., Alonso R.M., Jimenez R.M. Fast screening method for the determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Chromatogr. A* 949, 49-60, 2002.
 25. Lalitha G., Salomi P., Ravindra R.K. Development of an analytical method and its validation for the analysis of atenolol in tablet dosage form by UV-Spectrophotometry. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 5, 197-199, 2013.
 26. Attia K.A.-S.M., Nassar M.W., Abolmagd, E. Simultaneous spectrophotometric determination of amlodipine and atenolol in pharmaceutical preparations using chemometric techniques. *ACAIJ.* 16, 205-210, 2016.
 27. Lalitha K.V., Kiranjyothi R., Padma B. UV Spectrophotometric method development and validation for the determination of Atenolol and Losartan Potassium by Q-analysis, *Int. Bull. Drug Res.* 3, 54-62, 2013.
 28. Agarwal R., Gfandis A. Kinetic spectrophotometric determination of atenolol in perchloric acid medium. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 4, 350-352, 2012.
 29. Basavaiah K., Chandrashekar U., Nagegowda P. Titrimetric, spectrophotometric and kinetic methods for the assay of atenolol using bromate-bromide and methyl orange. *J. Serbian Chem. Soc.* 71, 553-563, 2006.
 30. Pai N.R., Patil S.S. Development and validation of liquid chromatographic method for atenolol and its related substance. *Der Pharm. Sin.* 4, 76-84, 2013.

31. Naikini P., Akula A., Ajitha A., Rao V.U.M. RP-HPLC method development and validation for the simultaneous estimation of amlodipine and atenolol in bulk and tablet dosage forms. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 6, 390-394, 2014.
32. Chaudhari V., Hussian S., Ubale M. A newer validated and stability indicating HPLC method for the estimation of Atenolol and Hydrochlorothiazide in bulk drug and dosage form. *Int. J. Chem. Stud.* 1, 93-101, 2013.
33. Belal F., Sharaf M., Aly F., Hefnawy M., Awady M. Stability-indicating HPLC Method for the Determination of Atenolol in Pharmaceutical Preparations. *J. Chromatogr. Sep. Tech.* 4, 1-7, 2013.
34. Yilmaz B., Arslan S. Determination of atenolol in human urine by gas chromatography-mass spectrometry method. *J. Chromatogr. Sci.* 49, 365-369, 2011.
35. Tengli A.R., Gurupadayya B.M. Method development and validation of tablet dosage form containing losartan, atenolol and hydrochlorothiazide using internal standard by RP-HPLC. *J. Chromatogr. Sep. Tech.* 4, 1-5, 2013.
36. Piponski M., Peleshok K., Logoyda L., Kravchuk L., Piatnochka V., Zakharchuk U. Efficient Validated HPLC/UV Method for Determination of Valsartan and Atenolol in Dosage Form And In Vitro Dissolution Studies. *Biointerface Res. Appl. Chem.* 10, 6669 - 6675, 2020.
37. Peleshok K., Piponski M., Ajie E.A., Poliak O., Zarivna N., Denefil O., Logoyda L., Novel HPLC-UV method for simultaneous determination of valsartan and atenolol in fixed dosage form; Study of green profile assessment. *Pharmacia*, 68, 43-51, 2021.
38. Peleshok K., Piponski M., Kovalenko S., Ahmed H., Abdel-Megied A., Ezike O. F., Logoyda L., New liquid chromatography assays for simultaneous quantification of antihypertensives atenolol and valsartan in their dosage forms. *J. Sep. Sci.* 44, 565-575, 2021.
39. ICH Q2 (R1), Validation of analytical procedures, Text and methodology. International Conference on Harmonization, Geneva; 2005. p. 1-17. Available from: [http://www.gmp-compliance.org/guidemgr/files/Q2\(R1\).PDF](http://www.gmp-compliance.org/guidemgr/files/Q2(R1).PDF) Accessed 18 Jul 2019.
40. Van Aken K., Strekowski L., Patiny L. EcoScale, a semi-quantitative tool to select an organic preparation based on economical and ecological parameters. *Beilstein J. Org. Chem.* 2, 3, 2006.
41. Gałuszka A., Konieczka P., Migaszewski Z.M., Namiesnik J. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures, *Trends Anal. Chem.* 37, 61-72, 2012.



Methodological Approach to the Selection of Filtering Materials for Injectable Medicines in Polyethylene Ampoules

Viacheslav Shevchenko¹, Svitlana Rolik-Attia², Yevhen Bezrukavyy³

¹Department of Industrial Pharmacy and Economy, National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²Department of General Pharmacy and Safety of Drugs, National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

³Department of Technologies of Pharmaceutical preparations, National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

KEYWORDS:

polyethylene ampoules,
solution, filtration,
piracetam 20%

ABSTRACT

The aim of the has been studied is to select the optimal filter material to obtain a sterile injectable solution of piracetam 20%. One of the main requirements that apply to injection solutions is sterility and the absence of mechanical impurities. The filtration system must be reliable and easily controlled, since the use of filters that are not strong enough and clog the test solution with particles of the filter material leads to poor quality medicines. Therefore, it is necessary to constantly improve methods of filtration of parenteral drugs.

At the stage of pharmaceutical development, the influence of the filter membrane material on the quality of the solution to be filtered has been determined. A practical pattern of the choice of filters in the study of injectable solution of piracetam 20% and filter materials based on polyvinylidene fluoride (PVDF), polyester sulfone (PES) and nylon was provided. Studies have been conducted to identify possible processes of migration and sorption of solution components and filter membranes using instrumental methods of analysis, as well as to determine the sterilizing ability of filters with a membrane rating of not more than 0.2 μm .

The possibility of using all investigated filters in the commercial production of the medicine piracetam 20% has been proved. Using the results of this work will eliminate long-term and numerous studies on the selection of filter material during development of the technological stage of filtration in the production of injectable medicines.

* CORRESPONDING AUTHOR:

Viacheslav Shevchenko,
e-mail: SVAVON@ukr.net,
promek-ipksf@nuph.edu.ua

1. Introduction

The main indicators of the quality of injection medicines include such indicators as mechanical inclusions: visible and invisible particles^{1,2}. Achieving the regulated limits of this indicator is carried out not only by implementation of the requirements General Manufacturing Practice (GMP) in the production of drugs, but first of all, by carrying out one of the most important stages of the technological process - the prepared solution the filtration stage of. The development of new drugs, in addition to reformulation and formulation, includes the development of a technological process³, one of it is researching the choice of the stages on of filter material, determining the filtration efficiency through the selected filter and developing methods for monitoring filtration efficiency⁴. The final stage of the filtration process is the validation of filtration. It confirms that the process of filtration of the prepared solution during the technological process of obtaining the final product. The quality of attributes of product meets all the requirements of regulatory and technical documentation⁵.

Filtration is a complex of hydromechanical processes. Their efficiency of it has been determined by the properties of the separated dispersed media, the porous partition and the conditions of conduction. Filtration (as one of the key operations in the production of injectable dosage forms)⁶, requires the correct choice of filter unit, material and pore size of the filter; filtration rate etc.⁷ In addition, the filtration system must be reliable and controlled easily. The use of filters (having no sufficient strength and contaminate the filtrate with particles of filter material), causes the need of purifying the solutions after the main filtration⁸.

The process of prepared solutions filtration is one of the most important stage in the technological process in the production of injectable medicines. Sterility and the absence of mechanical inclusions are important indicators of the quality of injectable solutions^{9,10}. To ensure these indicators, the production of injectable medicines is carried out in appropriate conditions using some organizational

measures. They minimize the possibility of ingress microorganisms and mechanical inclusions into drugs at all stages of the technological process^{11,12}. The most impotent stage among the measures is the stage of the technological process - filtration of the solution¹³.

Removal of mechanical inclusions is achieved by filtering the injection solutions through a suitable filter material. In pharmaceutical practice for filtering injectable solutions the most common filters are membrane-type filters with a pore size of 0.45 to 1.0 μm for pre-filtration and 0.2 μm for sterilizing filtration¹⁴. Filtration through a system of membrane filters with a pore size of 1.0 μm - 0.2 μm allows you to combine the processes of injection solutions sterilization and removal of mechanical inclusions.

Among all the areas of applications for the purification and separation of membrane filters liquids used in the manufacture of medicines are characterized by the strictest quality requirements and conditions of their production and use. Filters for aseptic production of injectable solutions in polyethylene ampoules are the only possible method of sterilization^{15, 16}. Such increased attention to the process of sterilizing filtration is also explained by the fact that filtration is still a rather risky method of sterilization. The purpose of sterilizing filtration in aseptic conditions of pharmaceutical medicines is not only the removal of mechanical particles. It also means the removal of all living microorganisms out of the solutions¹⁷. Validation of the sterilizing filtration process should be confirmed in regard to the ability of the filter element to sterilize the product¹⁸.

Since the production of injectable medicines in polyethylene ampoules does not involve the process of thermal sterilization in the primary packaging^{19,20}, the reliability of the filtration process. It has been achieved by performing certain tests, significantly affects the production of the finished product of proper quality.

The **aim** of the research was to substantiate the methodological approach to the development of the filtration process of solutions containing substances of different chemical structures, using a prepared solution of piracetam. To the purpose the experience of pharmaceutical development for med-

icines in polyethylene ampoules, implemented in the Joint-stock company "NIKO" (JSC NIKO COMPANY, Ukraine), was considered.

2. Materials and Methods.

2.1 Materials.

The research object was a solution of piracetam 20% prepared in the experimental laboratory JSC NIKO COMPANY, Ukraine. As well as filter membranes, were made of materials based on: polyvinylidene difluoride, "Durapore" (catalog number GSVWP 04700), manufactured by the company «Millipore», USA; polyester sulfone, «PROPOR PES» (catalog number ZDMS-047-020AZ), manufactured by the company «Parker Domnick hynter ltd», United Kingdom; nylon, «Ultipor N 66» (catalog number AB1NF7PH4), manufactured by the company «Pall», Germany.

2.2 Methods.

All studies have been performed using the methods according to the State Pharmacopoeia of Ukraine of the second edition⁹:

2.2.1. Determination of the degree coloration of the piracetam solution 20%.

2.0 ml of the test liquid is compared with 2.0 ml of water using identical colorless clear neutral glass test tubes with an outer diameter of 12 mm. Color comparisons are performed in diffused daylight by looking at the samples horizontally on a white background.

2.2.2. Potentiometric determination pH of the piracetam solution 20%.

Potentiometric pH determination is performed by measuring the potential difference between two respective electrodes immersed in the test solution. One of the electrodes is sensitive to hydrogen ions (usually a glass electrode). The other one is a reference electrode (for example, a saturated calomel electrode). The measuring device is a voltmeter with an input resistance at least 100 times greater than

the resistance of the electrodes used. All measurements are performed at the same temperature in the range from 20 °C to 25 °C. The device is calibrated using a buffer solution of potassium hydrophthalate (primary standard) and one of the buffer solutions with a different pH value. The readings of the instrument for the third buffer solution with an intermediate pH value should not differ by more than 0.05 pH units from the tabular pH value of the piracetam solution 20%. The electrodes are immersed in a piracetam solution 20% and the pH is measured under the same conditions as for the buffer solutions. All test solutions and standard buffer solutions should be prepared in water free of carbon dioxide.

2.2.3. Quantitative determination of piracetam.

The method of high-performance liquid chromatography (HPLC) was applied for the quantitative determination of piracetam. Chromatography was performed on a liquid chromatograph with an ultraviolet detector under the following conditions. Detection at a wavelength of 205 nm; column Luna C 18 size 250x4.6 mm with a column temperature of 50 °C; mobile phase: dipotassium hydrogen phosphate with a pH of 6.0 ± 0.05 , adjusted by dilute phosphoric acid - acetonitrile (95:5); the speed of the mobile phase is 0.5 ml/min.

2.2.4. Determination of sterilizing suitability of filter material.

Verification the sterilizing ability of the filter was conducted by the method of membrane filtration using a filter device (**Figure 1**). The tests were performed in a clean Class D room in the biosafety box (zone A). Test cultures of *Brevundimonas diminuta* bacteria were used to test the sterilizing ability of the filter. After completion filtration of the test solution of piracetam 20%, the membrane filter was washed in three portions of 100 ml of washing liquid and in its last portion was made a suspension of the test strain of *Brevundimonas diminuta* bacteria.

After filtration, membrane filters were placed in Petri dishes on the surface of the medium soybean

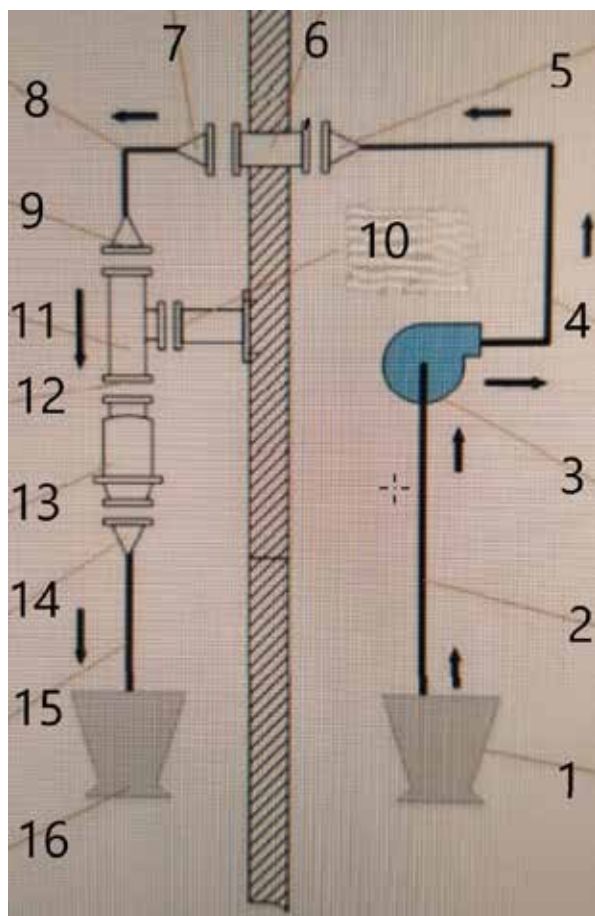


Figure 1. Scheme of the filter device for membrane filtration method:

1 - Container with solution; 2, 4 - Hose №1; 3 - Peristaltic pump; 5, 7, 9, 10, 12, 14 - Terminal connection to the fitting; 6 - Passing port; 8 - Hose №2; 11 - Filter holder; 13 - Filter with housing; 15 - Hose №3; 16 - Container with sterile solution.

agar. Incubate for 3-5 days at the temperature from 30°C to 35°C. For a positive control experiment through membrane filters of 0.45 µm was passed 100 ml of washing liquid (buffer solution with sodium chloride and peptone pH 7.0) with a suspension of test culture of bacteria *Brevundimonas diminuta*. After filtration, membrane filters were placed on the surface of the medium soybean casein agar in Petri dishes. Incubation of the filters was performed simultaneously with the test samples at the tempera-

ture of from 30°C to 35°C for 3-5 days.

Acceptor criterion: - no growth of *Brevundimonas diminuta* in the studied samples; - the presence of growth of *Brevundimonas diminuta* in the positive control.

2.2.5. Gravimetric determination of dry residue after evaporation.

Thermogravimetric analysis was performed on a derivatograph of the system F. Paulik, I. Paulik, L. Efdel with platinum/platinum-rhodium thermocouple when heating the samples in ceramic crucibles from 20 to 300°C in the air.

The heating rate was 5°C per minute. The standard was hardened aluminium oxide, the weight of the samples was 50 mg.

2.2.6. Test for mechanical inclusions by light blocking method.

A suitable device based on light blocking principle, which allows to measure automatically the number and the size of particles were used. The instrument is calibrated using suitable certified reference materials consisting of dispersions of spherical particles of certain sizes - 10 µm and 25 µm. Such standard particles are dispersed in water free of particles, R. Measures should be taken to avoid aggregation of the particles during dispersion. The contents of the sample were mixed by inverting slowly and continuously the container 20 times. If necessary, remove carefully the packaging. The outer surfaces of the opening container were cleaned with a jet of water free of particles, P and opened the container, avoiding any contamination. A suitable procedure was used to remove air bubbles (settling the solution for 2 min or sonication). Because the parenteral drug used is small in volume, less than 25 ml, 10 or more dosage units were combined in a clean container to obtain a volume of at least 25 ml. The number of test samples was taken sufficient to provide a statistically sound estimate. Four samples, not less than 5 ml each, were taken and the number of particles with sizes equal to or greater than 10 µm and 25 µm was

determined. The result obtained for the first sample has been excluded and the average number of particles in the test sample has been calculated.

3. Results and Discussion.

At the first stage of research, the study of the chemical compatibility of the solution and filter materials has been carried out under dynamic conditions (by filtering the solution through selected filter membranes). During studying the chemical compatibility of the solution and filter materials, the quality of the solution has been controlled by the following indicators: transparency, color, pH, quantitative content of the active substance (**Table 1**).

In the second stage, the content of substances extracted into the filtrate has been determined. A sterilizing filter of company «Parker Domnick hunter ltd.», to perform this test of trade mark PROPOR PES (ZDMS090-020-AY) DISC (filtration material: polyester sulfone with a rating of 0.2 μm) was used.

During the test, the solution was conducted to

determine the content of substances extracted into the filtrate. To assess the possible migration of potential products of the filter material to the prepared solution, 2 samples in the amount of 0.5 l each were investigated (the first sample - after contact for 4 hours with the filter; the second sample - control, without contact with the filter).

The samples were analyzed according to the following indicators:

- Gravimetric determination of dry residue after evaporation;
- Comparison of impurities profile of the active substance in the solution;
- Evaluation of the infrared spectra of the dry residue after evaporation;
- Sterilizing suitability of the filter;
- Determination of the filtration efficiency of the injectable solution.

The results obtained in determining the effect of the filter material on the test solution of piracetam 20% are presented in **Table 2** and **Figures 2-5**.

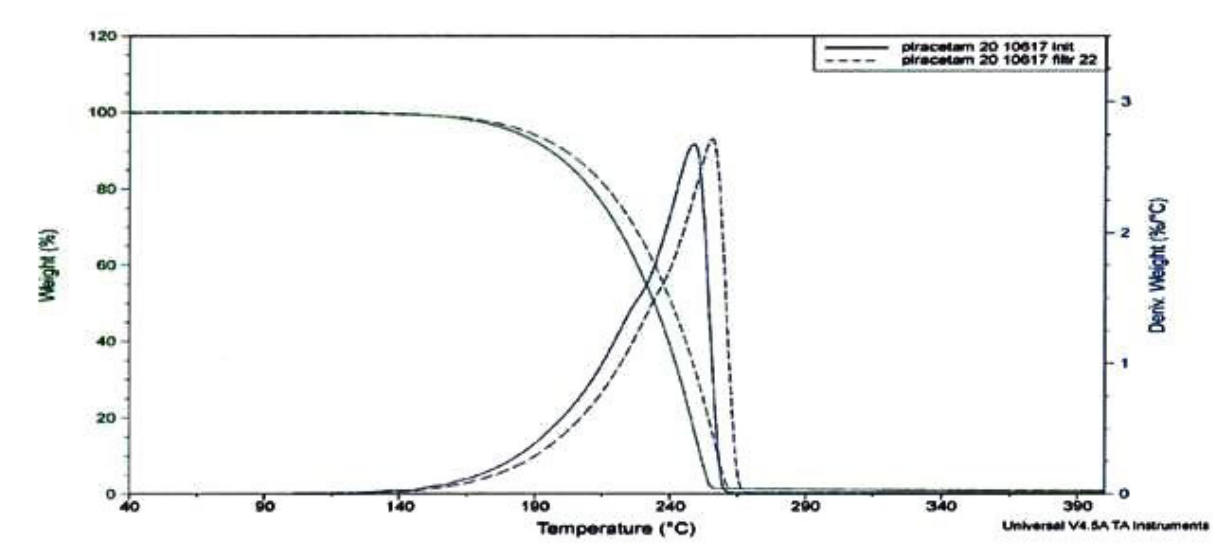
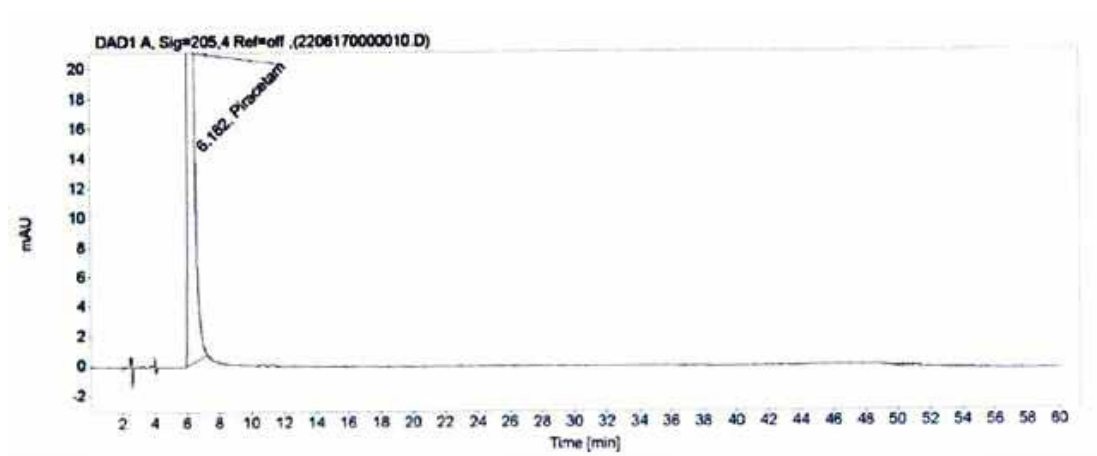
Thus, the conducted research showed that the

Table 1: The effect of filter materials on the quality of the test solution of piracetam 20%

Original	Filter material		
	nylon	polyvinylidene difluoride	polyester sulfon
<i>Transparency (should be transparent)</i>			
not transparent	transparent	transparent	transparent
<i>Chromaticity (not more intense than the standard BY₇)</i>			
corresponds	corresponds	corresponds	corresponds
<i>pH (from 5.0 to 7.0)</i>			
5.96	5.97	5.96	5.96
<i>Quantitative content of piracetam, mg/ml (from 190.0 to 210.0)</i>			
200.3	200.4	200.3	200.3

Table 2: Determination of dry residue of prepared and filtered solution of piracetam 20%

The name of the test	The parameter being evaluated	Acceptability criteria	Result	
Determination of dry residue	The amount of dry residue after evaporation in terms of 1 ml	Minimum difference in the amount (or absence) of dry residue	Dry residue of the solution before filtration 200.2 mg/ml	Dry residue of the solution after filtration 200.1 mg/ml

**Figure 2.** Thermogram of dry residues of the prepared solution of piracetam 20% before and after filtration**Figure 3.** Profile of impurities of piracetam solution 20% before filtration

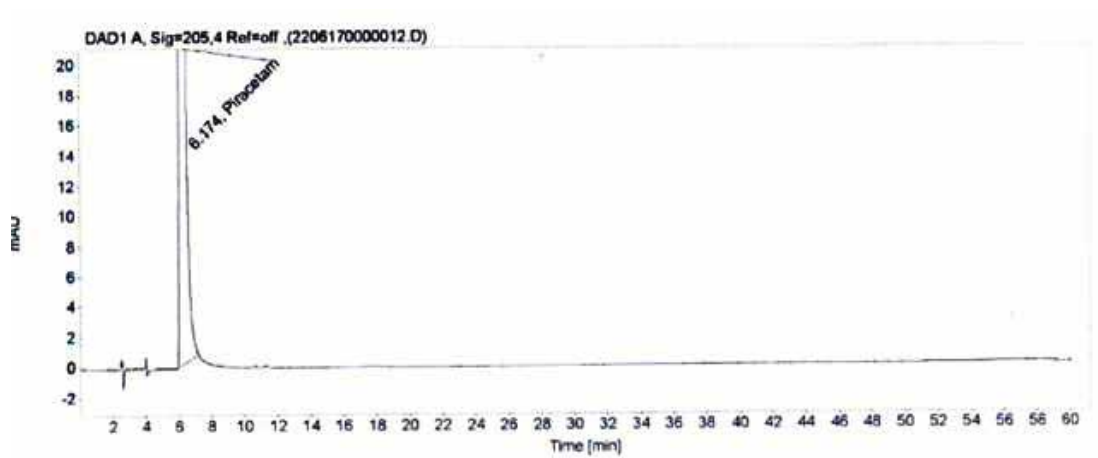


Figure 4. The profile of impurities of piracetam solution 20% after filtration through a filter with a polyester sulfone filter material with a rating of 0.2 μm

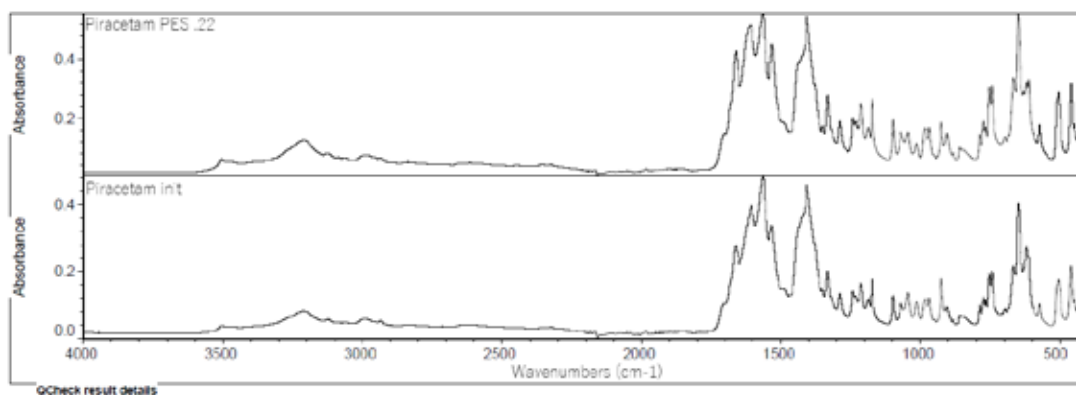


Figure 5. Infrared spectra of dry residues of piracetam solution 20% before (lower spectrum) and after (upper spectrum) filtration

dry residue of the prepared solution before and after filtration is practically unchanged. The profile of impurities of both prepared and filtered solution coincides. The infrared spectra of dry residues before and after filtration are identical. It proves no effect of filter material and no diffusion the filter material substances to the investigated solution under selected filtration conditions.

Determination of the sterilizing suitability of the filter material has been performed using a bacterial test, evaluating whether the sterilizing filter provides sterile filtrate during filtration and after filtration of the entire amount of prepared solution of pi-

racetam 20% under appropriate process conditions (that is, after contact of the filtration membrane with the investigated solution for the time determined by the technology). The testing procedure is based on the results of the viability test. Acceptability criteria of the test is absence of growth test-microorganism *Brevundimonas diminuta* on an analytical filter in the studied samples. The level of bacterial load for the test filter should be below the allowable validated limit ($\times 10^{11}$). It minimizes the potential of non-sterile product and ensures the sterility of the product after filtration. The test results are presented in **Table 3**.

Table 3: Determination of the sterilizing ability of the filter using test microorganisms

Filter Part Number/ Lot Number	Total challenge (CFU)	Challenge per filter area (CFU/cm ²)	Recovery, CFU
Pall PANX047100/ UA6231	3.82x10 ⁹	2.2x10 ⁸	0
Durapore AB05DFL2PH4/ IT6225	3.82x10 ⁹	2.2x10 ⁸	0
PROPOR PES ZCMS1-020C- PS/1406231	3.82x10 ⁹	2.2x10 ⁸	0

Table 4: Determination of invisible particles in a filtered solution of piracetam 20%

Run No.	Particle size (µm)	Cumulative count	Particles per container
Run 1	10.000	203.00	406.00
	25.000	4.00	8.00
Run 2	10.000	143.00	286.00
	25.000	2.00	4.00
Run 3	10.000	229.00	458.00
	25.000	4.00	8.00
Run 4	10.000	161.00	322.00
	25.000	2.00	4.00
Average	10.000	177.67	355.33
		2.67	5.33

*Notes:**Sample volume (mL) : 5**No. of runs : 4**No. of containers : 10**Total pooled volume (mL): 100**Container volume (mL): 10**Dilution factor : 1**Run1 : Discarded*

The filtration efficiency has been determined by the method of light blocking on the device «Liquid particle counting system of company Hiac Royco», USA.

Table 4 shows studies to test the invisible particles of a solution of piracetam 20%, which was filtered through a PES membrane with a rating of 0.2 μm .

It can be seen from table 4 the number of particles in the test sample meets the requirements of State Pharmacopoeia of Ukraine 2.9.19, method 1 at a regulated limit of 6000 in an ampoule for particles with a size of 10 μm or more and not exceeding 600 particles with a size of 25 μm or more. The research has carried out the proofs that the use of the investigated filter material allows to obtain a solution of the required quality.

4. Conclusions

The complex of researches during holding one of pharmaceutical development stages of technological process, namely the stage of filtration for injectable medicines (on the example of injectable solution of piracetam of 20%) has been defined.

Conducted research of mutual influence of filter material with a solution has proven that pH of the solution before and after filtration doesn't change, indicating the compatibility of the solution with a filter. The selected filters correspond to the pH range of the piracetam solution 20%. Determination of the

quantitative content of the active substance of piracetam before and after filtration (within the regulated limits) determined the absence of sorption of the active substance on the filter.

Profile impurities solution before and after filtration are identical. No additional peaks are observed infrared spectra of the dry residue obtained after evaporation of prepared and filtered solutions. It is virtually the same profile that indicates the absence of substances extracted from washed and filter the solution. Control of sterilizing ability of filters by the test to restrain the growth test culture of bacteria *Brevundimonas diminuta* showed no growth of test culture, the level of bacterial load for the studied filters was below the validated limit ($\times 10^{11}$). It minimizes the potential of non-sterile product and ensures sterility after filtration.

The completeness of the research carried out at the phase of pharmaceutical development of the filtration stage will minimize the risks of exposure to the filter material on the solution, identify critical control points at this stage to prevent poor quality products in industrial production. $\square$

Conflict of Interest. The authors declare that they have no conflict of interest.

ORCID iDs *Viacheslav Shevchenko* <https://orcid.org/0000-0003-3078-1744>

Svitlana Rolik-Attia <https://orcid.org/0000-0002-0299-5895>

Yevhen Bezrukavnyi <https://orcid.org/0000-0001-7527-9788>

REFERENCES

1. Bukofzer S., Ayres J., Chavez A. et al. Industry perspective on the medical risk of visible particles in injectable drug products. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 69 (1), 123-39, 2015.
2. Perez M., Maiguy-Foinard A., Barthélémy Ch., Décaudin B., Odou P. Particulate Matter in Injectable Drugs: Evaluation of Risks to Patients. *Pharm. Technol. Hosp. Pharm.* 1 (2), 91-103, 2016.
3. Thomas S., Mahendran S., Selvakumar R. Formulation and evaluation of an injectable solution as a dosage form. *JDDT.* 8(5), 81-87, 2018.
4. Trissel L.A. (2015) Handbook on injectable drugs, 18th ed. *Bethesda: American Society of Health-System Pharmacy*, 1280 p.
5. Langille S. Particulate Matter in Injectable Drug Products. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 67(3), 186-200, 2013.
6. Akers M.J. (2016) Sterile Drug Products: Formulation, Packaging, Manufacturing and Quality. *USA: CRC Press*, 516 p.

7. Bennett A. Pharmaceuticals and fine chemicals: Filtration and separation in the diverse fine chemical sectors. *Filtration+Separation*. 50 (6), 30-33, 2013.
8. Gulyakin I.D., Nikolaeva L.L., Sanarova E.V., Lantsova A.V., Oborotova N.A. Primeneniye membrannykh fil'trov v tekhnologii polucheniya steril'nykh lekarstvennykh form [The use of membrane filters in the technology of obtaining sterile dosage forms]. *Himiko-farmatsevticheskiy zhurnal*. 50 (1), 28-32, 2016 [in Russian].
9. State Pharmacopoeia of Ukraine: in 3 vol. (2015). 2nd ed. *Kharkiv, Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Drug Quality*, vol.1, 1128 p.
10. McKinnon B.T., Avis K.E. Membrane filtration of pharmaceutical solutions. *Amer. J Hosp. Pharm.*, 50 (9), 1921-36, 1993.
11. Langille S.E. Particulate matter in injectable drug products. *PDA J. Pharm. Sci Technol*. 67 (3), 186-200, 2013.
12. Belgaid A., Benaji B., Aadil N. et all. Sterilisation of aseptic drug by sterile filtration: Microbiology validation by microbiology challenge test. *J. Chem. Pharm. Res*. 6 (12), 760-70, 2014.
13. Sumitra A.P., Dhawal Ch., Dileep U., Nagasuri R. Filters and Filtration: A Review of Mechanisms That Impact Cost, Product Quality and Patient Safety. *J. Pharm. Sci. & Res*. 8 (5), 271-8, 2016.
14. Shevchenko V.O., Rolik-Attia S.M., Shpychak O.S., Andryukova L.M., Fetisova O.H. (2020). Metodolohiya rozrobky protsesu fil'tratsiyi in"yektsiynoho likars'koho zasobu na prykladi rozchynu piratsetamu 20% [Methodology for developing the filtration process of injectable medicine on the example of a piracetam solution 20%]. Application of methods of treatment and apipreparations in medical, pharmaceutical and cosmetic practice: materials of the international scientific-practical conference devoted to memory of academician of UAS O.I.Tikhonov (Kharkiv, March 25, 2020). *Kharkiv, NFaU publishing house*, pp. 233-235 [in Ukrainian].
15. Safaraz K. Niazi (2016) Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations: Sterile Products. *USA: CRC Press*, 464 p.
16. Rashed A.M., Hetta A.M., Hashem Z.S., El-Katatny M.H. Validation of moist and dry heat processes used for sterilization and depyrogenation during ampoules manufacturing. *J. Adv. Biomed. & Pharm. Sci*. 3, 177-83, 2020.
17. Meltzer Th.H., Jornitz M.W. The Sterilizing Filter and Its Pore Size Rating. *Am.Pharm.Rev*. 6(3), 44-52, 2003.
18. Tarasov A.V., Tarasova S.A., Andreyev S.V., Rogozhkin Ye.V., Kondrashkov D.O. Validatsiya protsesa sterilizuyushchey fil'tratsii v proizvodstve gotovykh lekarstvennykh sredstv [Validation of the sterilizing filtration process in the production of finished pharmaceutical products]. *Farmatsevticheskiye tekhnologii i upakovka*. 6, 66-67, 2013 [in Russian].
19. Zadbuke N., Shahi S., Gulecha B. et all. Recent trends and future of pharmaceutical packaging technology. *J. Pharm. Bioallied Sci*. 5(2): 98-110, 2013.
20. Costa R.C., Pereira E.D., Silva F.M. et all. Drug micro-carriers based on polymers and their sterilization. *Chem. Chem. Technol*. 12 (4), 473-87, 2018.



ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ - MEETINGS

Η εξάπλωση του δεύτερου κύματος της πανδημίας COVID-19 που δοκιμάζει τις κοινωνίες σε παγκόσμιο επίπεδο έχει στερήσει τις επιστημονικές εταιρείες από τη δυνατότητα να πραγματοποιούν επιστημονικές εκδηλώσεις και συνέδρια, με φυσική παρουσία. Ως εκ τούτου τα συνέδρια που είχαν προγραμματιστεί μέχρι και την άνοιξη του 2021 έχουν αναβληθεί ή θα πραγματοποιηθούν on line εικονικά (virtually). Μένουμε ασφαλείς!

The spread of the second wave of COVID-19 pandemic does not allow scientific activities to take place with physical presence. Thus, all scientific events scheduled till spring 2021 have been cancelled, or will be conducted virtually, while all face-to-face activities have been replaced with online meetings. Stay safe!

• 26 – 27 ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΥ 2021

VIRTUAL MEETING 18TH HELLENIC SYMPOSIUM ON MEDICINAL CHEMISTRY (HSMC-18)

EFMC Sponsored Event

<https://helmedchem2020.gr/>

• MARCH 22-23, 2021 | VIRTUAL EVENT | SYNTHESIS IN DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT

<https://www.maggiarchouseevents.co.uk/bmcs/SDDD.htm>

• APRIL 14-15, 2021 | VIRTUAL EVENT | KINASE 2021: 9TH RSC / SCI SYMPOSIUM ON KINASE INHIBITOR DESIGN

<https://www.rsc.org/events/detail/40755/kinase-2021-9th-rsc-sci-symposium-on-kinase-inhibitor-design>

• MAY 26-28, 2021 | VIRTUAL MEETING

EUROPEAN CHEMICAL BIOLOGY SYMPOSIUM (ECBS2021)

<https://ecbs2021.eu/>

• JUNE 27-JULY 1, 2021 | VIRTUAL MEETING

40TH EDITION OF THE EUROPEAN SCHOOL OF MEDICINAL CHEMISTRY (ESMEC)

<https://eventi.uniurb.it/esmec/>

• 29 AUGUST - 2 SEPTEMBER 2021 - BASEL, SWITZERLAND

XXVI EFMC INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MEDICINAL CHEMISTRY (EFMC-ISM 2021) EFMC SYMPOSIUM

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

• 2-3 SEPTEMBER 2021, BASEL, SWITZERLAND | 8TH EFMC YOUNG MEDICINAL CHEMISTS' SYMPOSIUM

(EFMC-YMCS 2021) EFMC Symposium

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

• 19-23 SEPTEMBER 2021, BARCELONA, SPAIN

23RD EUROPEAN SYMPOSIUM ON QUANTITATIVE STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP (23RD EUROQSAR)

EFMC Sponsored Event

<https://www.euroqsar2020.org/>

• SEPTEMBER 22-24, 2021 | VIRTUAL MEETING | SUMMER SCHOOL IN PHARMACEUTICAL ANALYSIS (SSPA2021)

<http://www.sspaweb.com>

• APRIL 18-20, 2022 TOKYO, JAPAN

INTERNATIONAL MEET ON PHARMACEUTICS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS (PHARMAMEET2022)

<https://www.albedomeetings.com/pharmameet/index.php>