

UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
DOKTORSKE STUDIJE MOLEKULSKE MEDICINE



Jelena Čalasan

**UTICAJ FARMACEUTSKO-TEHNOLOŠKE FORMULACIJE U OBLIKU
MIKROVEZIKULA SA ALGINATOM NA RESORPCIJU GLIKLAZIDA IZ
DIGESTIVNOG TRAKTA PACOVA**

Doktorska disertacija

Mentor: Prof. dr Svetlana Goločorbin-Kon

Novi Sad, 2018.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Jelena Čalasan
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Mentor: Prof. dr Svetlana Goločorbin-Kon
Naslov rada: NR	Uticaj farmaceutsko-tehnološke formulacije u obliku mikrovezikula sa alginatom na resorpciju gliklazida iz digestivnog trakta pacova
Jezik publikacije: JP	srpski / latinica
Jezik izvoda: J	srpski / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2018.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad, Srbija
Fizički opis rada: FO	Broj poglavlja: 8 / stranica: 78 / slika: 11 / grafikona: 19 / tabela: 11 / referenci: 90
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Farmacija, Farmakologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	gliklazid; mikrovezikule; dijabetes melitus; žučne soli i kiseline; hipoglikemijski agensi; holna kiselina; alginati; pacovi
UDK	615.252.033:612.085.1
Čuva se: ČU	Univerzitet u Novom Sadu, Biblioteka Medicinskog fakulteta, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad, Srbija

<p>Važna napomena: VN</p>	
<p>Izvod: IZ</p>	<p>Gliklazid je jedan od najčešće korišćenih lekova u terapiji dijabetes melitusa tip 2. U poslednje vreme, utvrđeno je da gliklazid ispoljava i druge pozitivne farmakološke efekte kao što su imunomodulatorni i anti-koagulacioni efekti, ukazujući na njegovu potencijalnu primenu u terapiji dijabetes melitusa tip 1. Gliklazid se odlikuje varijabilnim stepenom apsorpcije nakon peroralne primene i iz tog razloga pretpostavlja se da bi tehnike njegove ciljane isporuke, kao što je mikroinkapsulacija, mogle da dovedu do poboljšanja njegove apsorpcije i njegove potencijalne primene u terapiji T1DM. Pokazano je da različite žučne kiseline, uključujući i holnu, imaju stabilizacione efekte u domenu primene mikrovezikula i kontrolisanog osobađanja lekova, te je moguće da bi njihov dodatak u mikrovezikularnu formulaciju gliklazida mogao dodatno da poboljša oslobađanje gliklazida, njegovu apsorpciju i antidijabetičke efekte. S tim u vezi, cilj ovog istraživanja je da se ispita hipoglikemijski efekat gliklazida primenjenog u obliku alginatnih mikrovezikula, sa ili bez dodatka holne kiseline na T1DM modelu pacova.</p> <p>Trideset šest pacova obolelih od T1DM indukovano aloksanom i odgovarajuće zdrave kontrolne životinje su nasumično raspoređene u šest grupa (n=6) i tretirane jednokratnom dozom fiziološkog rastvora, suspenzijom gliklazida, gliklazidom u obliku alginatnih mikrovezikula, samo holnom kiselinom, i mikrovezikulama gliklazida sa ili bez dodatka holne kiseline. Uzorkovana je krv tokom 10 h nakon unete doze i merena je koncentracija glukoze u krvi i koncentracija gliklazida u serumu korišćenjem HPLC metode.</p> <p>Mikrovezikule gliklazida su ispoljile hipoglikemijski efekat kod pacova obolelih od dijabetesa, uprkos njegovim smanjenim koncentracijama u serumu, dok je dodatak holne kiseline u mikrovezikularnu formulaciju smanjio hipoglikemijski efekat gliklazida. Ovo potvrđuje izostanak sinergističkog efekta između gliklazida i holne kiseline. Takođe, ni proces mikroinkapsulacije niti dodatak holne kiseline nisu doprineli poboljšanju apsorpcije gliklazida, što ukazuje na činjenicu da su njegovi hipoglikemijski efekti nezavisni od njegove apsorpcije i koncentracije u serumu. Stoga se može pretpostaviti da su hipoglikemijski efekti gliklazida pre pod uticajem crevno-metaboličke</p>

	<p>aktivacije nego ciljanog oslobađanja u digestivnom traktu sistemske apsorpcije. Mikrovezikule gliklazida ispoljavaju hipoglikemijski efekat kod pacova obolelih od T1DM nezavisno od insulina, te mogu imati potencijalnu primenu u terapiji T1DM.</p> <p><i>Ovaj rad su podržali:</i> - <i>HORIZON 2020 MEDLEM projekat broj 690876</i> - <i>Projekat Sekretarijata naučnog i tehnološkog razvoja Vojvodine broj . 114-451-2072-/2016-02</i> - <i>Projekat Ministarstva obrazovanja, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije broja 41012</i></p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	24.09.2015.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prof. dr Velibor Vasović, predsednik komisije 2. Prof. dr Silva Dobrić, član komisije 3. Doc. dr Milica Atanacković Krstonošić, član 4. Doc. dr Saša Vukmirović, član 5. Doc. dr Boris Milijašević, član

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF MEDICINE**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Jelena Čalasan
Mentor: MN	Professor Svetlana Goločorbin-Kon, PhD
Title: TI	The effect of alginate microcapsules pharmaceutical formulation on gliclazide absorption in rat gastrointestinal tract
Language of text: LT	Serbian / Latin
Language of abstract: LA	English / Serbian
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	The Autonomous Province of Vojvodina
Publication year: PY	2018
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	University of Novi Sad, Faculty of Medicine, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad, Serbia
Physical description: PD	number of chapters: 8 / pages:78 / figures: 11 / graphs: 19 / tables: 11 / references: 90
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Pharmacy, Pharmacology
Subject, Key words SKW	Gliclazide; Cell-Derived Microparticles; Diabetes Mellitus; Bile Acids and Salts; Hypoglycemic Agents; Cholic Acid; Alginates; Rats
UC	615.252.033:612.085.1

Holding data	University of Novi Sad, Library of the Faculty of Medicine, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad, Serbia,
Important Note N	
Abstract AB	<p>Gliclazide is one of the most commonly prescribed drugs for the treatment of Type 2 diabetes. Recently, gliclazide has reported to have desirable pharmacological effects such as immunomodulatory and anti-clotting effects, suggesting its potential applications in Type 1 diabetes mellitus (T1D) therapy. Gliclazide has variable absorption after oral administration, and therefore use of targeted-delivery techniques, such as microencapsulation, may optimise gliclazide absorption and its potential applications in T1D. Different bile acids, including cholic acid, have demonstrated microcapsule-stabilising and controlled-release effects, and thus their incorporation into gliclazide microcapsules may further optimise gliclazide release, absorption and antidiabetic effects. Accordingly, this study aimed to investigate the hypoglycaemic effects of gliclazide alginate-based microcapsules, in combination with or without added cholic acid, in a T1D rat model. Thirty six alloxan-induced T1D rats and respective healthy controls were randomly assigned into six equally distributed groups (n=6) and gavaged with a single dose of normal saline solution, gliclazide suspension, gliclazide alginate-based microcapsules, cholic acid alone, combination of gliclazide and cholic acid or alginate-based microcapsules with combined gliclazide and cholic acid. Blood samples were collected over 10 h post-dose and analysed for blood glucose concentrations and gliclazide serum concentrations using HPLC.</p> <p>Gliclazide microcapsules exhibited a hypoglycaemic effect in diabetic rats, despite detected lower serum concentrations, whereas cholic acid incorporation diminished the hypoglycaemic effects. This suggests a lack of synergistic effects between gliclazide and cholic acid. In addition, neither microencapsulation nor cholic acid incorporation optimised gliclazide absorption which suggests that hypoglycaemic effects of</p>

	<p>gliclazide are independent of its absorption and serum concentrations. This provides evidence that hypoglycaemic effects of gliclazide may be associated with gut-metabolic activation rather than gut-targeted delivery and systemic absorption.</p> <p>Conclusion Gliclazide microcapsules exhibited hypoglycaemic effects in T1D rats independent of insulin and thus may have potentials in treatment of T1D.</p> <p><i>This research was supported by:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>HORIZON 2020 MEDLEM project Grant No. 690876,</i> - <i>Project for Scientific and Technological Development of Vojvodina No. 114-451-2072-/2016-02</i> - <i>Project of Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia, Grant No. 41012.</i>
Accepted on Senat Board on: AS	24.09.2015.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<ol style="list-style-type: none"> 1. Full prof. Velibor Vasović, president 2. Full prof. Silva Dobrić, member 3. Assist. prof. Milica Atanacković Krstonošić, member 4. Assist. Prof. Saša Vukmirović, member 5. Assist. prof. Boris Milijašević, member

ZAHVALNICA

Život je čovekov onakav kakvim ga oblikuju njegove misli. – Marko Aurelije

Usudila bih se da dodam, i kakvim ga oblikuju njegovi Mentori.

Ova stranica, verujem, nije dovoljna da iskažem neizmernu zahvalnost na ukazanom poverenju, posvećenom vremenu i bezrezervnoj podršci, svojoj dragoj mentorki, prof. dr Svetlani Goločorbin Kon, koja me je svojim znanjem, idejama i dragocenim savetima usmeravala ne samo tokom rada na doktorskoj disertaciji, već i kroz život, pružajući mi, tokom proteklih 10 godina saradnje primer besprekornog naučno-istraživačkog radnika, saradnika, mentora i, iznad svega, Čoveka. Bez njene iskrene i prijateljske podrške danas ne bih pisala ove stranice.

Prof. dr Momir Mikov je još jedan Mentor koji me je svojim primerom, nesebičnim znanjem i smernicama oblikovao od mojih prvih naučno-istraživačkih koraka, otvorio mi vrata svetske nauke i najzad svojim izuzetnim savetima doprineo kvalitetu ove doktorske teze. Takođe, želela bih da mu se zahvalim i kao rukovodiocu projekta *Interakcije ksenobiotika i uticaj na sisteme u biomedicini, III41012*, Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, u okviru kog je urađena ova doktorska disertacija.

Veliku zahvalnost dugujem i doc. dr Saši Vukmiroviću na izdvojenom vremenu, strpljenju i stručnosti prilikom izvođenja HPLC analize i interpretacije hromatograma. Pored naučnih diskusija, zahvaljujem mu se i na prijateljskoj podršci i humoru koji su učinili zajedničku saradnju lakšom i lepšom. Takođe, zahvaljujem se i doc. dr Borisu Milijaševiću, doc. dr Nebojši Stilinoviću i Slavenu Šuputu na pruženoj podršci tokom organizacije i izvođenja eksperimentalnog dela rada.

Iskrenu zahvalnost dugujem svim članovima Katedre za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu na divnoj saradnji i prijateljskoj podršci tokom protekle decenije. Dragocene uspomene i znanje nosim iz saradnje sa prof. dr Anom Sabo, doc. dr. Vesnom Mijatović, prof. dr Isidorom Samojlik i prof. dr Olgom Horvat.

Želim da se zahvalim i svim osobama koje više nisu uz mene, ali koje su verovala u mene i pružile mi podršku na početku ovog dugog putovanja.

Nikolaj Velimirović je mudro rekao: *Ljubav prema porodici je glavna i osnovna škola ljubavi. Bez te škole ne ide se dalje.* Hvala mojim roditeljima i bratu Ljubomiru na školi безусловne ljubavi, razumevanja i moralne snage zahvaljujući kojoj sam uvek mogla da nastavim dalje...

A tebi, sine Boriša, hvala na zagrljajima, razigranosti i dečjem (ne)strpljenju dok si „čekao da mama opet piše doktorat“. Za tebe je najvažniji zaključak maminog doktorata *da nije obrazovan ko ima škole, nego ko ima obraza!*

Autor

LISTA SKRAĆENICA

ABC – ATP – binding cassette

ASBT – apikalni natrijum-zavisni transporter žučnih kiselina

AUC – površina ispod krive

BCRP – breast cancer resistance proteins

BSEP – pumpa za izbacivanje žučnih soli

CDCA – henodeoksiholna kiselina

C_{max} – maksimalna koncentracija

CMC - kritična micelarna koncentracija

DCA – deoksiholna kiselina

DM – dijabetes melitus

DPP-4 – inhibitori dipeptidil peptidaze 4

EC – etilceluloza

E₀ – efekat neposredno pre tretmana

E_{max} – maksimum efekta

FBP1 – fruktoza 1,6-bis fosfataza

Foxo1 – transkripcioni faktor

FXR – farnezoid X receptor

G6Pase – glukoza-6-fosfataza

GIT – gastrointestinalni trakt

GLP-1 – glikagonu-sličan peptid

GLUT – transporter glukoze

HDL – lipoprotein velike gustine

HNF-4 – nuklearni faktor hepatocita

HPLC – visoko efikasna tečna hromatografija (*High Performance Liquid Chromatography*)

HUGO – Human Genome Organization

IDF – Međunarodna federacija za dijabetes

Ke – konstanta eliminacije

LCA – litoholna kiselina

LDL – lipoprotein male gustine

MCT – monocarboksilat transporter

MODY – adultni oblik dijabetesa kod mladih osoba

MKC – monoketoholna kiselina

MRT – srednje vreme zadržavanja leka u organizmu

NDM – neonatalni dijabetes melitus

NTCP – natrijum-tauroholat zavisnih kotransportera

OATP – organski anjon transportni protein

OCT – organski katjon transporter

OCTN – organski katjon/karnitin transporter

OST - organic solute transporter

PACA – polialkilcijanoakrilat

PEPCK- fosofenolpiruvat karboksikinaza

PEPT – oligopeptidni transporter

PGL – poliglikolid

PLA – polilaktid

PLGA – polilaktid-poliglikolid

PMAT – monoamin transporter plazma membrane

PMMA – polimetakrilat

SGLT2 – inhibitor natrijum/glukoza kotransportera 2

SHP – mali heterodimerni partner (*small heterodimer partner*)

SLC – solute carrier

SUR – receptor za sulfonilureu

$t_{1/2}$ – poluvreme eliminacije

TGR5 – receptor žučnih kiselina

T_{max} – vreme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije

TZD – tiazolidindioni

V_d – volumen distribucije

ZZDOŽ UNS - Zavod za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Univerziteta u Novom Sadu

SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	Transport lekova kroz biološke membrane	1
1.2	Transport lekova kroz gastro-intestinalni trakt	1
1.2.1	Transport lekova kroz crevni zid i značaj za resorpciju lekova	1
1.2.2	Promena propustljivosti crevne barijere kod dijabetes melitusa	3
1.3.	Farmaceutsko-tehnološke formulacije lekova i njihov značaj za resorpciju lekova	4
1.3.1.	Mikrovezikule kao savremene farmaceutko-tehnološke formulacije	5
1.3.2.	Tipovi mikrovezikula	5
1.3.3.	Karakteristike mikrovezikula sa alginatom	7
1.4.	Gliklazid	12
1.4.1.	Fizičko-hemijske karakteristike gliklazida	12
1.4.2.	Mehanizam dejstva gliklazida	13
1.5.	Struktura i sinteza žučnih kiselina	16
1.5.1.	Fizičko-hemijske osobine žučnih kiselina	18
1.5.2.	Uloga žučnih kiselina u fiziologiji	20
1.5.3.	Značaj žučnih kiselina u terapiji dijabetes melitusa (DM)	20
1.6.	Dijabetes melitus	22
1.6.1.	Tipovi dijabetes melitusa	23
1.6.2.	Komplikacije dijabetes melitusa	25
1.6.3.	Morbiditet i mortalitet dijabetes melitusa	26
1.6.4.	Lekovi u terapiji dijabetes melitusa	27
2	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	35
3	HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	35
4	MATERIJAL I METODE	36
4.1	Supstance i reagensi	36
4.2.	Izrada nove farmaceutko-tehnološke formulacije u obliku mikrovezikula	36
4.3.	Plan istraživanja na eksperimentalnim životinjama	37
4.3.1.	Eksperimentalne životinje	37
4.3.2.	Plan ogleđa	38
4.4.	Prikupljanje uzoraka za analizu	39
4.5.	Analiza uzoraka	40
4.5.1.	Analiza glukoze u krvi	40
4.5.2.	Hromatografska metoda za analizu gliklazida	40

4.6. Farmakokinetička analiza	41
4.7. Statistička analiza	41
5 REZULTATI	42
5.1 Farmakokinetika gliklazida kod zdravih životinja	42
5.1.1 Farmakokinetika gliklazida primenjenog u obliku suspenzije	42
5.1.2 Farmakokinetika gliklazida primenjenog u obliku suspenzije sa holnom kiselinom	43
5.1.3 Farmakokinetika gliklazida primenjenog u obliku mikrovezikula	45
5.1.4 Farmakokinetika gliklazida primenjenog u obliku mikrovezikula sa holnom kiselinom	46
5.2 Farmakokinetika gliklazida kod životinja obolelih od dijabetes melitusa	47
5.2.1 Farmakokinetika gliklazida primenjenog u obliku suspenzije	47
5.2.2 Farmakokinetika gliklazida primenjenog u obliku suspenzije sa holnom kiselinom	49
5.2.3 Farmakokinetika gliklazida primenjenog u obliku mikrovezikula	50
5.2.4 Farmakokinetika gliklazida primenjenog u obliku mikrovezikula sa holnom kiselinom	51
5.3 Koncentracija glukoze u krvi	56
5.3.1 Koncentracija glukoze kod netretiranih životinja (kontrola)	56
5.3.2 Koncentracija glukoze posle primene holne kiseline	57
5.3.3 Koncentracija glukoze posle primene gliklazida u obliku suspenzije	58
5.3.4 Koncentracija glukoze posle primene gliklazida u obliku suspenzije sa holnom kiselinom	58
5.3.5 Koncentracija glukoze posle primene gliklazida u obliku mikrovezikula	59
5.3.6 Koncentracija glukoze posle primene gliklazida u obliku mikrovezikula sa holnom kiselinom	60
5.4 Veza koncentracije gliklazida i nivoa glukoze u krvi	65
6 DISKUSIJA	69
7 ZAKLJUČAK	74
8 LITERATURA	75

1 UVOD

1.1 Transport lekova kroz biološke membrane

U najvećem broju slučajeva, lek postiže dejstvo tako što se vezuje za specifične ćelijske receptore koji su uglavnom udaljeni od mesta primene leka, te je važno da se lek transportuje od mesta primene do mesta delovanja, i na tom putu mora proći kroz biološke membrane. Biološke membrane deluju kao selektivno permeabilne barijere i sastoje se od fosfolipidnog dvosloja polarizovanih lipida gde su hidrofiline fosfatne glave usmerene ka vodi na obe strane dvosloja, a hidrofobni repovi ka unutrašnjosti dvosloja, u kome su smešteni integralni i periferni proteini koji se koriste pri komunikaciji i transportu hemikalija i jona.

Sve biološke membrane imaju sličnu strukturnu organizaciju i iste klase hemijskih supstanci. Dve najvažnije barijere u o organizmu su krvno-moždana barijera i crevna/intestinalna barijera.

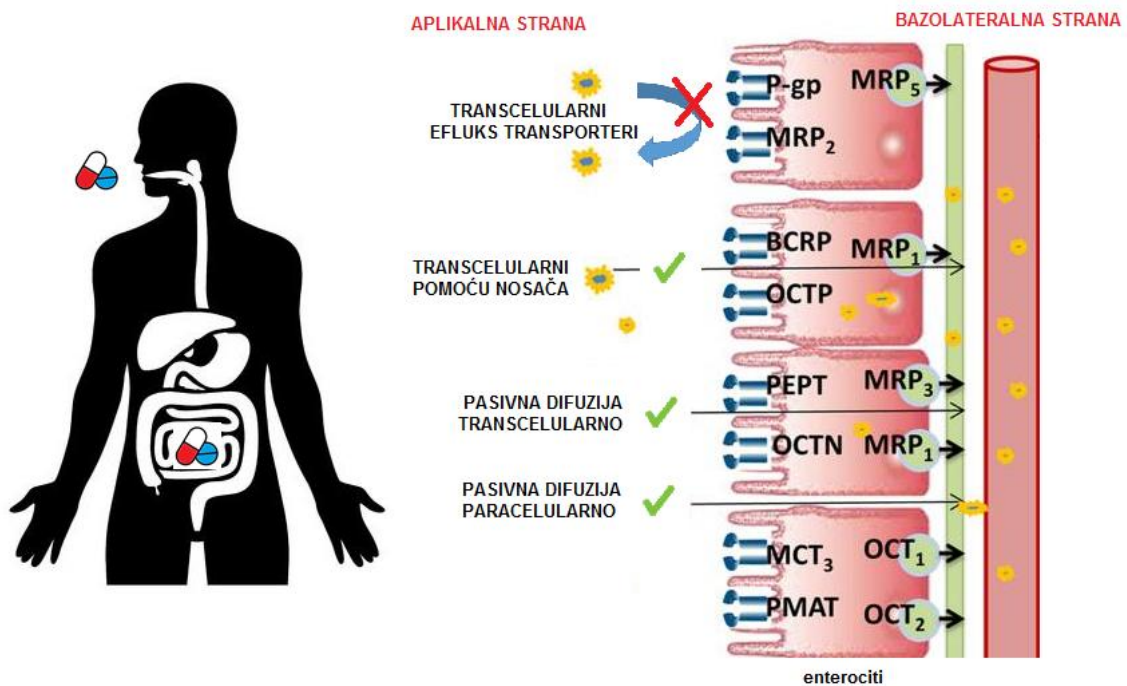
1.2 Transport lekova kroz gastro-intestinalni trakt

1.2.1 Transport lekova kroz crevni zid i značaj za resorpciju lekova

Peroralno uzimanje lekova je najzastupljeniji i najprihvatljiviji način uzimanja lekova zbog brojnih prednosti kao što je mogućnost samostalnog uzimanja i minimalna neugodnost, što poboljšava pridržavanje pacijenata režima uzimanja lekova, te ga čini isplativim i pruža fleksibilnost u pravljenju različitih formulacija. Većina lekova se dobro apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta (GIT). Fizičko-hemijske karakteristike lekova (lipofilnost, rastvorljivost u vodi, prisustvo hidrogenskih veza, veličina molekula itd.), njegova farmaceutska formulacija (tableta, kapsula, rastvor, suspenzija, emulzija, gel itd.)

kao i fiziološke karakteristike crevne sredine (pH vrednost, motilitet creva, aktivnost gastričnih enzima, brzina pražnjenja želuca, tranzitno vreme tankog i debelog creva) su faktori koji utiču na apsorpciju lekova iz GIT-a. (1)

Mali broj lekova se apsorbuje u želucu zbog postojanja mnogobrojnih digestivnih enzima i kisele sredine (pH 1.5–3.5), te se apsorpcija odvija uglavnom u tankom crevu. Crevnu barijeru čine enterociti povezani tesnim vezama koje zapravo predstavljaju sitne dimenzija pore 3–10 Å (slika 1). Lekovi se kroz crevnu barijeru transportuju pasivnom difuzijom transcelularno ili paracelularno ili aktivnim transportom. (2, 3)



Slika 1. Apsorpcija lekova iz gastrointestinalnog trakta (Shekhawat BP & Pokharkar BV, 2017)

Lipofilni molekuli prolaze kroz crevnu barijeru uglavnom transcelularno prolazeći kroz lipidni dvosloj apikalne strane enterocita, kroz citoplazmu i preko bazolateralne membrane u krvotok. Na apikalnoj membrani postoje efluks transporteri koji vraćaju lek nazad u creva i oni koji transportuju lek u citoplazmu, dok su na bazolateralnoj strani smešteni transporteri koji vraćaju lek u citoplazmu ili ga transportuju u krvotok. Prema *Human Genome Organization (HUGO) Gene nomenklaturi*, identifikovano je 229 SLC

(solute carriers) gena i 52 ABC (ATP-binding cassette) gena, te se transporteri mogu podeliti u 2 velike familije: ABC i SLC transporteri.(4) Transporteri koji pripadaju ABC familiji pumpaju molekule nasuprot koncentracijskom gradijentu, dok ih oni iz SLC familije prenose u pravcu koncentracijskog gradijenta. ABC familiji transportera pripadaju P-gp (P-glycoproteins), MRP (multidrug resistance associated proteins i BCRP transporteri (breast cancer resistance proteins), dok u ABC familiju spadaju PEPT (oligopeptide transporter), OCTN (organic cation/carnitine transporter), OCT (organic cation transporter), PMAT (plasma membrane monoamine transporter), OATP (organic anion transporting protein) i MCT (monocarboxylate transporter) transporteri.

Mnogi lekovi se apsorbuju i paracelularnim putem, mada je taj proces daleko sporiji od transcelularnog i zavisi od molekulske veličine leka zbog ograničavajućih dimenzija tesnih veza.

Lekovi resorbovani u tankom crevu i većem delu debelog creva, kada napuste enterocite, ulaze u hepaticku portalnu venu i transportuju se do jetre koja ih dalje metaboliše ili ih nepromenjene ekskretuje u žuč. Stoga, bioraspoloživost lekova, kao mera stepena u kojem terapeutski aktivan oblik leka dospeva u sistemsku cirkulaciju i u kojem je dostupan na mestu dejstva, je određena količinom apsorbovanom iz GIT-a, frakcijom koja se apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta i frakcijom koja prođe metabolizam prvog prolaza.(2)

1.2.2 Promena propustljivosti crevne barijere kod dijabetes melitusa

Istraživanja na eksperimentalnim modelima gojaznosti, dijabetesa i srodnih oboljenja pokazala su da hiperglikemija narušava permeabilnost crevne barijere, kroz GLUT2-zavisno transkripciono reprogramiranje enterocita i promenu integriteta čvrstih i

adherentnih veza, te da oboljenja mogu uticati na farmakokinetiku lekova koji se koriste u njihovoj terapiji. (5, 6)

Dijabetes utiče na metabolizam proteina, lipida i ugljenih hidrata i sistemi koji regulišu ove biohemijske puteve su takođe u mnogim slučajevima uključeni u biotransformaciju lekova, te stoga nije iznenađujuće što dijabetes utiče na farmakokinetiku lekova, i to na jedan od sledećih načina. Dijabetes može uticati na apsorpciju leka zbog promena protoku krvi u potkožnom tkivu ili mišićima ili usled odloženog pražnjenja želuca. Takođe, može uticati i na distribuciju leka, zbog neenzimatske glikacije albumina, kao i na biotransformaciju zbog raznolike regulacije enzima uključenih u biotransformaciju lekova. Konačno, dijabetes može uticati na izlučivanje lekova usled dijabetesne nefropatije. (6)

1.3. Farmaceutsko-tehnološke formulacije lekova i njihov značaj za resorpciju lekova

Savremena medicina, pored rane i tačne dijagnostike poremećaja u organizmu, ima za cilj i uspostavljanje efikasne terapije sa minimalnim neželjenim dejstvima. Farmaceutska tehnologija, kao primenjena interdisciplinarna nauka, se između ostalog bavi proučavanjem tehnologije izrade lekova, odnosno farmaceutskih preparata, uticaja oblika leka i primenjenog tehnološkog postupka na delovanje leka i načinima za unapređenje terapijskih strategija u svrhu povećanja njegove efikasnosti putem postizanja kontrolisanog oslobađanja, produženog vremena cirkulacije, povećanja bioraspoloživosti i smanjenja neželjenih dejstava. (7)

1.3.1. Mikrovezikule kao savremene farmaceutko-tehnološke formulacije

Mikroinkapsulacija je tehnologija koja se decenijama koristi u u poljoprivredi, hemijskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Široku primenu je našla u farmaceutskoj industriji gde se koristi za inkapsulaciju aktivnih komponenti i lekova sa terapeutskim efektom. (8). Mikroinkapsulacija podrazumeva proces potpunog obuhvatanja ćelija, enzima i biološki aktivnih supstanci fizičkim ili hemijskim putem unutar strukturno definisanih nosača i nastanak mikrovezikula – sferičnih čestica veličine 1-1000 μm sa inkapsuliranom aktivnom komponentom koja može biti u čvrstom, tečnom ili gasovitom stanju. (9) Uopšteno, inkapsulacija ima mnogobrojne prednosti koa što su stabilizacija aktivnih komponenti, njihova zaštita od nepovoljnih uticaja spoljašnje sredine bilo tokom proizvodnje, pakovanja, čuvanja ili nakon administracije (npr. pH, kiseonik, svetlost, vlaga).

Takođe, inkapsulacija može da maskira eventualni neprijatan ukus aktivne komponente i omogući njeno ciljano, kontinuirano ili produženo oslobađanje. (9) Usklađivanjem sastava, kao i odgovarajućih uslova proizvodnje savremenih nosača lekova sa fizičko-hemijskim, farmakodinamičkim i farmakokinetičkim osobinama aktivne supstance moguće je modifikovati njeno mesto i/ili vreme oslobađanja radi postizanja optimalne efikasnosti uz smanjenje neželjenih efekata.

1.3.2. Tipovi mikrovezikula

Mikrovezikule se najčešće izrađuju od prirodnih polimera (biomaterijala) poput biodegradabilnih sintetskih polimera (celuloze, agaroze, alginata itd) i modifikovanih prirodnih proizvoda (skrobovi, gume, proteini, masti i voskovi). Među sintetskim polimerima najčešće se koriste polilaktid (PLA), poliglikolid (PGL), polilaktid-poliglikolid (PLGA), etilceluloza (EC), polialkilcijanoakrilat (PACA), polimetakrilat (PMMA), polistiren i drugi. (10, 11)

U literaturi se pored termina mikrovezikule često koriste i termini mikrokapsule, mikrosfere i mikromatriksi i svi se odnose na sisteme nosače sferičnog, ili blago deformisanog sferičnog oblika i mikrometarskih dimenzija, a razlikuju se prema načinu na koji je aktivna komponenta raspoređena u njima, i na osnovu toga se mogu klasifikovati na mikrokapsule i mikrosfere (mikromatrikse).

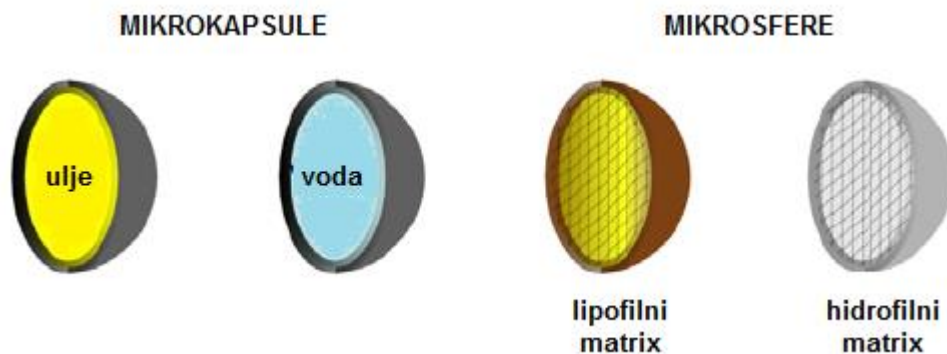
Mikrokapsule (slika 2) se definišu kao mikrovezikule kod kojih je aktivna supstanca smeštena u jezgro okruženo sa jednim ili više slojeva zaštitnog materijala (ljuska, zid mikrokapsule), sačinjenog najčešće od makromolekularne ili polimerne supstance. Aktivna supstanca može biti čista, rastvorena u ulju, ili adsorbovana na čvrstom poroznom materijalu. Zid kapsule je inertan u odnosu na sastojke koji se nalaze u jezgru mikrokapsule. Čvrstina zida treba da bude dovoljna da spreči raspadanje mikrokapsula i oslobađanja njihovog sadržaja tokom procesa proizvodnje, transporta i primene. Izbor materijala za izradu zida mikrokapsula je ključni faktor koji će uticati na mehanizam oslobađanja aktivne komponente. Sadržaj se obično zadržava u kapsuli sve dok se ne oslobodi pucanjem zida kapsule, topljenjem, rastvaranjem ili erozijom. Drugi način oslobađanja aktivnih sastojaka je proces difuzije aktivnih sastojaka kroz zid kapsule. (11, 12) U zavisnosti od morfologije mikrokapsula, one mogu biti mononuklearne (jedno jezgro sa aktivnom komponentom obloženo zidom mikrokapsule) ili polinuklearne (mnogobrojna jezgra obložena zidom mikrokapsule) (slika 2).



Slika 2. Tipovi morfologije mikrokapsula

Mikrosfere se definišu kao matriksne mikročestice, obično sferičnog oblika, kod kojih je aktivna supstanca homogeno ili heterogeno dispergovana u polimernom

materijalu, koji ispunjava čitav volumen kapsule (najčešće sintetski polimeri i kopolimeri glikolne i mlečne kiseline i prirodni polisaharidni polimeri). Aktivna supstanca inkorporirana u mikrosfere se može osloboditi difuzijom kroz matriks nakon njenog rastvaranja, ili nakon erozije/degradacije polimera. Mikrosfere se još nazivaju mikromatriksi i multiježgarne (multinuklearne) mikrokapusule (slika 3). (11)



Slika 3. Mikrokapusule i mikrosfere

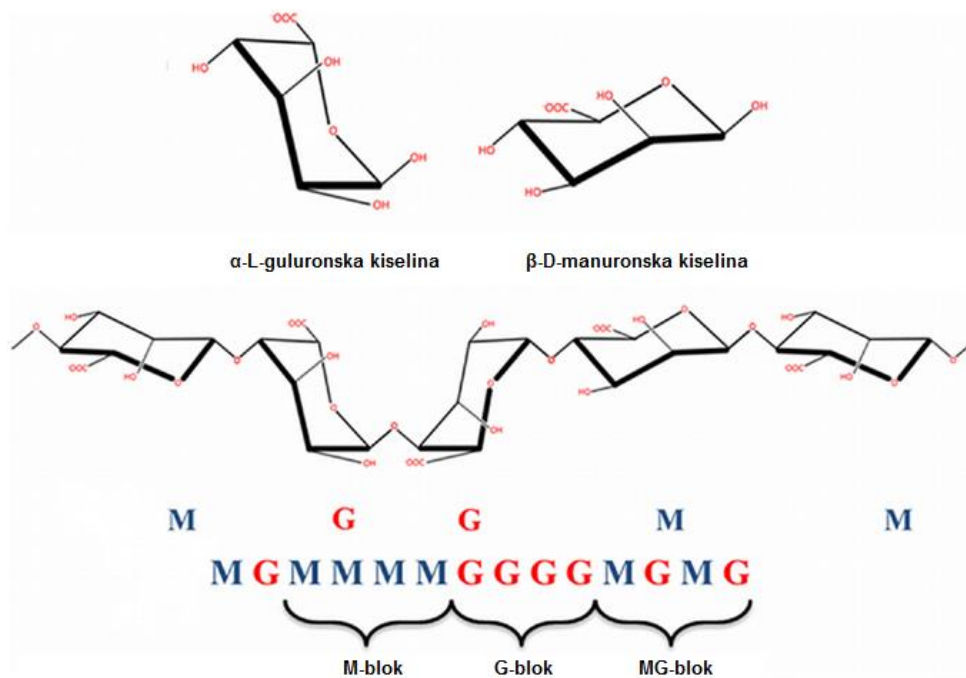
Izbor vrste polimera koja će se koristiti za inkapsulaciju kao i sam postupak inkapsulacije zavisi pre svega od namene mikrovezikula, i u tom smislu neophodno je razmotriti i uskladiti fizičko-hemijske, biofarmaceutske, farmakodinamičke i farmakokinetičke karakteristike aktivne komponente koja se inkapsulira i svojstva polimera koji se koriste za inkapsulaciju. (11)

Prilikom izbora materijala za izradu mikrovezikula, mogu se koristiti prirodni polimerni materijali iz grupe proteina (albumin, želatin, kolagen), ugljenih hidrata (agaroza, hitozani, derivati skroba), lipida i alginata, ili sintetski polimeri, različitog stepena biodegradabilnosti i rastvorljivosti u vodi. (9)

1.3.3. Karakteristike mikrovezikula sa alginatom

Poslednjih godina se prilikom izbora materijala za izradu mikrovezikula kao nosača lekova za peroralnu aplikaciju, posebna pažnja poklanja prirodnim, netoksičnim i biodegradabilnim mukoadhezivnih polimerima, kao što su alginati koji imaju sposobnost da produže kontakt leka sa mukoznom apsorptivnom membranom creva i povećaju njegovu biorasploživost. (13, 14)

Alginati su soli alginske kiseline, koje se dobijaju postupkom ekstrakcije iz smeđih morskih algi familije *Phaeophyceae*. Ovaj linearni polisaharid ((C₆H₈O)_n) se sastoji od manuronskih kiselina (M-blok) i guluronskih kiselina (G-blok) povezanih (1→4) glikozidnim vezama (Slika 4). Glukuronske i manuronske jedinice se mogu povezivati u 3 tri osnovna tipa blokova: homopolimerni G blokovi (GG), homopolimerni M blokovi (MM) i heteropolimerni naizmenično raspoređeni blokovi (MG). (15, 16).



Slika 4. Hemijska struktura alginata (Paredes Juárez GA et al, 2014)

Alginati u vodenom rastvoru sa monovalentnim katjonima obrazuju rastvorljive soli, dok u prisustvu dvovalentnih jona metala (izuzev Mg²⁺) prolaze kroz jonotropsko geliranje obrazujući hidrogelove ili precipitate i ovo svojstvo je omogućilo širu primenu alginata u

oblasti biotehnologije i medicine. Njihov nastanak je uslovljen interakcijama između G-blokova susednih lanaca alginata koji se u prisustvu dvovalentnih jona metala povezuju međusobno, obrazujući spojnice između kojih se nalaze prostori ispunjeni gelirajućim jonima. (15).

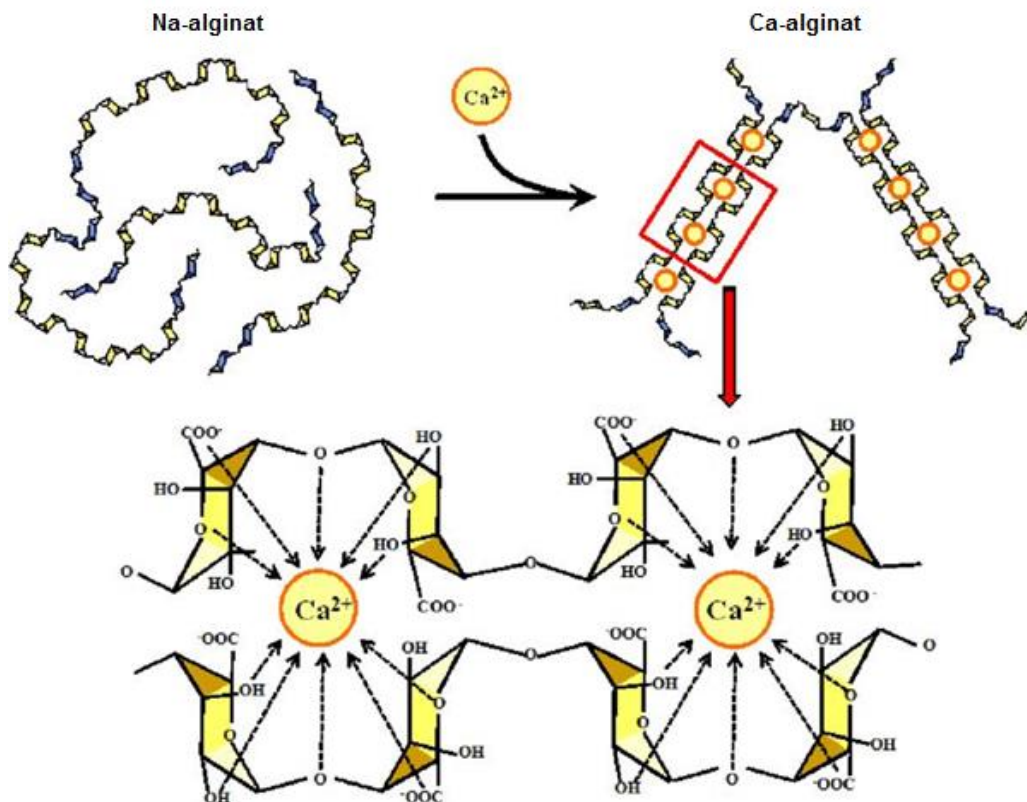
Afinitet gelirajućih katjona ka G-reziduima lanaca alginata znatno veći nego ka M reziduima, te alginati sa većim sadržajem ostataka guluronske kiseline obrazuju jače i postojanije gelove u odnosu na gelove koje obrazuju alginati sa visokim sadržajem manuronske kiseline. Molekulska masa alginske kiseline i alginata, kao i zastupljenost manuronske i guluronske kiseline u njihovoj građi, može da varira, a zavisi od vrste algi iz kojih se dobijaju. (17). Ovo je naročito značajno zbog činjenice da alginati različite strukture formiraju hidrogelove različitih karakteristika, te će i mogućnost njihove primene striktno zavisiti od njihove strukture, odnosno sastava. (18, 19)

Primena alginata u biomedicini i biotehnologiji vezana je za njihovu biokompatibilnost, biodegradabilnost, netoksičnost, mukoadhezivna svojstva i svojstva građenja gelova, bubrenja, povećanja viskoziteta vodenih rastvora, i sve veći značaj ima u razvoju novih preparata sa usporenim oslobađanjem lekovite supstance. Jedna od prednosti primene natrijum-alginata za mikroinkapsulaciju lekovitih supstanci i drugih osetljivih na povišenu temperaturu i hemijske reagense, ogleda se u mogućnosti inkapsulacije na sobnoj temperaturi, bez primene organskih rastvarača i reaktivnih hemijskih reagenasa. (18) Na karakteristike alginatnih gelova prvenstveno utiče struktura alginata iz kojih se dobijaju kao i vrsta i koncentracija jona koji ih obrazuju.

Utvrđeno je da alginati sa visokim sadržajem guluronske kiseline obrazuju rigidnije gelove sa izraženijim retencionim sposobnostima. Pored strukture i koncentracija polaznog rastvora alginata, priroda lekovite supstance, odnosno njegova molekulska masa i naelektrisanje imaju značajan uticaj na osobine Ca-alginatnih mikročestica Odnos

koncentracije lekovite supstance i alginata imaju uticaj na brzinu kojom se inkapsulirana supstanca oslobađa iz mikročestica. (11)

Takođe, koncentracija i vrsta jona u medijumu za geliranje su jedni od parametara koji imaju veliki uticaj na porozitet i stabilnost alginatnih mikrovezikula. Afinitet alginata prema dvovalentnim katjonima opada sledećim redosledom: $Pb^{2+} > Cu^{2+} = Ba^{2+} > Sr^{2+} > Cd^{2+} > Ca^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+}$. Ovi katjoni vezuju kako različite molekule polimera tako i različite delove istog polimernog lanca čime dolazi do formiranja razgranatih struktura nerastvornih u vodi i stvaranja hidrogela. Kalcijum-alginat je jedan od najčešće korišćenih alginatnih hidrogelova. Model „egg-box“ (model kutije za jaja) najbolje opisuje mehanizam formiranja gela po kome se Ca^{2+} najpre vezuje samo za guluronske ostatke u alginatu, dok ne dođe do zasićenja (Slika 5). Pri tome se dva ili više polimernih lanaca međusobno vezuju stvarajući šupljine poput onih u kutiji za jaja u koje se smeštaju joni kalcijuma. (15)



Slika 5. Formiranje alginatnog hidrogela u prisustvu Ca^{2+} jona (Kashima K & Imai M, 2012)

Sa daljim dodavanjem Ca^{2+} , počinju da ih vezuju i manuronski ostaci jonskim interakcijama sa karboksilnim grupama i ove veze su slabije od veza sa GG blokovima.

(16)

Kinetika i stepen bubrenja su takođe važne karakteristike alginatnih mikrovezikula i u slučaju kalcijum-alginatnih hidrogelova zavise od koncentracije i sastava alginata, sadržaja G blokova, koncentracije Ca^{2+} u gelirajućem rastvoru, koncentracije antigelirajućih agenasa i pH vrednosti rastvora u kome se odvija bubrenje. Što je veća koncentracija alginata sa visokim sadržajem G blokova, i uz veće koncentracije Ca^{2+} pri geliranju, formirane strukture će biti čvršće i manje podložne bubrenju. Osušeni hidrogelovi bubre u vodenim rastvorima usled hidratacije polimernih lanaca pri čemu se stepen bubrenja povećava sa povećanjem pH vrednosti. Prisustvo jona natrijuma dovodi do povećanja stepena bubrenja i apsorpcije vode usled izmene jona kalcijuma prvenstveno vezanih za manuronske ostatke pri čemu dolazi do povećavanja elektrostatičkog odbijanja karboksilnih grupa i relaksacije polimernih lanaca. Pri izlaganju kalcijum-alginatnih hidrogelova višim koncentracijama antigelirajućih agenasa ili u dužem vremenskom periodu, nakon bubrenja dolazi do razaranja strukture gela i rastvaranja usled izmene i jona kalcijuma vezanih za guluronske ostatke. (16, 20)

Na karakteristike kalcijum-alginatnih mikrovezikula, utiče i primenjen postupak njihovog dobijanja, i generalno razlikujemo dva načina generisanja alginatnih mikrovezikula: ukapavanje rastvora natrijum-alginata u rastvor koji sadrži kalcijumove jone (ekstruzija/eksterno geliranje) i oslobađanje kalcijumovih jona iz nerastvornih kalcijumovih soli dispergovanih u rastvoru natrijum-alginata (emulgovanje/interno geliranje). (11)

1.4. Gliklazid

Gliklazid je mali, slabo rastvorljiv u vodi, lipofilni oralni hipoglikemik koji pripada drugoj generaciji derivata sulfonilureje i najčešće je prepisivan lek, posle metformina, u lečenju dijabetes melitusa tip 2 (T2DM). (21, 22)

1.4.1. Fizičko-hemijske karakteristike gliklazida

Gliklazid je hidrofobna slaba kiselina koja se pored aromatičnog jezgra i sulfonilureja grupe sastoji još i od azabiciklo-oktanskog prstena po čemu se i razlikuje od ostalih srodnih jedinjenja. (23)

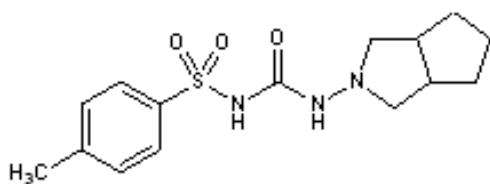
Peroralno aplikovan gliklazid se odlikuje brzom i relativno dobrom apsorpcijom, sa sličnom efikasnošću kod pacijenata obolelih od dijabetesa i zdravih dobrovoljaca. Međutim, utvrđeno je da postoji interindividualna varijabilnost u vremenu dostizanja maksimalnih koncentracija u plazmi (T_{max}), zbog velikih razlika među pojedincima u metabolizmu gliklazida. U proseku, maksimalne koncentracije gliklazida se postižu 3h nakon unete doze. Varijabilnost u apsorpciji gliklazida mogla bi se još objasniti i njegovim ranim rastvaranje u želucu dovodeći do veće varijabilnosti apsorpcije u tankom crevu. Takođe, pokazano je da postoje razlike u odnosu na starosnu dob pacijenata u pogledu njegove maksimalne koncentracije u plazmi, kao i vremena postizanja maksimalne koncentracije. Na primer, peroralna doza gliklazida 40-120 mg rezultira u C_{max} u rasponu od 2.2 do 8.0 mg/mL u roku od 2 do 8 sati. T_{max} i C_{max} se povećavaju nakon ponovljene primene gliklazida, te se ravnotežna koncentracija postiže nakon 2 dana peroralne primene od 40-120 mg leka. Gliklazid ima relativno nizak volumen distribucije (V_d) između 13-24 L. Ima visoki afinitet za proteine plazme (85%-97%).

Gliklazid podleže enterohepatičkoj recirkulaciji u kojoj može učestvovati i do 30% peroralno uzete doze što dodatno doprinosi njegovoj varijabilnoj kinetici. U jetri, gliklazid podleže intenzivnom metabolizmu putem enzima CYP2C9 i CYP19 pri čemu nastaje do sada 8 identifikovanih metabolita. Metaboliti i konjugati se eliminišu primarno putem bubrega (60-70%) i putem fecesa (10-20%). Poluvreme eliminacije ($t_{1/2}$) gliklazida u proseku iznosi 11h, odnosno 8.1-20.5 sati nakon davanja peroralne doze od 40-120 mg. Njegov klirens iz plazme iznosi 0.78 L/h odnosno 13 mL/min. Manje od 5% unete doze se ekskretuje nepromenjeno u urinu. (24)

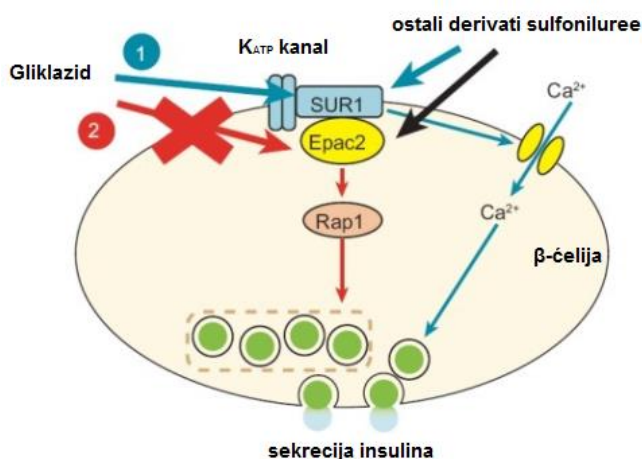
1.4.2. Mehanizam dejstva gliklazida

Gliklazid, derivat sulfonilureje, ispoljava svoje hipoglikemijsko dejstvo, stimulišući oslobađanje insulina tako što se vezuje za receptore na membrani β -ćelija pankreasa – SUR1 (25) (Slika 6).

A)



B)



Slika 6. A) Hemijska struktura gliklazida **B)** Mehanizam delovanja gliklazida (Kalra S. et al, 2015)

Ovi receptori su povezani sa proteinskom jedinicom kalijumovih kanala, te se aktivacijom SUR1 receptora alosterno inhibiraju ATP-senzitivni kalijumovi kanali koji se

zatvaraju. Ovaj efekat se postiže povećanjem ATP/ADP odnosa kao rezultat metabolizma glukoze u β -ćelijama. Kao posledica smanjenja izlaska kalijuma iz ćelije, porast intracelularne koncentracije kalijuma dovodi do depolarizacije membrane, što je okidač za otvaranje voltažno-zavisnih kalcijumovih kanala tip L. Ulaskom kalcijumovih jona u ćelije i povećanjem njegove koncentracije pokreće se proces egzocitoze granula insulina. Važno je napomenuti da se gliklazid, za razliku od ostalih derivata sulfonilureje, ne vezuje za SUR2A receptore prisutne u srčanim ćelijama, što je jedan od razloga njegove neutralnosti u pogledu kardiovaskularnih neželjenih dejstava. Studije su pokazale da je učestalost hipoglikemije i kardiovaskularnih neželjenih efekata kod starije populacije značajno manja kod primene gliklazida i glimepirida u odnosu na ostale derivate sulfonilureje. (26)

Svetska Zdravstvena Organizacija je uvrstila gliklazid u svoju listu esencijanih lekova 2013. godine. (27)

Za razliku od ostalih lekova iz grupe derivata sulfonilureje, gliklazid ispoljava efekte van β -ćelija pankreasa, kao što su antiinflamatorni protektivni ćelijski efekti, koji potencijalno imaju pozitivan uticaj u terapiji T1DM. (28)

Deo ovih ekstrahepatičnih efekata je u vezi sa ATP-senzitivnim kalijumovom kanalima koji su prisutni na različitim tipovima ćelija uključujući glatke, srčane i skeletne ćelije i neurone. Gliklazid stimuliše preuzimanje glukoze od strane mišićnih ćelija nezavisno od efekta insulina i povećava ekspresiju transportera glukoze, smanjuje stvaranje glukoze u jetri odnosno inhibira glukoneogenezu i stimuliše glikolizu. (24) Ovi ekstrahepatički efekti gliklazida mogu biti od velikog značaja u terapiji T1DM, posebno kada se primenjuju u kombinaciji sa drugim hipoglikemicima. (28)

Primena gliklazida i ostalih derivata sulfonilureje je pokazana kao uspešna kod pacijenata obolelih od retke genetski određene forme neonatalnog dijabetes melitusa (NDM) koji se javlja kod dece do njihovih šest meseci starosti (29) kao i kod nosioca

mutacije HNF-1 alfa koja je uzrok smanjene sekrecije insulina u najvećem broju pacijenata sa MODY tipom dijabetesa (*maturity-onset diabetes*) koji se uobičajeno javlja u pubertetu ili ranim dvadesetim godinama. (30)

Istraživanja su pokazala da gliklazid indukuje ekspresiju PDKS1 transkripcionog faktora uključenog u diferencijaciju β -ćelija, Ki67 markera ćelijske proliferacije i regeneracije (31, 32) kao i diferencijaciju, bez proliferacije, adipocita belog i mrkog masnog tkiva putem regulacije EGFP signalinga i inhibišući aktivnost PPAR-c receptora zrelih adipocita. (33) Karakteristike gliklazida da stimuliše diferencijaciju i proliferaciju β -ćelija, kao i da pomaže smanjenje njihove apoptoze, ukazuje na to da bi gliklazid mogao da doprinese održavanju mase β -ćelija. (34)

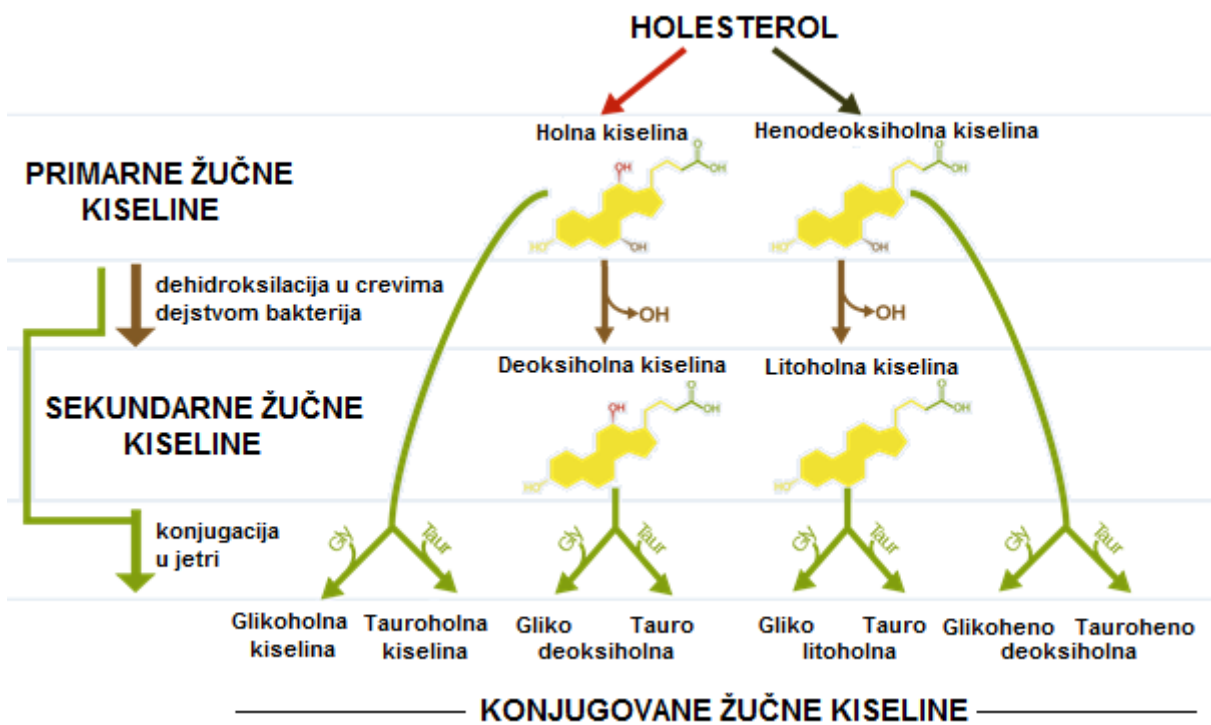
Pacijenti oboleli od dijabetesa su izloženi oksidativnom stresu i povećanom generisanju slobodnih radikala kiseonika, što je u vezi sa razvojem hroničnih komplikacija dijabetesa. (35)

Gliklazid ispoljava značajna antioksidativna svojstva koja su vezana za jedinstveni aminoazabiciklo-oktanski prsten u njegovoj strukturi, nezavisno od njegovog antihiperглиkemijskih efekata i smanjuje reaktivnost trombocita i tako povoljno utiče na hematološka svojstva krvi, što je takođe u vezi sa smanjenjem oksidativnog stresa. (36)

Potencijalna uloga gliklazida u terapiji T1DM dobija sve veću važnost, jer je utvrđeno da može imati blagotvoran efekat naročito u kombinaciji sa žučnim kiselinama i probioticima. (28) Eksperimenti na T1DM modelu pacova, su pokazali da višestruko ciljani terapijski pristup gliklazidom u kombinaciji sa žučnim kiselinama i probioticima kao rezultira u boljoj kontroli glikemije i ublažava komplikacije dijabetesa, nego kada je bilo koji od tretmana primenjen odvojeno. (37, 38)

1.5. Struktura i sinteza žučnih kiselina

Žučne kiseline su po strukturi steroidna jedinjenja koja se kod ljudi sintetišu iz holesterola u jetri i skladište u žučnoj kesi. Sintezom u jetri nastaju primarne žučne kiseline, holna i henodeoksiholna kiselina (39) (Slika 7). One se u gastrointestinalnom traktu, pod dejstvom crevnih bakterija, transformišu u sekundarne žučne kiseline, holna u deoksiholnu i henodeoksiholna u litoholnu kiselinu. Konjugacijom primarnih i sekundarnih žučnih kiselina sa glicinom ili taurinom nastaju konjugati odnosno soli žučnih kiselina. (40)



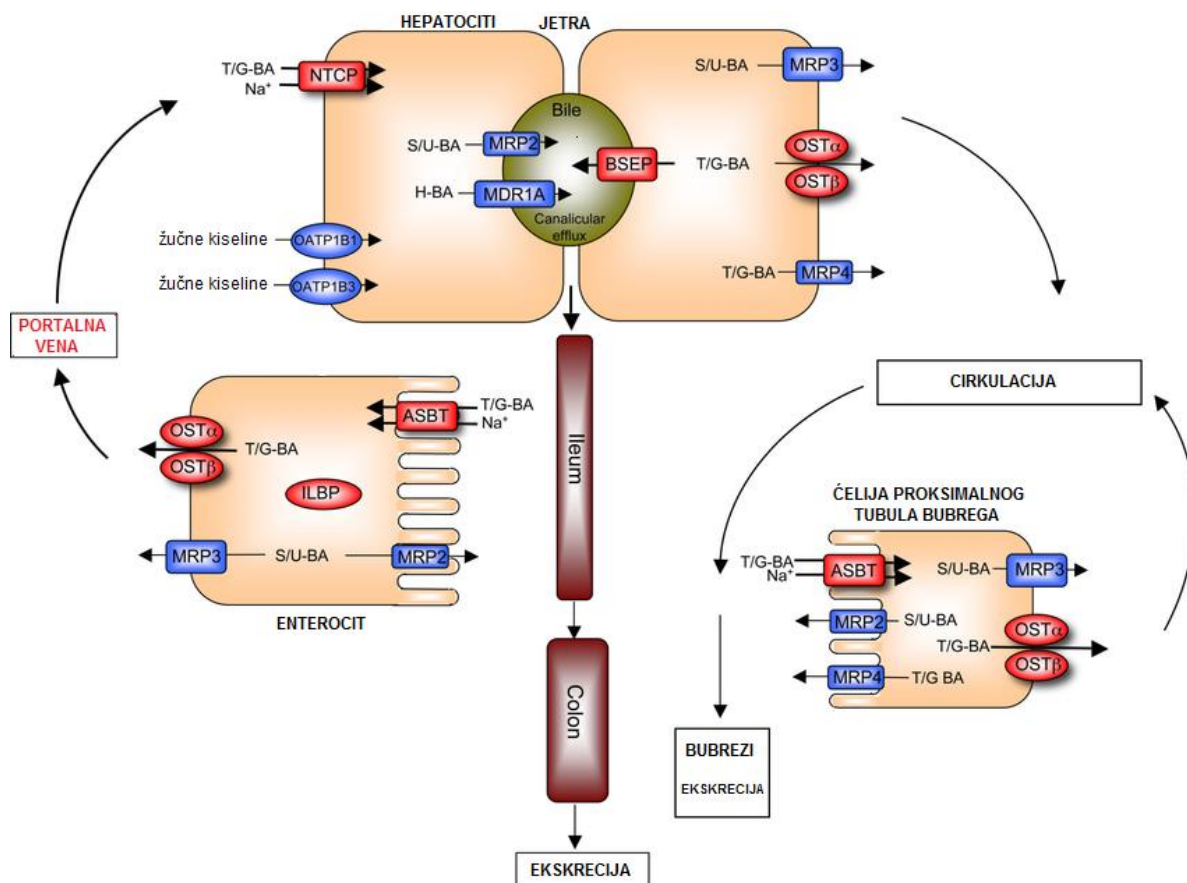
Slika 7. Osnovne primarne i sekundarne žučne kiseline i njihovi derivati (Kuipers F. et al, 2014))

Žučne kiseline podležu procesu enterohepatičke recirkulacije pri čemu se oko 95% ponovo reapsorbuje u cirkulaciju (41) (slika 8). Pre nego što se sekretuju u žuč, žučne kiseline konjuguju sa glicinom ili taurinom. Slobodne, nekonjugovane žučne kiseline mogu da difunduju kroz biomembrane, dok se primarno konjugovane žučne kiseline

transportuju iz hepatocita u lumen žučnih kanalića pomoću pumpi za izbacivanje žučnih soli (bile salt export pump, BSEP) i MRP2 transportera (multidrug resistance-associated protein-2) na apikalnoj strani hepatocita, i odatle dospevaju u creva. U tankom i debelom crevu, bivaju dekonjugovane pod dejstvom enzima crevnih bakterija pri čemu nastaju sekundarne žučne kiseline. U ileumu, veći deo žučnih kiselina se transportuje u enterocite preko natrijum-zavisnih transportera žučnih soli (apical sodium-dependent bile acid transporter, ASBT) na apikalnoj strani enterocita. U enterocitima, žučne kiseline se vezuju za nuklearne farnezoid X receptore (FXR) čija aktivacija rezultuje ekspresijom transportera OST α i OST β (organic solute transporter) na bazolateralnoj strani enterocita preko kojih žučne kiseline napuštaju enterocite i ulaze u portalnu cirkulaciju. (40)

Žučne soli vezane za albumin se iz portalne cirkulacije ponovo transportuju u hepatocite pomoću natrijum-zavisnih kotransportera NTCP (sodium taurocholate cotransporting polypeptide), dok se nekonjugovane žučne kiseline preuzimaju putem natrijum-nezavisnih OATP transportera na bazolateralnoj strani hepatocita. Nakon ponovne hidrosilacije u primarne žučne kiseline u jetri, one se putem BSEP transportera ponovo izlučuju u žučne kanaliće čime se nastavlja novi ciklus enterohepatičke recirkulacije. (40, 42)

Nakon dekonjugacije žučnih kiselina u debelom crevu, iz ljudskog organizma se putem fecesa dnevno izluči do 200-600 mg žučnih kiselina.



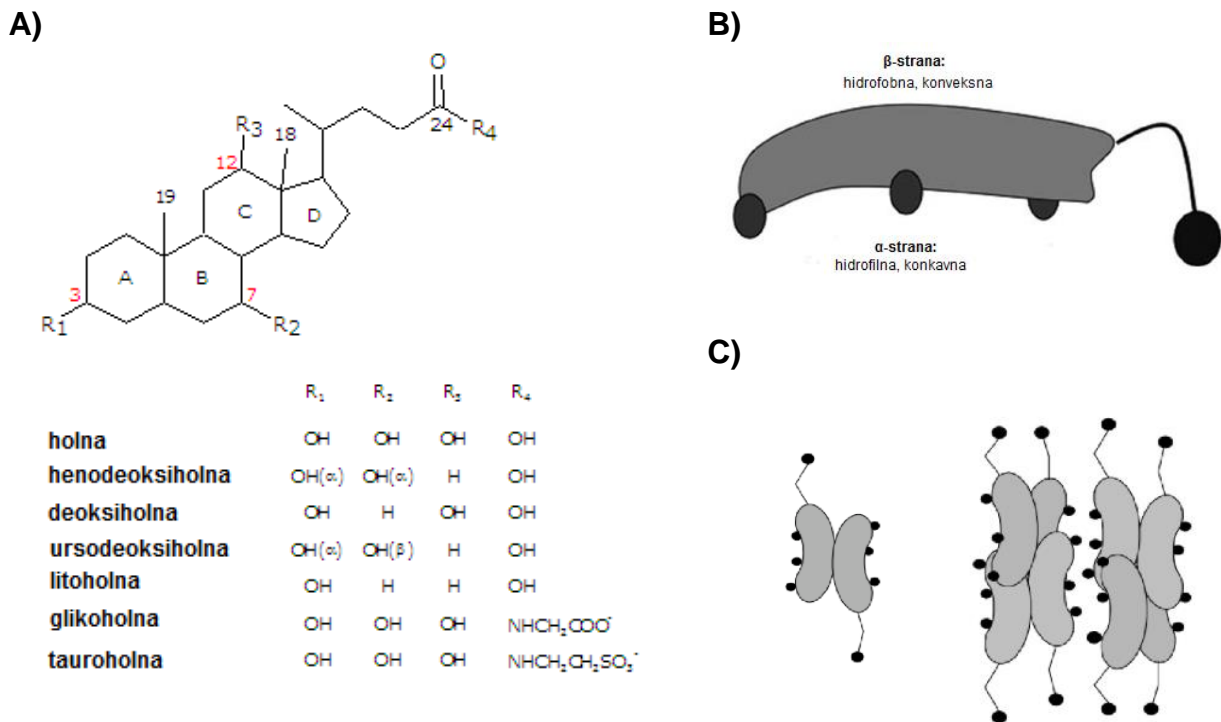
Slika 8. Enterohepatička recirkulacija žučnih kiselina i transporteri uključeni u proces (Dawson PA, 2018)

1.5.1. Fizičko-hemijske osobine žučnih kiselina

Žučne kiseline su amfipatični molekuli sa 24 ugljenikova atoma koji se sastoje iz hidrofobnog steroidnog skeleta sa ciklopentanoperhidrofenantrenskom strukturom za koju je zakačen alifatični bočni lanac koji se završava karboksilnom grupom. Veza A/B prstenova u cis položaju određuje 5 β seriju, dok je 5 α serija definisana trans položajem (slika 9). (40, 43)

Žučne kiseline na položajima C-3, C-7 i C-12 mogu da imaju jednu, dve ili tri hidroksilne grupe uglavnom orijentisane ka α -strani (konkavna), te ona predstavlja hidrofilni deo molekula, zajedno sa bočni lanacem koji se završava karboksilnom grupom.

Metil grupe na C-18 i C-19 položajima su orijentisane ka β -strani (konveksna) koja stoga ima hidrofobne karakteristike.



Slika 9. A) Hemijska struktura žučnih kiselina; **B)** Model amfipatične strukture žučnih kiselina **C)** Primarne i sekundarne micelle (Monte M. et al, 2009)

Žučne kiseline ostavaruju svoju najvažniju fiziološku ulogu u varenju i resorpciji lipida i liposolubilnih vitamina zahvaljujući amfipatičnoj strukturi i sposobnosti samoasocijacije i formiranja micelarnih agregata u vodenom rastvoru, kada se nalaze iznad određenih, kritičnih koncentracija. Raspon koncentracije iznad koje žučne kiseline imaju sposobnost formiranja micela naziva se kritična micelarna koncentracija (critical micelle concentration, CMC). Broj i položaj hidroksilnih grupa žučnih kiselina određuje njihove fizičko-hemijske karakteristike i potencijal emulgovanja i formiranja primarnih (2-10 monomera povezanih hidrofobnim vezama β -strana steroidnih prstenova) i sekundarnih micela (veći broj primarnih micela povezanih vodoničnim vezama hidroksilnih grupa), te svaka pojedinačna žučna kiselina ima karakterističnu CMC.

Veličina i oblik micelarnih agregata, pored same strukture žučnih kiselina, zavisi i od pH vrednosti i temperature rastvora i prisustva katjona. Takođe, pokazano je da konjugacija žučnih kiselina sa glicinom ili taurinom smanjuje CMC, pri čemu su konjugati sa taurinom hidrofilniji od konjugata sa glicinom. Takođe, utvrđeno je da uvođenje keto grupe kod različitih derivata žučnih kiselina rezultira povećanjem njihovih CMC vrednosti, nezavisno od položaja keto grupe, već isključivo od broja keto grupa. (44)

1.5.2. Uloga žučnih kiselina u fiziologiji

Pored najpoznatije uloge žučnih kiselina u apsorpciji lipida, pri čemu vrše solubilizaciju i apsorpciju masnih kiselina, monoglicerida, holesterola i drugih lipidnih molekula iz gastrointestinalnog trakta, one obavljaju i mnoge druge značajne fiziološke funkcije uključujući pre svega regulaciju sopstvene sinteze, povećanje resorpcije kalcijuma, modulaciju sekrecije enzima pankreasa i oslobađanja holecistokina (45), antimikrobijalnu aktivnost za sprečavanje prekomernog razvoja bakterija u tankom crevu (46), modulaciju imunog sistema (47), aktivaciju apoptoze u hepatocitima (48). Ove i mnoge druge uloge, žučne kiseline ostvaruju delujući kao signalni molekuli preko nuklearnih FXR receptora i membranskih TGR5 receptora.

1.5.3. Značaj žučnih kiselina u terapiji dijabetes melitusa (DM)

Mnogobrojne studije su pokazale da su inflamacija i poremećena homeostaza žučnih kiselina usko povezane sa T1DM. Međutim, uzročno-posledične veze između promena u homeostazi žučnih kiselina i metaboličkih poremećaja u dijabetesu još uvek nisu razjašnjene. (49)

S obzirom na karakteristike žučnih kiselina da olakšavaju transport molekula kroz biomembrane ili putem interakcije sa fosfolipidnim dvoslojem povećavajući fluidnost i

permeabilnosti ćelijskih membrana, ili putem regulacije ekspresije transportnih proteina, interes istraživanja pomeren je u pravcu terapijske primene samih žučnih kiselina, ili pak njihove upotreba kao pomoćnih agenasa ili nosača u cilju poboljšavanja farmakokinetičkih i farmakodinamičkih karakteristika lekova.

Potencijalna primena žučnih kiselina u terapiji dijabetesa se može postići kroz dve njihove osnovne primene: kao hipoglikemijskih agenasa ili kao agenasa koji bi poboljšali alternativne načine primene insulina (28). Svoju ulogu u modulaciji metaboličkih puteva glukoze, žučne kiseline ostvaruju, kao što je rečeno, delujući kao ligandi za FXR i TGR5 receptore.

Henodeoksiholna kiselina (CDCA) je najpotentniji endogeni ligand FXR receptora. Sekundarne žučne kiseline, deoksiholna (DCA) i litholna (LCA) takođe, mada u manjoj meri, mogu da aktiviraju FXR, dok je holna kiselina slab FXR agonist, a hidrofilna ursodeoksiholna ne može da aktivira FXR.

FXR receptori su zastupljeni u čitavom organizmu, ali u najvećoj meri u crevima i jetri. Pokazano je da aktivacijom FXR, žučne kiseline smanjuju glukoneogenezu u jetri, lipogenezu, oksidaciju masnih kiselina i insulinsku senzitivnost (28, 50)

Inhibicija glukoneogeneze u jetri putem aktivacije FXR i posledično smanjenje koncentracije glukoze u plazmi je predmet brojnih istraživanja (51). *In vitro* i *in vivo* eksperimenti su pokazali da žučne kiseline inhibišu ekspresiju enzima PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase), FBP1 (fructose 1,6-bis phosphatase) i G6Pase (glucose-6-phosphatase) uključenih u proces glukoneogeneze, putem tzv. transkripcionog proteina SHP (small heterodimer partner) koji gradi heterodimere sa nuklearnim faktorom hepatocita HNF-4 (hepatocyte nuclear factor 4) i transkripcionim faktorom Foxo1 (forkhead transcription factor) na taj način ih supresujući (52). Međutim, regulacija nivoa glukoze u plazmi nije zavisna isključivo od direktne inhibicije glukoneogeneze u jetri, već i drugi mehanizmi mogu biti uključeni. Duran-Sandoval i

saradnici su pokazali da se smanjena ekspresija FXR u različitim eksperimentalnim modelima dijabetičnih pacova može normalizovati nakon administracije insulina i da glukoza stimuliše FXR ekspresiju, dok insulin ima suprotan efekat (53).

S druge strane, aktivacija specifičnog G-protein kuplovanog receptora TGR5 žučnim kiselinama u mrkom masnom tkivu i mišićima dovodi do aktivacije adenilat ciklaze, te povećanja intracelularne koncentracije cAMP koji aktivacijom protein kinaze A rezultira u fosforilaciji i aktivaciji transkripcionih faktora koji učestvuju u regulaciji gena uključenih u sintezu tiroidnog hormona što za posledicu ima ubrzanje bazalnog metabolizma, smanjenje gojaznosti izazvane hranom i poboljšanja insulinske senzitivnosti kod miševa na ishrani sa visokim sadržajem masti (54, 55).

TGR5 je takođe zastupljen na entero-endokrinim L ćelijama tankog i debelog creva. Njihovom aktivacijom žučnim kiselinama dolazi do lučenja peptidnog hormona GLP-1 koji stimuliše proizvodnju i sekreciju insulina u β -ćelijama pankreasa, smanjuje postprandijalnu glikemiju i inhibira lučenje glukagona (56). Pokazano je da su potrebne nanomolarne koncentracije litoholne žučne kiseline i mikromolarne koncentracije holne, deoksiholne i henodeoksiholne žučne kiseline za aktivaciju TGR5 (28)

1.6. Dijabetes melitus

Dijabetes melitus (DM) podrazumeva grupu hroničnih, progresivnih metaboličkih poremećaja koje karakteriše povišen nivo glukoze u krvi, odnosno hiperglikemija čije vrednosti se koriste za dijagnozu dijabetesa: glikemija našte (bar 8 sati od poslednjeg obroka) $\geq 7,0$ mmol/L ili glikemija u bilo kom slučajnom uzorku krvi (bez obzira na obroke) $\geq 11,1$ mmol/L. DM nastaje kao posledica smanjenja ili potpune obustave sekrecije insulina ili rezistencije tkiva na njegovo delovanje, ili usled prisustva oba ova poremećaja (57)

Prevalenca i incidenca ovog oboljenja je u stalnom porastu, što dijabetes čini velikim zdravstvenim problemom savremenog društva. Prema procenama Međunarodne federacija za dijabetes (*International Diabetes Federation – IDF*) u svetu u 2017. godini od dijabetesa boluje 451 milion ljudi (starosti između 18 i 99 godina), i da će se do 2045. godine broj obolelih od dijabetesa povećati na 693 miliona, što predstavlja 9.9% svetske populacije. Najveća stopa incidence utvrđena je u razvijenim zemljama, a predviđa se porast obolelih i u zemljama u razvoju (58).

U Republici Srbiji, prema izveštajima Instituta za javno zdravlje „Dr Milan Jovanović Batut” za 2016. godinu, od dijabetesa boluje 700.000 ljudi što je u skladu sa procenama obolelih na nivou svetske populacije (59)

.

1.6.1. Tipovi dijabetes melitusa

Prema etiološkoj klasifikaciji odnosno patogenetskom mehanizmu nastanka dijabetesa, postoje četiri osnovne kategorije dijabetesa (57):

- Tip 1 DM

Ovaj tipa dijabetesa, ranije nazivan i juvenilni dijabetes, podrazumeva imunološki uzrokovan dijabetes (Tip 1A) i idiopatski dijabetes, i karakteriše ga potpuni nedostatak insulinske sekrecije usled destrukcije β -ćelija pankreasa. Imunološki uzrokovan dijabetes je oblik T1DM kod kojeg je destrukcija β -ćelija posledica aktivacije T- i B-ćelijama posredovanih autoimunih procesa što dovodi do nedostatka sekrecije insulina. Zastupljen je u 5-10% slučajeva od ukupnog broja obolelih od dijabetesa. Obično se javlja kod dece i adolescenata, ali se može javiti i kod odraslih (57). Osim utvrđene genetske predispozicije, autoimuni procesi se mogu pokrenuti i usled različitih faktora spoljašnje sredine kao što su virusi (enterovirusi, kongenitalna rubeola, citomegalovirusi, parvovirusi

B19, rotavirusi), ishrana, toksini, perinatalni faktori i stres (60). Idiopatski T1DM nepoznate etiologije je oblik dijabetesa sa malom zastupljenošću koji se u najvećem broju slučajeva javlja kod ljudi afričkog ili azijskog porekla. Iako je uticaj nasledne komponente veoma izražen u ovom obliku dijabetesa, nema isključivih dokaza o autoimunoj destruktiji β -ćelija i u terapiji je neophodna je nadoknada insulina (57).

- Tip II DM

Kod ovog tipa dijabetesa povećanje koncentracije glukoze u krvi je posledica smanjene sekrecije insulina često udružene sa insulinskom rezistencijom gde su β -ćelije stimulisane da prekomerno sekretuju insulin, ali je ne mogu ostvariti tokom dužeg vremenskog perioda te dolazi do pada nivoa cirkulišućeg insulina i smanjene apsorpcije glukoze. T2DM prethodno nazivan insulin-nezavisnim dijabetes melitusom ili adultnim dijabetesom je rasprostranjeniji od T1DM sa 90-95% od ukupnog broja obolelih od dijabetesa. Iako je u određenom broju slučajeva uticaj genetske predispozicije u nastanku T2DM evidentan, uloga faktora spoljašnje sredine (ishrana, stres, manjak fizičke aktivnosti, pušenje, alkohol, lekovi) na razvoj bolesti je značajnija. Pre svega, gojaznost, kao vodeći faktor rizika, dovodi do insulinske rezistencije, a samim tim do T2DM. Takođe, utvrđen je porast prevalencije ovog oblika dijabetesa kod mlađe populacije, najverovatnije kao posledica loših životnih navika uključujući manjak fizičke aktivnosti, neadekvatnu ishranu (57). S obzirom da su povećan nivo triglicerida, povišen nivo LDL, a smanjen HDL holesterola prateći poremećaji T2DM, terapija podrazumeva regulaciju i kontrolu poremećaja glikoregulacije, poremećaja metabolizma lipoproteina i povišenog arterijskog pritiska, i to istovremenom primenom nemedikamentne terapije (ishrana, fizička aktivnost) i oralnih antidijabetika. Međutim, u daljem progresivnom toku bolesti često je neophodna i primena insulina (61).

- Gestacijski dijabetes

Ovaj tip dijabetesa podrazumeva bilo koji stepen insulinske rezistencije koji se javlja za vreme trudnoće. Međutim, s obzirom da je gojaznost glavni faktor rizika za T2DM, trudnice sa nedijagnostikovanim T2DM predstavljaju odstupanje od ove definicije. Iz tog razloga, žene sa faktorima rizika za T2DM, kod kojih je prema standardizovanim dijagnostičkim kriterijumima u prvom trimestru utvrđen T2DM bi zapravo trebalo svrstati u grupu obolelih sa T2DM, dok se one dijagnostikovane u drugom ili trećem trimestru mogu smatrati gestacijskim tipom dijabetesa. Kontrola glikemije se u ovim slučajevima održava ishranom i fizičkom aktivnošću ili u krajnjem slučaju insulinom, dok je primena oralnih antidijabetika kontraindikovana. Nakon porođaja, kod većine žena se uspostavlja euglikemija, mada je rizik od javljanja dijabetesa nakon trudnoće povećan (57).

- Drugi specifični tipovi dijabetesa

U ovu grupu ređih formi dijabetesa spadaju specifični tipovi DM koji se javljaju kao posledica drugih oboljenja (bolesti egzokrinog pankreasa, endokrinopatije itd.), retkih genetskih mutacija u funkciji β -ćelija pankreasa koje se nasleđuju dominantno-recesivno (MODY dijabetes, neonatalni dijabetes), genetski uslovljenih poremećaja u funkciji insulinskih receptora, infekcija, lekova ili hemikalija.

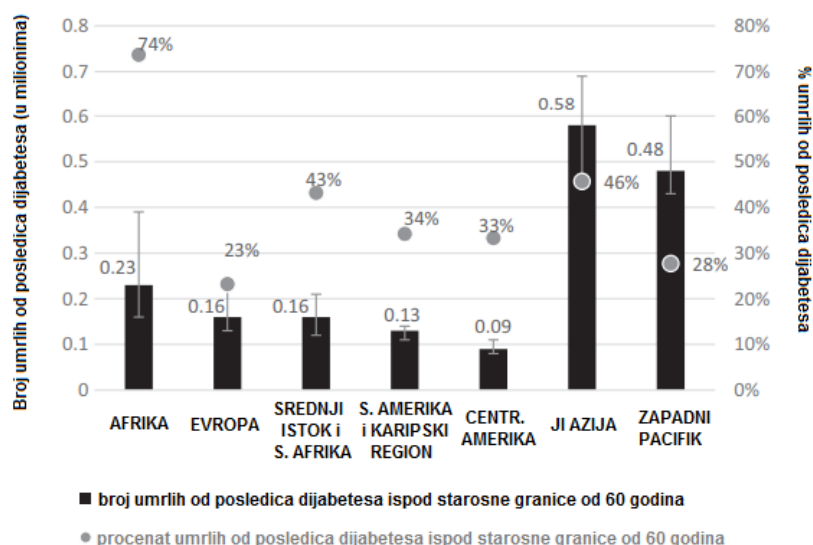
1.6.2. Komplikacije dijabetes melitusa

Uprkos različitoj etiologiji kod prethodno navedenih oblika dijabetesa, komplikacije koje se javljaju tokom trajanja bolesti su slične. Akutne komplikacije dijabetesa koje nastaju odjednom i obično su reverzibilne, podrazumevaju dijabetesnu ketoacidozu, dijabetesno neketogeno hiperosmolalno stanje, laktatna acidoza i hipoglikemija (62).

Hronične komplikacije koje se razvijaju nakon dužeg trajanja bolesti i nekontrolisane hiperglikemije posledica su promena na krvnim sudovima i one mogu biti mikrovaskularne (dijabetesne retinopatije, dijabetesne nefropatije i dijabetesne neuropatije) i makrovaskularne prirode (koronarna bolest srca, cerebrovaskularna i periferna vaskularna bolest). Ovi mikrovaskularni i makrovaskularni poremećaji su odgovorni za preko 80% morbiditeta i mortaliteta u dijabetesu (63).

1.6.3. Morbiditet i mortalitet dijabetes melitusa

Prema procenama Međunarodne federacija za dijabetes (*International Diabetes Federation – IDF*) 5 miliona ljudi starosti između 20 i 99 godina je umrlo usled posledica dijabetesa u 2017 godini, što čini 9.9% svih uzroka smrti u ovoj starosnoj grupi. Više od jedne trećine umrlih pripada grupi radno sposobnih ljudi ispod 60 godina, što pored medicinskih implikacija, ima i velike socijalno-ekonomske posledice. Najveći procenat smrti usled komplikacija dijabetesa je zabeležen u Africi, dok je najveći ukupan broj umrlih od posledica dijabetesa zabeležen u zapadno-pacifičkom regionu, a najmanji u Južnoj i Centralnoj Americi (Grafikon 1).



Grafikon 1. Mortalitet DM po geografskim regijama u svetu (Cho N. et al, 2018)

Kao što je već napomenuto, povećanje stope invaliditeta i mortaliteta je uslovljeno porastom hroničnih komplikacija dijabetesa, odnosno mikrovaskularnim i makrovaskularnim poremećajima, dok su savremena znanja o patogenezi i terapiji dijabetesa, i posebno prevenciji akutnih komplikacija doveli do značajnog smanjenja ukupne smrtnosti, pa je tako na primer smrtnost na globalnom nivou usled dijabetesne ketoacidoze manja od 1%.

Velike prospektivne studije *The Diabetes Control and Complications Trial* – DCCT (63) i *The United Kingdom Prospective Diabetes Study* – UKPDS (64) sprovedene prethodnih par decenija pokazale su da se, nezavisno od oblika DM, striktnom i intenzivnom kontrolom glikemije može odložiti nastanak, kao i usporiti progresija hroničnih komplikacija dijabetesa. DCCT studija je utvrdila da je intenzivna terapija kod pacijenata obolelih od T1DM, sa ciljem da se dostigne što sličniji nivo koncentracije glukoze u krvi kao kod zdrave populacije, rezultirala u smanjenju rizika od razvijanja mikrovaskularnih komplikacija za 35–76% u poređenju sa konvencionalnom terapijom. Takođe, UKPDS studija je pokazala da intenzivna kontrola glikemije kod T2DM pacijenata metforminom i lekovima iz grupe derivata sulfonilureje ima dugotrajne efekte na smanjenje rizika od infarkta miokarda (za 15%) i ukupnog broja smrtnih slučajeva (za 13%) u odnosu na konvencionalni pristup korekcijom ishrane. Iz navedenih razloga, pored prevencije i blagovremene dijagnoze hroničnih komplikacija DM, najkritičniji segment razvoja i ishoda bolesti je optimiziranje terapije prema svakom individualnom pacijentu i ostvarenje dobre glikoregulacije.

1.6.4. Lekovi u terapiji dijabetes melitusa

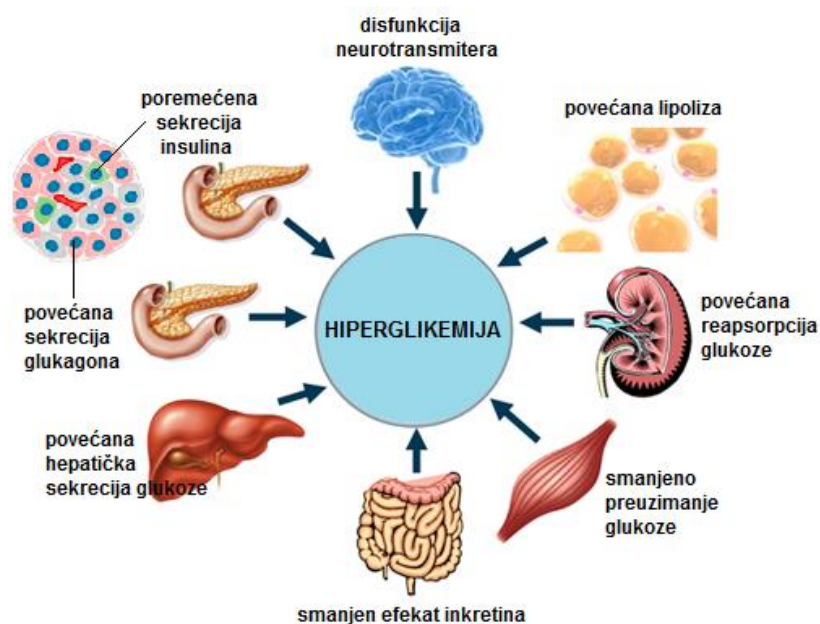
Lekovi koji se koriste u terapiji dijabetesa (antidijabetici) pomažu, pored pravilne ishrane, u snižavanju povećanog nivoa glukoze u krvi kod pacijenata obolelih od DM.

Kod osoba sa T1DM primarni cilj terapije jeste stroga kontrola glikemije primenom insulinske terapije, dok je kod obolelih od T2DM pored nemedikamentne terapije (ishrana, fizička aktivnost) preporučena primena oralni antidijabetika, polazeći od monoterapije, preko kombinacije oralnih antidijabetika pa do konačne administracije insulina kako bolest progresivno napreduje (65).

Prema mehanizmima delovanja, antidijabetici se klasifikuju u jednu od sledećih grupa:

- direktni insulinomimetici: aktiviraju insulinske receptore
- indirektni insulinomimetici: povećavaju sekreciju insulina ili povećavaju senzitivnost na insulin
- lekovi koji deluju na metabolizam glukoze

Trenutno je na tržištu dostupno 7 osnovnih klasa antidijabetika: derivati sulfonilureje, meglitinidi, bigvanidini, tiazolidindioni (TZD), inhibitori dipeptidil peptidaze 4 (DPP-4), inhibitori natrijum/glukoza kotransportera (sodium-glucose cotransporter, SGLT2), GLP-1 analozi i inhibitori α -glukozidaze, koji deluju na jedan ili više mehanizama (Slika 10) uključenih u patofiziologiju DM (66).



Slika 10. Mehanizmi patofiziologije DM (Chaudhury A. et al, 2017)

1.6.4.1. Insulin

Insulin je prirodni hormon polipeptidne strukture koji proizvode β -ćelije Langerhansovih ostrvaca pankreasa. Izgrađen je dva peptidna lanca, A i B, međusobno povezanih disulfidnim vezama i sastoje se od 21 i 30 aminokiselina.

Insulin nastaje proteolitičkim cepanjem prekursorskog preproinsulina u endoplazmatičnom retikulumu, odakle se transportuje do Golđžija gde se odvija dalja razradnja i nastanak proinsulina. Finalno proteolitičko procesovanje i odvajanje C-fragmenta proinsulina se odvija u sekretornim granulama β -ćelija, gde se insulin deponuje u vidu cinkom stabilizovanih heksamera

Koncentracija glukoze u krvi je osnovni, ali ne i jedini, faktor koji kontroliše sintezu i sekreciju insulina, mehanizmom povratne sprege pri čemu povećana količina glukoze u krvi izaziva pojačano lučenje insulina, koji smanjuje količinu glukoze i obrnuto. Sekrecija insulina je bifazična, pri čemu se u inicijalnoj brznoj fazi neposredno nakon porasta koncentracije glukoze u krvi sekretuje deponovani insulin, praćen naglim padom sekrecije. Zatim sledi sporija odnosno odložena faza u kojoj dolazi do nove sinteze i postepenog oslobađanja insulina do dostizanja platoa.

Povećana koncentracija glukoze u krvi i njen ulazak u β -ćelije putem transmembranskih transportera GLUT2, te se kroz proces glikolize povećava intracelularna koncentracija ATP-a što ima za posledicu zatvaranje ATP-zavisnih kalijumovih kanala, depolarizaciju membrane i time izazvano otvaranje voltažno-zavisnih kalcijumovih kanala L tipa. Ulaskom jona kalcijuma u ćelije, stimuliše se sekrecija insulina iz sekretornih granula (67).

Pored glukoze, postoje brojni hormoni i neurotransmiteri koji stimulišu sekreciju insulina uključujući insulinotropne gastrointestinalne hormone GLP-1, gastrin, sekretin,

holecistokin, parasimpatički nervni sistem putem oslobađanja acetilholina, zatim lekove koji deluju na receptore sulfonilureje (SUR).

Insulinska terapija je glavni vid uspostavljanja kontrole glikemije kod osoba obolelih od T1DM, ali se primenjuje i kod T2DM pacijenata kod kojih nije postignuta odgovarajuća kontrola glikemije ishranom i/ili oralnim antidijabeticima, kod gestacijskog dijabetesa i kod pacijenata nakon pankreatektomije. Kontrola glikemije se postiže primenom odgovarajućeg broja dnevnih doza brzo-, srednje- ili sporo-delujućih analoga insulina ili putem kontinuirane supkutane insulinske infuzije uz pomoć spoljne portabilne insulinske pumpe.

1.6.4.2. Bigvanidini

Bigvanidini predstavljaju klasu lekova originalno izolovanih iz biljke *Galega officinalis*, sa jedinim predstavnikom metforminom. Krajem pedesetih godina prošlog veka bila su dostupna tri preparata bigvanidina: metformin, buformin i fenformin, ali su poslednja dva povučeni iz upotrebe 1970. godine zbog neželjenih efekata mlečne acidoze.

Metformin predstavlja disupstituisani bigvanidin koji je pri fiziološkim uslovima izrazito hidrofilan i pozitivno naelektrisan. Nakon peroralno unete doze tablete metformina sa trenutnim oslobađanjem, 70% doze se resorbuje iz tankog creva, pre nego što se preostalih 20-30% ne ekskretuje putem fecesa. Nakon unete doze, maksimalne koncentracije metformina u plazmi se postižu u proseku za 2.5 sati.

Mehanizam dejstva metformina se ostvaruje na jedan od tri načina: smanjenjem produkcije glukoze u jetri inhibicijom glukoneogeneze i glikogenolize; povećanjem senzitivnosti na insulin u mišićima, poboljšavajući periferno preuzimanje i potrošnju glukoze; usporavanjem resorpcije glukoze u crevima. Metformin takođe stimuliše

intracelularnu sintezu glikogena preko glikogen sintaze i povećava kapacitet transporta svih tipova GLUT transportera glukoze (68).

Metformin je indikovano u terapiji T2DM, naročito kod gojaznih pacijenata i onih kod kojih se adekvatna kontrola glikemije ne može postići samo ishranom i fizičkom aktivnošću. Može se primenjivati kao monoterapija ili u kombinaciji sa drugim oralnim antidijabeticima ili insulinom (65).

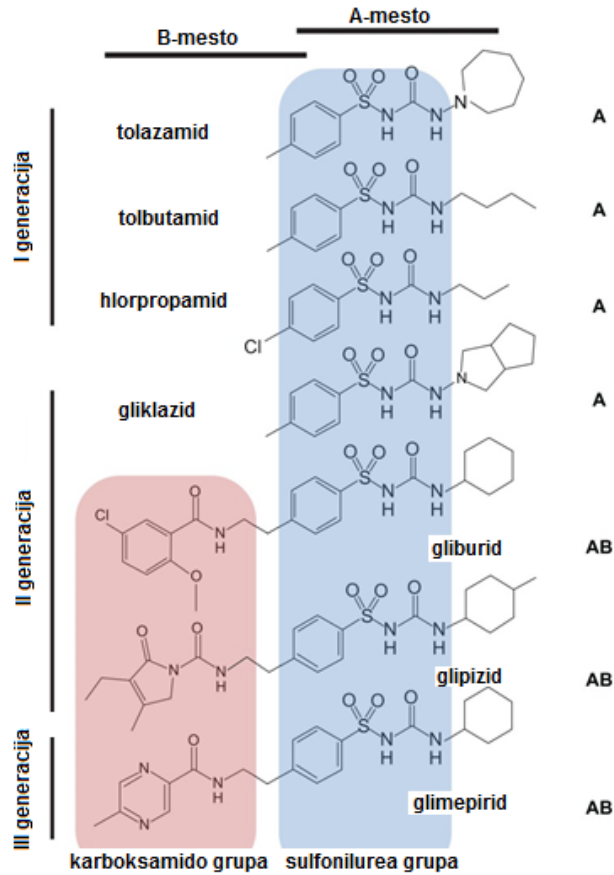
1.6.4.3. Derivati sulfonilureje

Derivati sulfonilureje su pored insulina i bigvanidina najbolje proučeni i najšire korišćeni antidijabetici (69).

Ova klasa lekova u svojoj hemjskoj osnovi poseduje strukturu S-fenilsulfonilureje sa supstitucijom u p-položaju na fenil grupi i različitim supstitucijama na N-grupi ureje. Na osnovu njihovog istorijskog otkrića, lekovi unutar ove klase se mogu razvrstati na derivate sulfonilureje I generacije, II generacije i III generacije (slika 11). U poređenju sa I generacijom derivata sulfonilureje, II i III generacija se danas učestalije primenjuju u terapiji T2DM, jer je pokazano da su potentnijeg dejstva, dužeg delovanja i manjeg broja neželjenih dejstava.

Derivati sulfonilureje ne povećavaju sintezu proinsulina već primarno deluju tako što pospešuju fazu sekrecije insulina, stimulišući njegovo oslobađanje vezivanjem za SUR1 receptore na β -ćelijama pankreasa. Posledica aktivacije ovih receptora dovodi do zatvaranja ATP-senzitivnih kalijumovih kanala, posledičnog porasta intracelularne koncentracije kalijuma, depolarizacije koja rezultira otvaranjem voltažno-zavisnih kalcijumovih kanala i konačno sekrecije insulina iz sekretornih granula β -ćelija. Postoje dva vezujuća mesta za sulfonilureje na ATP-senzitivnim kalijumovim kanalima: A-mesto koje ima afinitet ka vezivanju grupe sulfonilureje, i B-mesto koje vezuje karboksamido

grupu derivata sulfonilureje. Stoga, derivati sulfonilureje se mogu podeliti na A-predstavnik i AB-predstavnik(Slika 11), u zavisnosti od toga za koje mesto se na ATP-senzitivnim kalijumovim kanalima vezuju (23).



Slika 11. Hemijska struktura derivata sulfonilureje (Lang V & Light PE, 2010)

Skorašnja meta-analiza zasnovana na derivatima sulfonilureje je zaključila da su gliklazid i glimepirid povezani sa smanjenim rizikom sveukupne smrtnosti, ali i smrtnih ishoda usled kardiovaskularnih komplikacija dijabetesom u poređenju sa glibenklamidom (70).

1.6.4.4. Noviji lekovi u terapiji dijabetes melitusa

Uspostavljanje optimalne i striktno kontrole glikemije sa minimalnim neželjenim dejstvima po zdravlje i kvalitet života obolelih od DM je osnova uspešne terapije i dan danas predstavlja izazov i za zdravstveni sistem i za pacijente. Stoga, skorašnja naučna saznanja eksploatišu novo-ustanovljene molekularne mehanizme za razvoj što efikasnijih, za pacijente komfornijih i bezbednijih terapijskih opcija.

Dve nove klase antidijabetika koji modulišu lučenje različitih gastrointestinalnih hormona (inkretina), pre svega GLP-1 koji je poznato da različitim mehanizmima stimuliše sekreciju insulina i inhibiše sekreciju glukagona, su se našle na tržištu u poslednjih 10 godina: mimetici inkretina odnosno agonisti GLP-1 receptora (eksenatid, liksisenatid, liraglutid, albiglutid i dulaglutid) i inhibitori DPP-4, enzima odgovornog za degradaciju GLP-1 čime produžavaju poluživot endogenog GLP-1 (alogliptin, linagliptin, sitagliptin, saksagliptin i vildagliptin). Primena navedenih novijih antidijabetika, pored poboljšanja kontrole glikemije, rezultiraju u značajnom gubitku telesne mase i niskom riziku od hipoglikemije.

Takođe, terapijski pristup smanjenja koncentracije glukoze zasnovan na inhibiciji SGLT2 transportera i posledičnog smanjenja reapsorpcije glukoze u bubrezima je sada prisutan na tržištu. SGLT2 inhibitori (empagliflozin, canagliflozin i dapagliflozin) ispoljavaju svoje dejstvo nezavisno od insulina. Pokazano je da njihova primena ne samo da poboljšava kontrolu glikemije već i značajno utiče na gubitak telesne mase, ima manji rizik od hipoglikemije i normalizuje krvni pritisak (71).

S obzirom na činjenicu da oboleli od T2DM imaju dvostruko veći rizik od kardiovaskularnih oboljenja u odnosu na zdravu populaciju i koje predstavljaju uzrok smrti u 60% pacijenata sa DM, kliničke studije u poslednjoj deceniji, pri ispitivanju efikasnosti i bezbednosti novih

antidijabetika, imaju cilj da daju procenu rizika od smrtnosti usled kardiovaskularnih komplikacija, infarkta miokarda, šloga i hospitalizacije usled srčane insuficijencije (72). Višestruke studije na SGLT2 inhibitorima su potvrdile da je smrtnost zbog kardiovaskularnih bolesti kod T2DM osoba pod terapijom SGLT2 inhibitorima bila manja, mada rizik za nastanak infarkta miokarda ili šloga nije bio smanjen, ali je bio značajno smanjen broj hospitalizacija usled srčane insuficijencije (71, 73).

2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Na osnovu pregleda aktuelnih saznanja i relevantnih stavova u literaturi u području istraživanja, definisani su sledeći ciljevi istraživanja:

1. Ispitivanje stepena i brzine resorpcije gliklazida aplikovanog u vidu nove fomulacije u obliku mikrovezikula sa alginatom iz digestivnog trakta zdravih i pacova sa dijabetesom.
2. Ispitivanje uticaja holne kiseline, prirodne žučne kiseline, na dejstvo gliklazida u regulaciji koncentracije glukoze u krvi kod zdravih i pacova sa dijabetesom.
3. Ispitivanje uticaja holne kiseline na efikasnost gliklazida primenjenog peroralnim putem ili u obliku mikrovezikula sa alginatom, u regulaciji koncentracije glukoze u krvi kod pacova sa dijabetesom.

3 HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Na osnovu prethodno definisanih ciljeva postavljene su sledeće hipoteze istraživanja:

1. Primena nove fomulacije gliklazida u obliku mikrovezikula sa alginatom značajno povećava stepen njegove resorpcije iz digestivnog trakta zdravih i pacova obolelih od dijabetesa soja Wistar.
2. Dodatak holne kiseline povećava efikasnost gliklazida u regulaciji koncentracije glukoze u krvi kod pacova soja Wistar obolelih od dijabetesa.
3. Dodatak holne kiseline značajno povećava efikasnost gliklazida u regulaciji koncentracije glukoze u krvi kod pacova soja Wistar obolelih od dijabetesa kada je lek aplikovan u obliku mikrovezikula sa alginatom u odnosu na peroralnu primenu.

4 MATERIJAL I METODE

4.1 Supstance i reagensi

U eksperimentu su korišćene sledeće hemikalije:

Naziv hemikalije	Proizvođač
gliklazid (99.9%)	Sigma Chemical Co, USA
aloksan (98%)	Sigma Chemical Co, USA
natrijum-alginat (98%)	Sigma Chemical Co, USA
holna kiselina	Sigma Chemical Co, USA
kalcijum-hlorid, anhidrovani	Scharlab S.L, Australia
gel	Australian Medical Association, Perth WA, Australia
acetonitril, HPLC čistoće	Fisher Chemical, Australia
metanol, HPLC čistoće	Fisher Chemical, Australia

Radni rastvori gliklazida (40 mg/mL) i holne kiseline (4 mg/mL) su pripremani rastvaranjem praška navedenih supstanci u 10%-nom gelu mešanjem na 25°C, najduže 24h pre eksperimenta i do eksperimenta čuvani u frižideru na +5°C. Pre tretiranja životinja, rastvori su ostavljeni da se ugreju na sobnoj temperaturi. Alokсан je rastvaran u fiziološkim rastvoru neposredno pre aplikacije eksperimentalnim životinjama.

4.2. Izrada nove farmaceutko-tehnološke formulacije u obliku mikrovezikula

Mikrovezikule gliklazida sa alginatom (u kombinaciji sa holnom kiselinom ili bez nje) su pripremljene kao što je prethodno opisano upotrebom *Buchi-390* sistema za mikroinkapsulaciju (74). Ukratko, rastvor polimera koji sadrži natrijum-alginat i gliklazid, sa ili bez holne kiseline, pripremljen je u finalnoj koncentraciji gliklazid: holna kiselina: natrijum-alginat u odnosu, redom 1:3:30. Mikrovezikule su zatim pokupljene iz sistema za mikroinkapsulaciju i sušene upotrebom stabilizacionih komora. Sve mikrovezikule

(nenapunjene, napunjene gliklazidom, napunjene gliklazidom i holnom kiselinom) su pripremane na isti način. Nakon što je zabeležena masa dobijenih partikula nakon procesa sušenja, % sadržaja gliklazida, kao i prinos produkcije mikrokapsula, efikasnost mikroinkapsulacije, zeta potencijali i srednja vrednost veličine partikule su računane i upoređene.

4.3. Plan istraživanja na eksperimentalnim životinjama

U okviru ispitivanja uticaja nove farmaceutsko – tehnološke formulacije u obliku mikrovezikula sa alginatom na resorpciju gliklazida iz digestivnog trakta pacova, i utvrđivanja da li navedena primena gliklazida, uz dodatak holne kiseline, ima prednosti u odnosu na peroralnu primenu ovog antidijabetika, u smislu povećanja njegove efikasnosti u regulaciji koncentracije glukoze u krvi, eksperimentalne životinje su bile podeljene u dve osnovne grupe: zdrave i obolele od dijabetesa, a u okviru svake od njih još šest podgrupa kojima je aplikovana različita formulacija gliklazida.

4.3.1. Eksperimentalne životinje

Korišćeni su zdravi i od dijabetesa oboleli beli laboratorijski pacovi soja *Wistar*, muškog pola, telesne mase 200–300 grama iz okota sa Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Laboratorijske životinje su tokom eksperimenta boravile u standardnim laboratorijskim uslovima za čuvanje laboratorijskih životinja na Zavodu za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju, Medicinskog fakulteta u Novom Sadu. Temperatura vazduha u prilagođenim ormarima za čuvanje eksperimentalnih životinja je održavana između 20-25 °C, uz kontrolu vlažnosti vazduha i sa ciklusom svetlost-tama od po 12 sati.

Eksperimentalne životinje su imale slobodan pristup vodi i hrani, kojoj im je bio onemogućen pristup 6 sati pre merenja glikemije.

Dijabetes melitus tip 1 (DM1) je kod eksperimentalnih životinja izazivan primenom aloksana rastvorenog u fiziološkom rastvoru (100 mg/kg) intraperitonealno u dozi od 100 mg/kg. Grupe životinja kojima je aloksan jednokratno aplikovan su imale trajnije povišenje glukoze u krvi, što će nam je služilo kao model insulin zavisnog dijabetesa, jer je aloksan supstanca koja selektivno oštećuje beta ćelije pankreasa (75).

Nakon 72 sata od primene aloksana, tretiranim pacovima uzorkovana je krv iz repne vene radi određivanja koncentracije glukoze u krvi i potvrde dijabetesa. Pacovi su smatrani obolelim od dijabetesa ukoliko im je koncentracija glukoze u krvi bila veća od 20 mmol/L.

Briga o životinjama i eksperimentalni zahvati su sprovedeni u skladu sa etičkim načelima rada sa laboratorijskim životinjama. Izvođenje eksperimenata na oglednim životinjama je odobreno od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Univerziteta u Novom Sadu– ZZDOŽ UNS (broj odobrenja 01-31/4-1/2014-01).

4.3.2. Plan ogleđa

Ispitivane životinje, zdrave i sa dijabetesom, su nasumično podeljene na eksperimentalne i kontrolne grupe, pri čemu je svaka grupa brojala po 6 životinja (Tabela 1). Sve životinje su bile podvrgnute merenju telesne mase, kao i glikemije neposredno pre početka ogleđa.

Tabela 1. Grupe eksperimentalnih životinja

Grupa	Tretman	Zdravi pacovi (N)	Pacovi oboleli od dijabetesa (N)	Ukupano pacova
Podgrupa				
1	Fiziološki rastvor <i>p.o. (1 ml/kg)</i>	6	6	12
2	Holna kiselina rastvor <i>p.o. (4 mg/kg)</i>	6	6	12
3	Gliklazid suspenzija <i>p.o. (40 mg/kg)</i>	6	6	12
4	Gliklazid suspenzija <i>p.o. (40) mg/kg +</i> holna kiselina <i>p.o. (4 mg/kg)</i>	6	6	12
5	Alginatne mikrovezikule gliklazida p.o.	6	6	12
6	Alginatne mikrovezikule gliklazida sa holnom kiselinom p.o.	6	6	12
Ukupano broj životinja korišćenih u ogledu				72

4.4. Prikupljanje uzoraka za analizu

Nakon peroralne aplikacije određene formulacije gliklazida i/ili holne kiseline, uzorkovana je krv (do 150 µl) u propisno obeležene mikroeprevete iz repne vene pacova u sledećim vremenskim intervalima: 0, 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480 i 600 minuta. Ukupno je uzeto 13 uzoraka krvi iz repne vene po pojedinačnoj eksperimentalnoj životinji radi merenja koncentracije gliklazida. Uzorci krvi su zatim centrifugirani (10 000 obr/min, 5 min) i supernatant je potom pipetiran u čistu mikroeprevetu. Uzorci seruma su čuvani na -20°C do određivanja koncentracija. U istim vremenskim intervalima je uzorkovana kapilarna krv, takođe uzete iz repne vene pacova radi merenja koncentracija glukoze.

4.5. Analiza uzoraka

Koncentracije gliklazida u serumu u prethodno navedenim vremenskim intervalima su određivane korišćenjem visoko efikasne tečne hromatografije (HPLC, *High Performance Liquide Chromatography*; Dionex) sa *DAD* detektorom prema prethodno etabliranoj metodi (76).

4.5.1. Analiza glukoze u krvi

Koncentracija glukoze u kapilarnoj krvi uzorkovanoj iz repne vene eksperimentalnih životinja, merena je upotrebom komercijalnih kitova na aparatu Accu-chek Active (Roche Bazel, Švajcarska).

4.5.2. Hromatografska metoda za analizu gliklazida

Uzorci su za analizu pripremani precipitacijom sa acetonitrilom (odnos 2:1=ACN:serum), nakon čega je mešavina stavljena na vorteks (30 sekundi). U sledećem koraku pripreme mešavina je centrifugirana u trajanju od 5 minuta (10000 rpm/min). Supernatant (10 μ L) je injektovan u HPLC sistem.

Za HPLC analizu je korišćena kolona ODS Hypersil (Agilent, 100mm x2.1 mm, 5 μ m, 120 Å) sa odgovarajućom ODS pretkolonom (Agilent; 20mm x 2.1 mm, 5 μ m). Mobilna faza se sastojala od mešavine acetonitrila i vode u odnosu 49:51%, v/v, (pH vode je podešen na 2.7 sirćetnom kiselinom). Protok je iznosio 0.4 ml/min. Analiza je vršena na 25 °C na talasnoj dužini od 229 nm. Limit detekcije (LOD) iznosio je 0.4 μ g/mL, a limit

kvantifikacije (LOQ) 0,8 $\mu\text{g/mL}$; recovery je iznosio $85.83 \pm 4.02\%$, linearnost je bila 0,8 $\mu\text{g/mL}$ - 500 $\mu\text{g/mL}$.

4.6. Farmakokinetička analiza

Farmakokinetički parametri za gliklazid su izračunati iz podataka koncentracija-vreme korišćenjem programa WinNonLin (version 5.0.1., SCI software, Pharsight Corporation, Garz, NC, USA).(72)

4.7. Statistička analiza

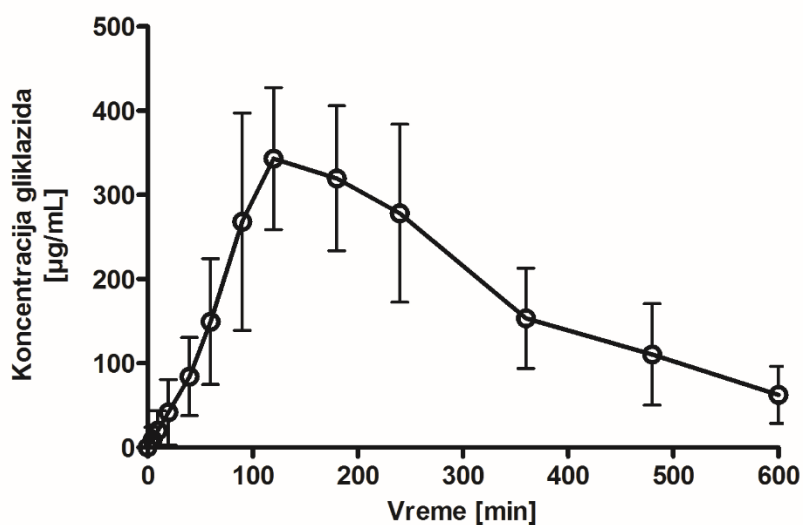
Statistička obrada rezultata vršena je statističkim programom GraphPad Prism version 5 (GraphPad Software, Inc., USA). Rezultati su predstavljeni tabelarno i grafički. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (sr.vred. \pm SD). Statistička značajnost razlika između određenih grupa je ispitivana Student t-testom za zavisne uzorke, ili analizom varijanse sa jednim promenljivim faktorom (jednosmerna ANOVA za istovremeno poređenje više uzoraka), i potom odgovarajućim *post hoc* testom (Tukey ili Kruskal–Wallis). Statističke hipoteze su testirane na nivou statističke značajnosti (alfa nivo) od 0,05.

5 REZULTATI

5.1 Farmakokinetika gliklazida kod zdravih životinja

5.1.1 Farmakokinetika gliklazida primenjenog u obliku suspenzije

Koncentracije gliklazida u serumu nakon njegove peroralne aplikacije u obliku suspenzije (40 mg/kg) kod zdravih životinja u navedenim vremenskim intervalima su prikazane na Grafikonu 2.



Grafikon 2. Kriva koncentracije gliklazida u serumu-vreme nakon p.o. davanja gliklazida (40 mg/kg) zdravim životinjama. Podaci su prikazani kao sr. vrednost \pm SD (n=6).

Pregled farmakokinetičkih parametara gliklazida primenjenog u obliku suspenzije kod zdravih eksperimentalnih životinja je dat u Tabeli 2.

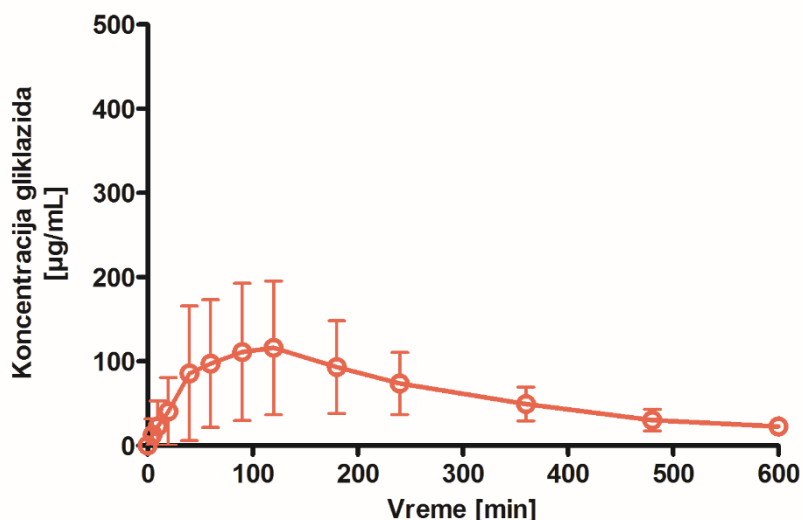
Tabela 2. Farmakokinetički parametri gliklazida nakon peroralne aplikacije gliklazida (40 mg/kg) zdravim životinjama.

Farmakokinetički parametri	Sr. vrednost ± SD
Tmax (min)	138.00±58.48
Cmax (µg/ml)	358.50±92.88
AUC _{0-600min} (µg*min/ml)	109300.80±33066.82
Ke (min ⁻¹)	0.0039±0.0014
AUC _{0-∞} (µg*min/ml)	128605.50±42309.25
t _{1/2} (min)	190.79±54.31
MRT (min)	343.50±77.99
R ²	0.960±0.05

Kada je gliklazid primenjen u obliku suspenzije peroralnim putem zdravim pacovima, sa Grafikona 2 i iz Tabele 2 se vidi da se maksimalne koncentracije gliklazida javljaju nešto više od 2h (Tmax=138 minuta) nakon unete doze, i iznose u proseku 358.5 µg/ml (Cmax). Površina ispod krive koncentracije je AUC_{0-∞} je 128605.50 µg*min/ml. Postoji znatna interindividulna varijabilnost kako u dostignutim maksimalnim koncentracijama gliklazida u serumu tako i u vremenu potrebnom za njihovo dostizanje kao i u površini ispod krive koncentracije.

5.1.2 Farmakokinetika gliklazida primenjenog u obliku suspenzije sa holnom kiselinom

Izmerene koncentracije gliklazida u serumu zdravih životinja i njegovi farmakokinetički parametri nakon peroralne aplikacije u obliku suspenzije (40 mg/kg) u kombinaciji sa rastvorom holne kiseline (4 mg/kg) su prikazane na Grafikonu 3 i Tabeli 3.



Grafikon 3. Kriva koncentracije gliklazida u serumu-vreme nakon p.o. davanja suspenzije gliklazida (40 mg/kg) sa holnom kiselinom (4 mg/kg) zdravim životinjama. Podaci su prikazani kao sr. vrednost \pm SD (n=6).

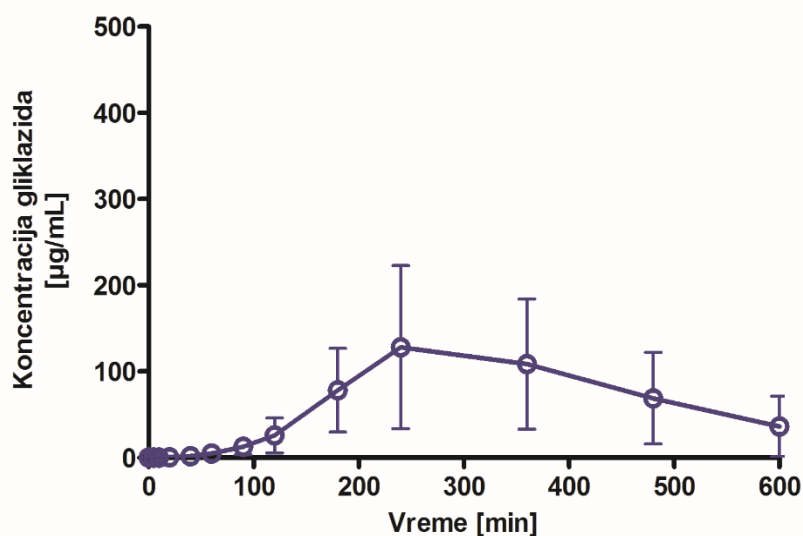
Tabela 3. Farmakokinetički parametri gliklazida nakon peroralne aplikacije gliklazida (40 mg/kg) sa holnom kiselinom (4 mg/kg) zdravim životinjama.

Farmakokinetički parametri	Sr. vrednost \pm SD
Tmax (min)	108.00 \pm 16.43
Cmax (µg/ml)	116.38 \pm 79.16
AUC _{0-600min} (µg*min/ml)	36667.967 \pm 20027.85
Ke (min ⁻¹)	0.0033 \pm 0.0008
t _{1/2} (min)	225.77 \pm 64.77
AUC _{0-∞} (µg*min/ml)	44024.94 \pm 20199.00
MRT (min)	373.16 \pm 117.26
R ²	0.938 \pm 0.09

Nakon peroralne primene gliklazida u vidu suspenzije u kombinaciji sa holnom kiselinom, maksimalne koncentracije gliklazida u serumu se postižu nakon manje od 2h (Tmax=108 min) od unete doze i iznose u proseku 116.38 µg/ml (Cmax). Površina ispod krive koncentracije je AUC_{0-∞} je 44024.94 µg*min/ml. Postoji znatna interindividulna varijabilnost kako u dostignutim maksimalnim koncentracijama gliklazida u serumu tako i u vremenu potrebnom za njihovo dostizanje kao i u površini ispod krive koncentracije.

5.1.3 Farmakokinetika gliklazida primenjenog u obliku mikrovezikula

Izmerene koncentracije gliklazida u serumu zdravih životinja primenjenog peroralno u obliku alginatnih mikrovezikula i njegovi farmakokinetički parametri su prikazani redom na Grafikonu 4 i Tabeli 4.



Grafikon 4. Kriva koncentracije gliklazida u serumu-vreme nakon peroralnog davanja gliklazida (40 mg/kg) u obliku alginatnih mikrovezikula zdravim životinjama. Podaci su prikazani kao sr. vrednost \pm SD (n=6).

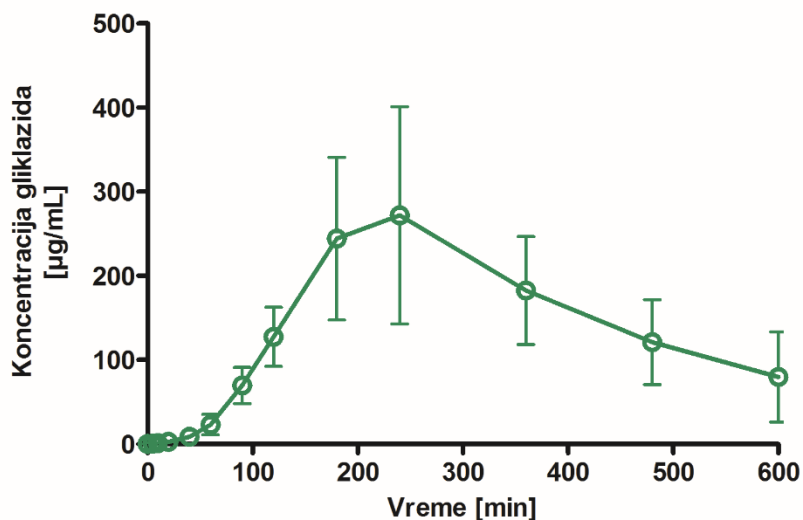
Tabela 4. Farmakokinetički parametri gliklazida nakon peroralne aplikacije gliklazida (40 mg/kg) u obliku alginatnih mikrovezikula zdravim životinjama.

Farmakokinetički parametri	Sr. vrednost \pm SD
Tmax (min)	276.00 \pm 116.96
Cmax (µg/ml)	135.00 \pm 86.73
AUC _{0-600min} (µg*min/ml)	41381.16 \pm 26684.71
Ke (min ⁻¹)	0.0050 \pm 0.0031
t _{1/2} (min)	288.25 \pm 357.06
AUC _{0-∞} (µg*min/ml)	54834.96 \pm 31588.00
MRT (min)	591.33 \pm 454.51
R ²	0.827 \pm 0.361

Kod zdravih životinja, maksimalne koncentracije gliklazida primenjenog u vidu nove farmaceutske formulacije mikrovezikula sa alginatom se dostižu u proseku 4.5 h nakon unete doze ($T_{max}=276.00$ min) dostižući u proseku koncentracije od $135.00 \mu\text{g/ml}$ (C_{max}). Površina ispod krive koncentracije je $AUC_{0-\infty}$ je $54834.96 \mu\text{g}\cdot\text{min/ml}$. Postoji znatna interindividulna varijabilnost kako u dostignutim maksimalnim koncentracijama gliklazida u serumu tako i u vremenu potrebnom za njihovo dostizanje kao i u površini ispod krive koncentracije.

5.1.4 Farmakokinetika gliklazida primenjenog u obliku mikrovezikula sa holnom kiselinom

Izmerene koncentracije gliklazida u serumu zdravih životinja i njegovi farmakokinetički parametri nakon peroralne aplikacije (p.o.) u obliku alginatnih mikrovezikula sa holnom kiselinom su prikazane redom na Grafikonu 5 i Tabeli 5.



Grafikon 5. Kriva koncentracije gliklazida u serumu-vreme nakon peroralnog davanja gliklazida (40 mg/kg) u obliku alginatnih mikrovezikula sa holnom kiselinom (4 mg/kg) zdravim životinjama. Podaci su prikazani kao sr. vrednost \pm SD ($n=6$).

Tabela 5. Farmakokinetički parametri gliklazida nakon peroralne aplikacije gliklazida (40 mg/kg) u obliku alginatnih mikrovezikula sa holnom kiselinom (4 mg/kg) zdravim životinjama.

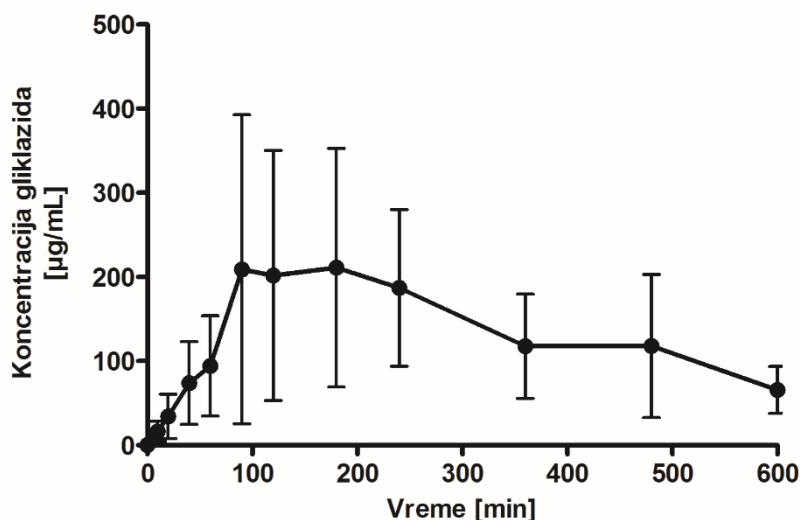
Farmakokinetički parametri	Sr. vrednost \pm SD
Tmax (min)	240.00 \pm 73.48
Cmax (μ g/ml)	303.37 \pm 105.55
AUC _{0-600min} (μ g*min/ml)	88948.65 \pm 25668.35
Ke (min ⁻¹)	0.0039 \pm 0.0018
t _{1/2} (min)	289.73 \pm 315.94
AUC _{0-∞} (μ g*min/ml)	140102.79 \pm 86204.38
MRT (min)	574.49 \pm 483.96
R ²	0.984 \pm 0.015

Kada je formulaciji alginatnih mikrovezikula gliklazida dodata holna kiselina, maksimalne koncentracije gliklazida u serumu zdravih životinja su izmerene nakon nešto više od 4 h nakon unete doze (Tmax=240.00 min) i iznosile su u proseku 303.37 μ g/ml (Cmax). Površina ispod krive koncentracije je AUC_{0-∞} je 140102.79 μ g*min/ml. Postoji znatna interindividulna varijabilnost kako u dostignutim maksimalnim koncentracijama gliklazida u serumu tako i u vremenu potrebnom za njihovo dostizanje kao i u površini ispod krive koncentracije.

5.2 Farmakokinetika gliklazida kod životinja obolelih od dijabetes melitusa

5.2.1 Farmakokinetika gliklazida primenjenog u obliku suspenzije

Na Grafikonu 6 i Tabeli 6 prikazane su redom izmerene koncentracije gliklazida u serumu i njegovi farmakokinetički parametri kod životinja obolelih od dijabetesa nakon njegove peroralne aplikacije (p.o.).



Grafikon 6. Kriva koncentracije gliklazida u serumu-vreme nakon peroralnog davanja gliklazida (40 mg/kg) životinjama obolelim od dijabetesa. Podaci su prikazani kao sr. vrednost \pm SD (n=6).

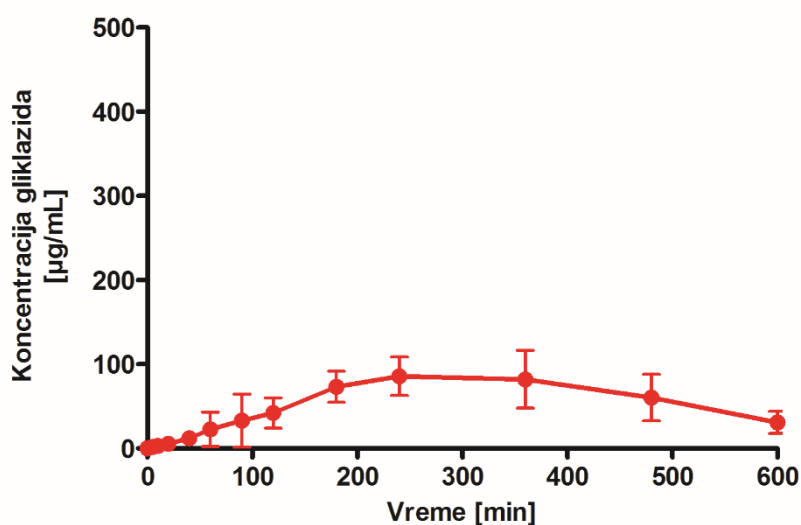
Tabela 6. Farmakokinetički parametri gliklazida nakon peroralne aplikacije gliklazida u obliku suspenzije (40 mg/kg) životinjama obolelim od dijabetes melitusa.

Farmakokinetički parametri	Sr. vrednost \pm SD
Tmax (min)	144.00 \pm 65.04
Cmax (µg/ml)	258.56 \pm 166.28
AUC_{0-600min} (µg*min/ml)	77067.76 \pm 44345.80
Ke (min⁻¹)	0.0039 \pm 0.0030
t_{1/2} (min)	254.43 \pm 134.91
AUC_{0-∞} (µg*min/ml)	100632.65 \pm 48412.17
MRT (min)	455.75 \pm 180.95
R²	0.7576 \pm 0.2051

Kod životinja obolelih od dijabetesa kojima je gliklazid aplikovan peroralnim putem u obliku suspenzije, maksimalne koncentracije gliklazida su zabeležene nešto više od 2h nakon unete doze (Tmax=144.00 min) i iznosile su u proseku 258.56 µg/ml (Cmax). Površina ispod krive koncentracije je AUC_{0-∞} je 100632.65 µg*min/ml. Postoji znatna interindividulna varijabilnost kako u dostignutim maksimalnim koncentracijama gliklazida u serumu tako i u vremenu potrebnom za njihovo dostizanje kao i u površini ispod krive koncentracije.

5.2.2 Farmakokinetika gliklazida primenjenog u obliku suspenzije sa holnom kiselinom

Izmerene koncentracije gliklazida i njegovi farmakokinetički parametri kod životinja obolelih od dijabetesa kada je on aplikovan peroralnim putem u obliku suspenzije u kombinaciji sa holnom kiselinom dati su redom na Grafikonu 7 i Tabeli 7.



Grafikon 7. Kriva koncentracije gliklazida u serumu-vreme nakon p.o. davanja gliklazida (40 mg/kg) sa holnom kiselinom (4 mg/kg) životinjama obolelim od dijabetesa. Podaci su prikazani kao sr. vrednost \pm SD (n=6).

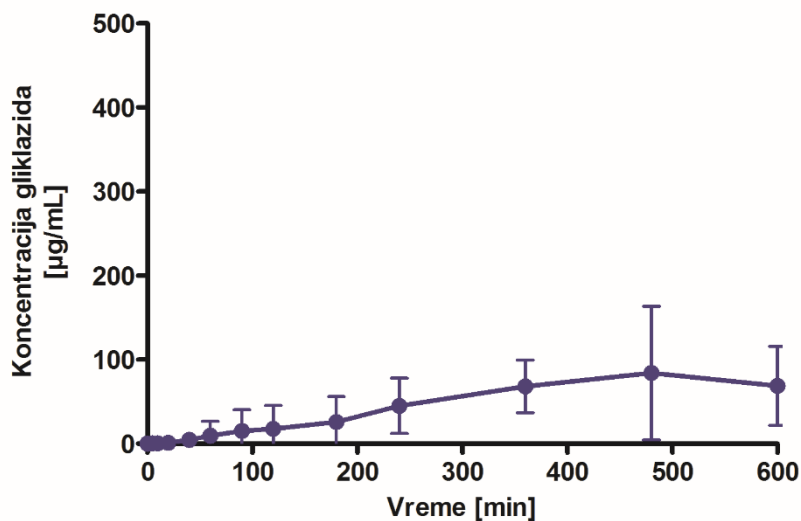
Tabela 7. Farmakokinetički parametri gliklazida nakon primene gliklazida datog u obliku suspenzije sa holnom kiselinom životinjama obolelim od dijabetes melitusa.

Farmakokinetički parametri	Sr. vrednost \pm SD
Tmax (min)	252.00 \pm 65.73
Cmax (µg/ml)	92.63 \pm 29.70
AUC _{0-600min} (µg*min/ml)	34843.68 \pm 9857.99
Ke (min ⁻¹)	0.0042 \pm 0.0024
t _{1/2} (min)	285.36 \pm 304.30
AUC _{0-∞} (µg*min/ml)	49261.74 \pm 13088.98
MRT (min)	577.46 \pm 414.97
R ²	0.9094 \pm 0.1273

Kada su životinje obolele od dijabetesa tretirane gliklazidom u obliku suspenzije u kombinaciji sa holnom kiselinom peroralnim načinom primene, maksimalne koncentracije gliklazida su postizane u proseku za nešto više od 4h nakon unete doze ($T_{max}=252.00$ min) i iznosile su $92.63 \mu\text{g/ml}$ (C_{max}). Površina ispod krive koncentracije je $AUC_{0-\infty}$ je $49261.74 \mu\text{g}\cdot\text{min/ml}$. Postoji znatna interindividulna varijabilnost kako u dostignutim maksimalnim koncentracijama gliklazida u serumu tako i u vremenu potrebnom za njihovo dostizanje kao i u površini ispod krive koncentracije.

5.2.3 Farmakokinetika gliklazida primenjenog u obliku mikrovezikula

Na Grafikonu 8 i Tabeli 8 date su izmerene koncentracije gliklazida i njegovi farmakokinetički parametri u serumu životinja obolelih od dijabetesa nakon tretmana gliklazidom u obliku nove farmaceutske formulacije alginatnih mikrovezikula.



Grafikon 8. Kriva koncentracije gliklazida u serumu-vreme nakon p.o. davanja gliklazida (40 mg/kg) u obliku alginatnih mikrovezikula životinjama obolelim od dijabetesa. Podaci su prikazani kao sr. vrednost \pm SD ($n=6$).

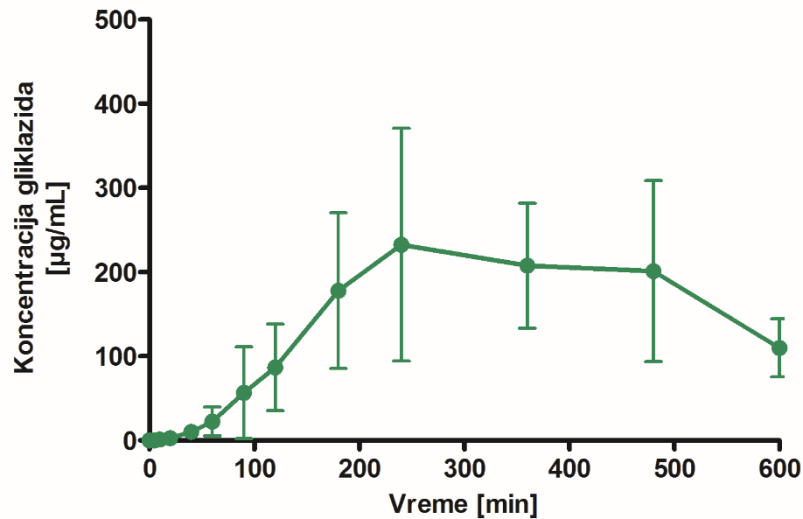
Tabela 8. Farmakokinetički parametri gliklazida nakon primene gliklazida datog u obliku mikrovezikula životinjama obolelim od dijabetes melitusa.

Farmakokinetički parametri	Sr. vrednost ± SD
Tmax (min)	456.00±156.46
Cmax (µg/ml)	106.38±67.84
AUC_{0-600min} (µg*min/ml)	29576.19±14844.87
Ke (min⁻¹)	0.0026±0.0017
t_{1/2} (min)	851.34±1299.67
AUC_{0-∞} (µg*min/ml)	142213.33±175252.00
MRT (min)	784.34±406.04
R²	0.6185±0.4849

Tretman životinja obolelih od dijabetesa novom formulacijom gliklazida u vidu alginatnih mikrovezikula je rezultirao u dostizanju njegovih maksimalnih koncentracija više od 7.5 h nakon unete doze (Tmax=456.00 min) i iznosile su u proseku 106.38 µg/ml (Cmax). Površina ispod krive koncentracije je AUC_{0-∞} je 142213.33 µg*min/ml. Postoji znatna interindividulna varijabilnost kako u dostignutim maksimalnim koncentracijama gliklazida u serumu tako i u vremenu potrebnom za njihovo dostizanje kao i u površini ispod krive koncentracije.

5.2.4 Farmakokinetika gliklazida primenjenog u obliku mikrovezikula sa holnom kiselinom

Izmerene koncentracije gliklazida u vidu mikrovezikula u kombinaciji sa dodatom holnom kiselinom kod životinja obolelih od dijabetesa su prikazane redom na Grafikonu 9 i Tabeli 9.

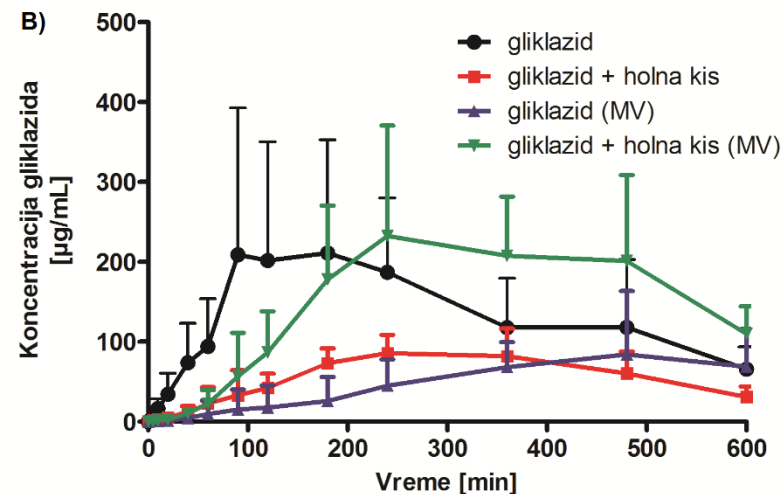
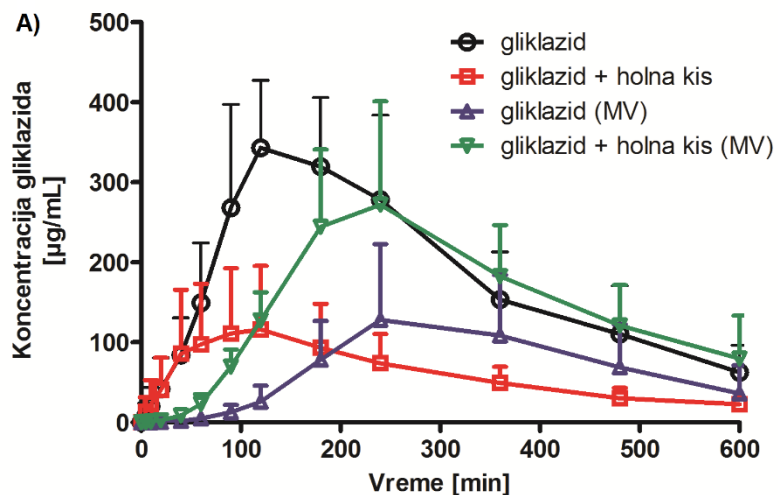


Grafikon 9. Kriva koncentracije gliklazida u serumu-vreme nakon p.o. davanja gliklazida (40 mg/kg) u obliku alginatnih mikrovezikula sa holnom kiselinom (4 mg/kg) životinjama obolelim od dijabetesa. Podaci su prikazani kao sr. vrednost \pm SD (n=6).

Tabela 9. Farmakokinetički parametri gliklazida nakon primene gliklazida datog u obliku mikrovezikula sa holnom kiselinom životinjama obolelim od dijabetes melitusa.

Farmakokinetički parametri	Sr. vrednost \pm SD
Tmax (min)	276.00 \pm 116.96
Cmax (µg/ml)	252.17 \pm 114.82
AUC_{0-600min} (µg*min/ml)	93575.22 \pm 41618.56
Ke (min⁻¹)	0.0026 \pm 0.0009
t_{1/2} (min)	314.65 \pm 183.50
AUC_{0-∞} (µg*min/ml)	149688.04 \pm 52712.80
MRT (min)	606.52 \pm 282.39
R²	0.7930 \pm 0.1734

Kada su životinje obolele od dijabetesa tretirane novom formulacijom gliklazida u vidu alginatnih mikrovezikula sa dodatkom holne kiseline, maksimalne koncentracije gliklazida su postizane nakon nešto više od 4h (Tmax=276.00 min) od unete doze i iznosile su 252.17 µg/ml (Cmax) u proseku. Površina ispod krive koncentracije je AUC_{0-∞} je 149688.04 µg*min/ml. Postoji znatna interindividulna varijabilnost kako u dostignutim maksimalnim koncentracijama gliklazida u serumu tako i u vremenu potrebnom za njihovo dostizanje kao i u površini ispod krive koncentracije.



Grafikon 10. Uporedni pregled kriva koncentracija gliklazida u različitim formulacijama u serumu-vreme nakon njihovog peroralnog davanja

A) zdravim životinjama **B)** životinjama obolelim od dijabetesa. Podaci su prikazani kao sr. vrednost±SD (n=6).

Tabela 10. Uporedni pregled farmakokinetičkih parametara gliklazida u različitim formulacijama nakon njihovog peroralnog davanja zdravim i životinjama obolelim od dijabetesa. Podaci su prikazani kao sr. vrednost±SD (n=6).

FARMAKOKINETIČKI PARAMETAR	gliklazid		gliklazid + holna kiselina		gliklazid (MV)		gliklazid + holna kiselina (MV)	
	zdrave životinje	životinje obolele od DM	zdrave životinje	životinje obolele od DM	zdrave životinje	životinje obolele od DM	zdrave životinje	životinje obolele od DM
Tmax (min)	138.00±58.48	144.00±65.04	108.00±16.43	252.00±65.73	276.00±116.96	456.00±156.46 *	240.00±73.48	276.00±116.96
Cmax (µg/ml)	358.50±92.88	258.56±166.28	116.38±79.16	92.63±29.70 **	135.00±86.73	106.38±67.84	303.37±105.55 **	252.17±114.82 **
AUC _{0-600min} (µg*min/ml)	109300.80±33066.82	77067.76±44345.80	36667.967±20027.85	34843.68±9857.99 **	41381.16±26684.71	29576.19±14844.87 *	88948.65±25668.35	93575.22±41618.56 **
Ke (min ⁻¹)	0.0039±0.0014	0.0039±0.0030	0.0033±0.0008	0.0042±0.0024	0.0050±0.0031	0.0026±0.0017	0.0039±0.0018	0.0026±0.0009
t½ (min)	190.79±54.31	254.43±134.91	225.77±64.77	285.36±304.30	288.25±357.06	851.34±1299.67	289.73±315.94	314.65±183.50
AUC _∞ (µg*min/ml)	128605.50±42309.25	100632.65±48412.17	44024.94±20199.00	49261.74±13088.98	54834.96±31588.00	142213.33±175252.00	140102.79±86204.38	149688.04±52712.80
MRT (min)	343.50±77.99	455.75±180.95	373.16±117.26	577.46±414.97	591.33±454.51	784.34±406.04	574.49±483.96	606.52±282.39
R ²	0.960±0.05	0.7576±0.2051	0.938±0.09	0.9094±0.1273	0.827±0.361	0.6185±0.4849	0.984±0.015	0.7930±0.1734

* p<0.05 grupa DM gliklazid vs DM gliklazid (MV);

**p<0.05 grupa DM gliklazid vs DM gliklazid + holna kiselina; grupa zdravi gliklazid + holna kiselina vs zdravi gliklazid + holna (MV); grupa DM gliklazid + holna kiselina vs DM gliklazid + holna (MV)

Grafikon 10 i Tabela 10 pružaju uporedni pregled efekta formulacije gliklazida i dodatka holne kiseline kao i uticaj dijabetesa na kinetiku peroralno (p.o.) primenjenog gliklazida. I kod zdravih i kod životinja obolelih od dijabetesa, mikroinkapsulacija gliklazida je rezultirala u njegovim smanjenim maksimalnim koncentracijama (C_{max}) u serumu, u odnosu na gliklazid aplikovan u obliku suspenzije ($p < 0.05$). Niže vrednosti maksimalnih koncentracija gliklazida kao i njihovo sporije postizanje (T_{max}) su uočeni kod životinja obolelih od dijabetesa u odnosu na zdrave životinje, bez obzira na formulaciju gliklazida.

Kada je gliklazidu primenjenom peroralno u vidu suspenzije dodata holna kiselina, njegove maksimalne koncentracije bile su snižene u poređenju sa tretmanom samo gliklazidom bez holne kiseline ($p < 0.05$), a vreme potrebno za njihovo postizanje produženo za oko 2 h kod životinja obolelih od dijabetesa, ali ne i kod zdravih. Interesantno je to da je mikroinkapsulacija gliklazida sa dodatkom holne kiseline i kod zdravih i kod životinja obolelih od dijabetesa imala za posledicu značajno ($p < 0.05$) povećanje njegove maksimalne koncentracije u serumu u odnosu na neinkapsuliranu formulaciju, pri čemu je kod zdravih životinja vreme postizanja maksimalnih koncentracija bilo značajno produženo, što nije bio slučaj kod životinja obolelih od dijabetesa.

Poluvreme eliminacije gliklazida ($t_{1/2}$) bilo je najkraće kod zdravih životinja tretiranih njegovom suspenzijom, a najduže kod životinja obolelih od dijabetesa koje su dobile mikroinkapsuliranu formulaciju gliklazida. Dijabetes je imao za posledicu produžavanje vremena eliminacije gliklazida, bez obzira na njegovu formulaciju.

Srednje vreme zadržavanja leka u organizmu (MRT) je generalno bilo produženo kod pacova obolelih od dijabetesa u poređenju sa zdravim životinjama. Vrednost srednjeg vremena zadržavanja gliklazida bila je najveća kod životinja obolelih od

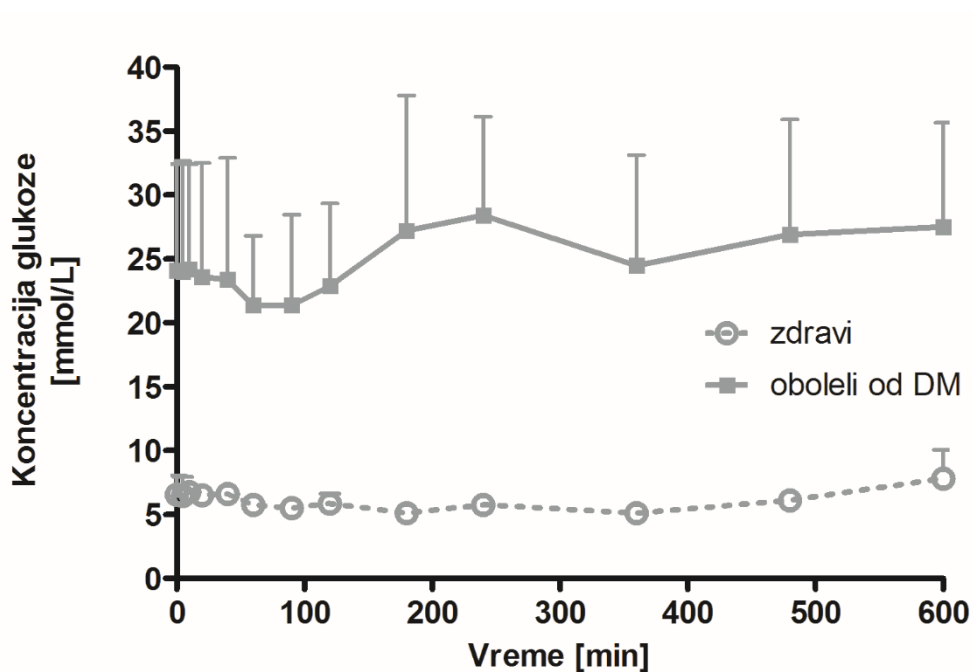
dijabetesa kod kojih je gliklazid aplikovan u vidu alginatnih mikrovezikula, iako razlika nije bila statistički značajna u odnosu na grupu tretiranu suspenzijom gliklazida. Dodatak holne kiseline rezultirao je trendom produženja srednjeg vremena zadržavanja gliklazida u organizmu kada je aplikovan u vidu suspenzije, i njegovim smanjenjem u slučaju primene mikroinkapsulirane kombinacije gliklazida i holne kiseline, mada ove razlike nisu bile statistički značajne.

5.3 Koncentracija glukoze u krvi

Uticaj gliklazida primenjenog u vidu različitih formulacija u kombinaciji sa holnom kiselinom ili bez nje na koncentraciju glukoze (mmol/l) u krvi zdravih i životinja obolelih od dijabetesa je prikazan na Grafikonima 11, 12, 13, 14 i 15.

5.3.1 Koncentracija glukoze kod netretiranih životinja (kontrola)

Koncentracije glukoze u serumu kod netretiranih zdravih i od dijabetesa obolelih životinja, u navedenim vremenskim intervalima (0, 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480 i 600 minuta) su prikazane na Grafikonu 11.

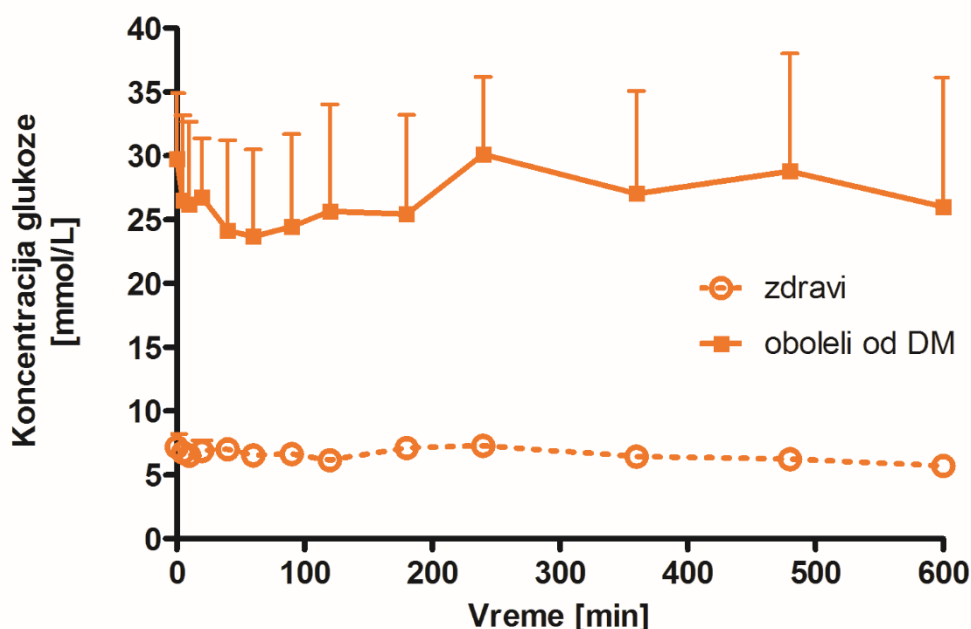


Grafikon 11. Koncentracija glukoze (mmol/L)-vreme kriva kod netretiranih zdravih i od dijabetesa obolelih životinja (kontrolna grupa). Podaci su prikazani kao sr. vrednost \pm SD (n=6).

Očekivano, koncentracija glukoze u grupi netretiranih životinja obolelih od dijabetes melitusa kretala se u rasponu od 13.9 mmol/L do 33.3 mmol/L, dok je kod zdravih životinja njena koncentracija varirala između 4.8 mmol/L do 9.4 mmol/L.

5.3.2 Koncentracija glukoze posle primene holne kiseline

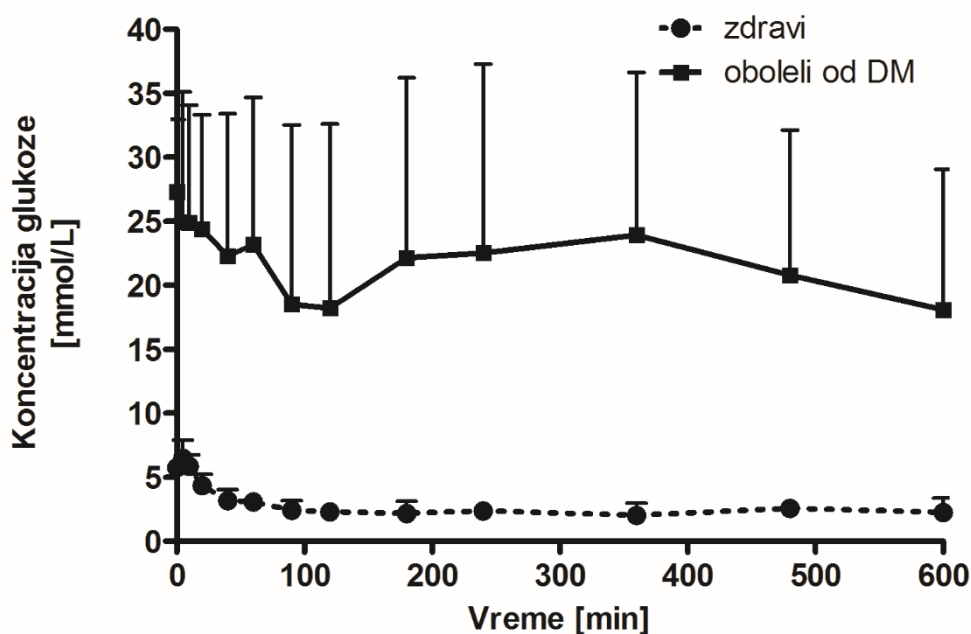
Sa Grafikona 12 gde su prikazane koncentracije glukoze u serumu nakon peroralne aplikacije holne kiseline kod zdravih i od dijabetesa obolelih životinja, u navedenim vremenskim intervalima, vidi se da sama holna kiselina nije ispoljila značajan hipoglikemijski efekat kod zdravih životinja sa koncentracijama (opseg kretanja koncentracija između 5.0 mmol/L do 9.4 mmol/L), dok je kod životinja obolelih od dijabetesa u prvih 90 min od primene imala blago hipoglikemijsko dejstvo, nakon čega je koncentracija glukoze u krvi ponovo počela da raste.



Grafikon 12. Koncentracija glukoze (mmol/L)-vreme kriva nakon peroralne aplikacije holne kiseline kod zdravih i od dijabetesa obolelih životinja. Podaci su prikazani kao sr. vrednost \pm SD (n=6).

5.3.3 Koncentracija glukoze posle primene gliklazida u obliku suspenzije

Koncentracije glukoze u serumu nakon peroralne aplikacije gliklazida u obliku suspenzije (40 mg/kg) kod zdravih i od dijabetesa obolelih životinja, u navedenim vremenskim intervalima su prikazane na Grafikonu 13.



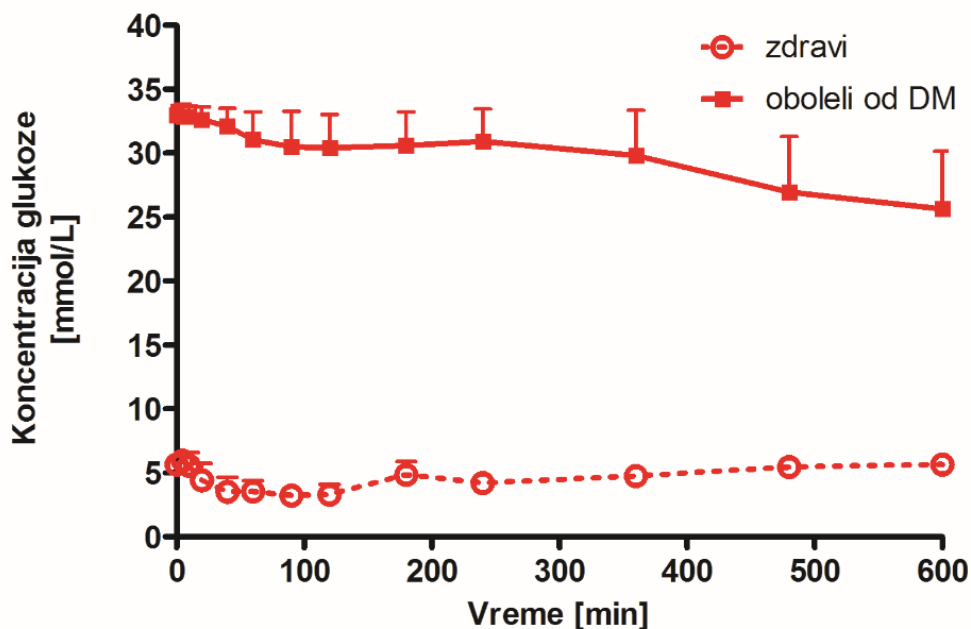
Grafikon 13. Koncentracija glukoze (mmol/L)-vreme kriva nakon peroralne aplikacije gliklazida u obliku suspenzije (40 mg/kg) kod zdravih i od dijabetesa obolelih životinja. Podaci su prikazani kao sr. vrednost \pm SD (n=6).

Primena gliklazida peroralnim putem u obliku suspenzije je i kod zdravih i kod životinja obolelih od dijabetesa rezultirala brzim padom glikemije tokom prvih 90 minuta nakon primenjene doze.

5.3.4 Koncentracija glukoze posle primene gliklazida u obliku suspenzije sa holnom kiselinom

Izmerene koncentracije glukoze u serumu zdravih i od dijabetesa obolelih životinja nakon peroralne aplikacije gliklazida u obliku suspenzije (40 mg/kg) u

kombinaciji sa holnom kiselinom (4mg/kg), tokom 10 sati su prikazane na Grafikonu 14.

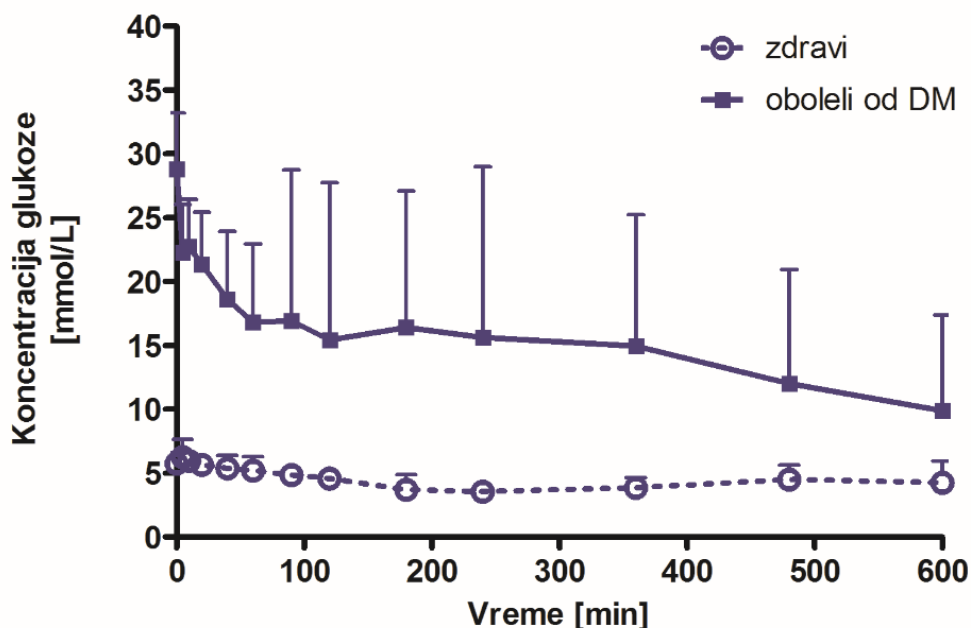


Grafikon 14. Koncentracija glukoze (mmol/L)-vreme kriva nakon peroralne aplikacije gliklazida u obliku suspenzije (40 mg/kg) u kombinaciji sa holnom kiselinom (4mg/kg) kod zdravih i od dijabetesa obolelih životinja. Podaci su prikazani kao sr. vrednost \pm SD (n=6).

Sa Grafikona 14 se vidi da je tretman životinja obolelih od dijabetesa peroralno primenjenim gliklazidom u obliku suspenzije u kombinaciji sa holnom kiselinom imao za posledicu blago i odloženo smanjenje koncentracije glukoze u krvi, dok ovaj efekat nije bio uočljiv kod zdravih životinja.

5.3.5 Koncentracija glukoze posle primene gliklazida u obliku mikrovezikula

Na Grafikonu 15 dat je pregled izmerenih koncentracija glukoze u serumu zdravih i od dijabetesa obolelih životinja nakon peroralne aplikacije (p.o.) gliklazida u obliku novosintetisane formulacije u vidu mikrovezikula u navedenim vremenskim interalima (0, 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480 i 600 minuta).

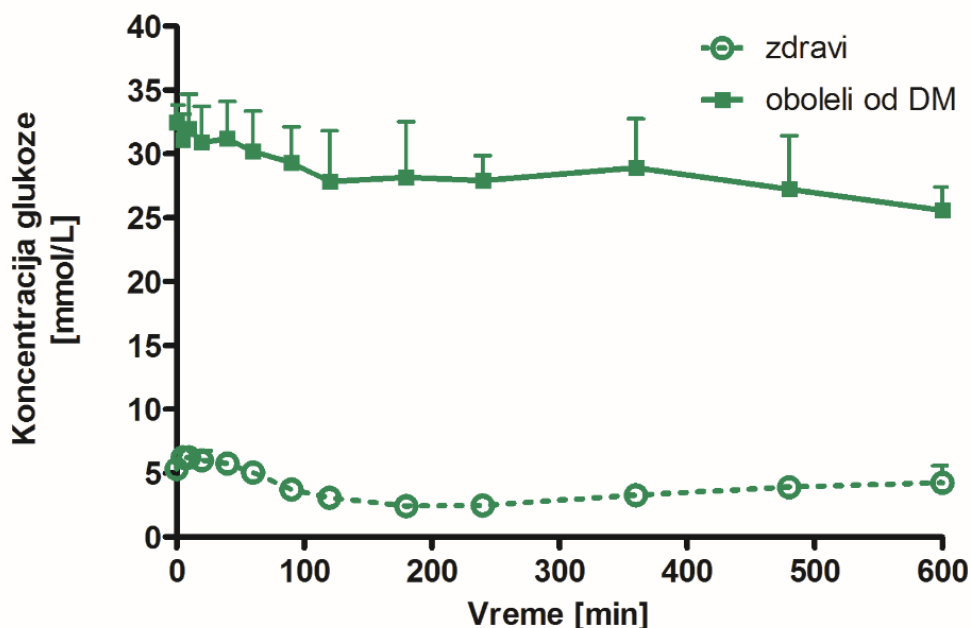


Grafikon 15. Koncentracija glukoze (mmol/L)-vreme kriva nakon peroralne aplikacije gliklazida datog u obliku mikrovezikula kod zdravih i od dijabetesa obolelih životinja. Podaci su prikazani kao sr. vrednost \pm SD (n=6).

Kada su životinje obolele od dijabetesa tretirane gliklazidom u obliku mikrovezikula sa alginatom, uočen je brz pad glikemije u prvih 90 minuta od unete doze, a zatim kontinuirano i blago smanjenje koncentracije glukoze u krvi, dok je ovaj efekat izostao kod zdravih životinja.

5.3.6 Koncentracija glukoze posle primene gliklazida u obliku mikrovezikula sa holnom kiselinom

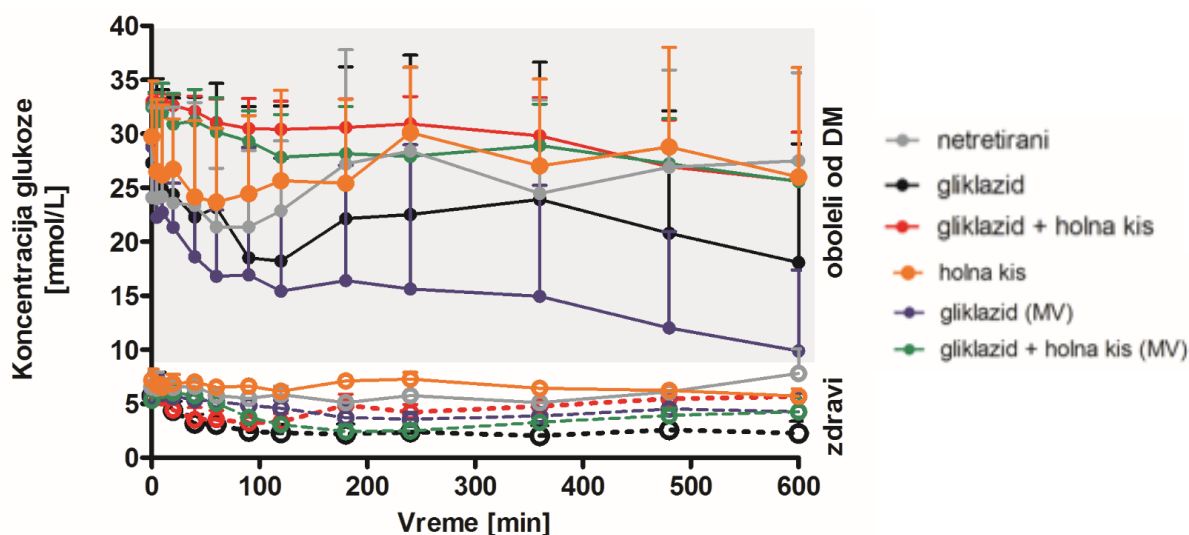
Izmerene koncentracije glukoze u serumu zdravih i od dijabetesa obolelih životinja nakon peroralne aplikacije (p.o.) gliklazida datog u obliku mikrovezikula sa žučnim kiselinama, tokom 10 sati su prikazane na Grafikonu 16.



Grafikon 16. Koncentracija glukoze (mmol/L)-vreme kriva nakon peroralne aplikacije gliklazida datog u obliku u mikrovezikula sa žučnim kiselinama kod zdravih i od dijabetesa obolelih životinja. Podaci su prikazani kao sr. vrednost \pm SD (n=6).

Kada je formulaciji gliklazida u vidu alginatnih mikrovezikula dodata holna kiselina zapaženo je blago i odloženo smanjenje koncentracije glukoze u krvi kod zdravih i životinja obolelih od dijabetesa.

Uporednim pregledom krivih koncentracija glukoze-vreme (Grafikon 17) odnosno vrednosti površine ispod krivih koncentracija glukoze – vreme (Tabela 11) nakon peroralne primene gliklazida u različitim formulacija kod zdravim i životinjama obolelim od dijabetesa, pokazan je uticaj koji gliklazid primenjen peroralno u obliku suspenzije ili u vidu mikrovezikula, sa ili bez dodatka holne kiseline ima na regulaciju koncentracije glukoze u krvi kod zdravih i životinja obolelih od dijabetesa.



Grafikon 17. Uporedni pregled krivih glukoze koncentracija - vreme nakon peroralne aplikacije gliklazida i holne kiseline datih u različitim formulacijama zdravim i životinjama obolelih od dijabetesa. Podaci su prikazani kao sr. vrednost \pm SD (n=6).

Tabela 11. Uporedni pregled vrednosti površine ispod krive koncentracija glukoze - vreme (AUC_{0-t} , mmol*min /L) nakon peroralne aplikacije gliklazida u različitim formulacijama zdravim i životinjama obolelih od dijabetesa. Podaci su prikazani kao sr. vrednost \pm SD (n=6).

Tretman	AUC_{0-t} [mmol*min /L]	
	Zdrave životinje	Životinje obolele od dijabetesa
Fiziološki rastvor <i>p.o.</i> (1 ml/kg)	3 536 \pm 47	15 398 \pm 4 893
Holna kiselina rastvor <i>p.o.</i> (4 mg/kg)	3 928 \pm 202	16 258 \pm 4 683
Gliklazid suspenzija <i>p.o.</i> (40 mg/kg)	1 502 \pm 354 x	12 947 \pm 7 114
Gliklazid suspenzija <i>p.o.</i> (40 mg/kg) + holna kiselina <i>p.o.</i> (4 mg/kg)	2 788 \pm 254	17 651 \pm 1 588
Alginatne mikrovezikule gliklazida <i>p.o.</i>	2 562 \pm 296	8 885 \pm 5 693 *
Alginatne mikrovezikule gliklazida sa holnom kiselinom <i>p.o.</i>	2 154 \pm 191	16 924 \pm 1 689 +

* $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu životinja sa dijabetesom

+ $p < 0,05$ u odnosu na životinje obolelih od dijabetesa tretiranih mikrovezikulama sa gliklazidom

x $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja

Površine ispod krivih glikemije-vreme (AUC_{0-t}) bile su statistički značajno veće kod životinja obolelih od dijabetesa nego kod zdravih, bez obzira na primenjenu formulaciju.

Kod zdravih životinja, gliklazid primenjen peroralnim putem u obliku suspenzije ($AUC_{0-t} = 1502 \pm 354 \text{ mmol} \cdot \text{min} / \text{L}$), kao i u vidu alginatnih mikrovezikula ($AUC_{0-t} = 2562 \pm 296 \text{ mmol} \cdot \text{min} / \text{L}$), je rezultirao statistički značajnim smanjenjem ($p < 0.05$) površine ispod krive glikemije-vreme (AUC_{0-t}) u odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja ($AUC_{0-t} = 3536 \pm 47 \text{ mmol} \cdot \text{min} / \text{L}$), mada je smanjenje AUC_{0-t} nakon primene mikroinkapsuliranog gliklazida bilo manje izraženo u odnosu na gliklazid aplikovan u obliku suspenzije. Tretman zdravih životinja samo holnom kiselinom ($AUC_{0-t} = 3928 \pm 202 \text{ mmol} \cdot \text{min} / \text{L}$), imao je za posledicu povećanje AUC_{0-t} u odnosu na netretiranu grupu ($AUC_{0-t} = 3536 \pm 47 \text{ mmol} \cdot \text{min} / \text{L}$), ali ta razlika nije bila statistički značajna. Nakon peroralne primene gliklazida u kombinaciji sa žučnim kiselinama u formulaciji mikrovezikula ($AUC_{0-t} = 2154 \pm 19 \text{ mmol} \cdot \text{min} / \text{L}$) kod zdravih životinja, AUC_{0-t} bila je manja u poređenju sa primenom iste kombinacije koja nije mikroinkapsulirana ($AUC_{0-t} = 2788 \pm 25 \text{ mmol} \cdot \text{min} / \text{L}$), mada sniženje nije bilo statistički značajno.

Kod životinja obolelih od dijabetesa, primena gliklazida u obliku suspenzije ($AUC_{0-t} = 12947 \pm 7114 \text{ mmol} \cdot \text{min} / \text{L}$), kao ni same holne kiseline ($AUC_{0-t} = 16258 \pm 4683 \text{ mmol} \cdot \text{min} / \text{L}$) nije dovela do statistički značajne promene površine ispod krive glikemije-vreme u odnosu na kontrolnu grupu životinja obolelih od dijabetesa ($AUC_{0-t} = 15398 \pm 4893 \text{ mmol} \cdot \text{min} / \text{L}$). Iako je aplikovani gliklazid u obliku suspenzije smanjio, ali ne značajno, AUC_{0-t} ($AUC_{0-t} = 8885 \pm 5693 \text{ mmol} \cdot \text{min} / \text{L}$) u poređenju sa kontrolnom grupom obolelih od dijabetesa, mikroinkapsulacija rezultirala je u statistički značajnom smanjenju AUC_{0-t} u odnosu na kontrolnu, netretiranu grupu ($p < 0.05$). Dodatak holne kiseline peroralno primenjenom gliklazidu u obliku suspenzije ($AUC_{0-t} = 17651 \pm 1588$

mmol*min /L) rezultirao je povećanjem AUC_{0-t} koje nije bilo statistički značajno, u odnosu na gliklazid primenjen bez holne kiseline ($AUC_{0-t}=12947\pm 7114$ mmol*min /L). Sa druge strane, mikroinkapsulacija gliklazida u kombinaciji sa holnom kiselinom ($AUC_{0-t}=16924\pm 1689$ mmol*min /L) imala je za posledicu statistički značajno povećanje AUC_{0-t} u odnosu na mikroinkapsuliranu formulaciju gliklazida bez holne kiseline ($AUC_{0-t}=8885\pm 5693$ mmol*min /L) ($p<0.05$) i poređenjem površina ispod krive glikemije-vreme kod grupa koje su primile mikroinkapsuliranu ($AUC_{0-t}=16924\pm 1689$ mmol*min /L) i neinkapsuliranu ($AUC_{0-t}=17651\pm 1588$ mmol*min /L) kombinaciju gliklazida i holne kiseline, uočava se da je sam proces mikroinkapsulacije gliklazida i holne kiseline doveo do smanjenja AUC_{0-t} iako ono nije bilo statistički značajno.

Efekat gliklazida, datog u različitim formulacijama, na glikemiju jasnije se uočava posmatranjem promena pada i porasta pojedinačnih vrednosti glikemije tokom vremena, kao i iz podataka direktno određenih maksimalnih vrednosti pada glikemije (E_{max}) u odnosu na početne vrednosti pre davanja gliklazida (E_0).

Gliklazid nakon peroralnog davanja u obliku suspenzije kod zdravih životinja snižava glikemiju sa 5.74 ± 0.38 na 1.73 ± 1.14 mmol/L ($E_0-E_{max}=4.01$ mmol/L) što predstavlja smanjenje od 69%, a kod životinja obolelih od dijabetesa sa 23.3 ± 1.97 na 14.68 ± 11.61 mmol/L ($E_0-E_{max}=8.62$ mmol/L), odnosno za 37%.

Mikroinkapsulirana formulacija gliklazida kod zdravih životinja rezultirala je u sniženju glikemije sa 5.74 ± 0.81 na 2.82 ± 0.51 mmol/L ($E_0-E_{max}=2.92$ mmol/L) tj. za 51%, dok je kod životinja obolelih od dijabetesa hipoglikemijski efekat bio veći i iznosio je 67%, sa smanjenjem sa 27.71 ± 4.12 na 8.88 ± 7.64 mmol/L ($E_0-E_{max}=18.82$ mmol/L).

Dodatak holne kiseline gliklazidu aplikovanom u vidu suspenzije je kod zdravih životinja imao za posledicu smanjenje koncentracije glukoze u krvi sa 5.64 ± 0.71 na

3.00±0.81 mmol/L ($E_0-E_{max}=2.64$ mmol/L) tj. za 46%, a kod životinja obolelih od dijabetesa sa 32.51±8.64 na 25.3±10.56 mmol/L ($E_0-E_{max}=7.2$ mmol/L) tj. za 30%.

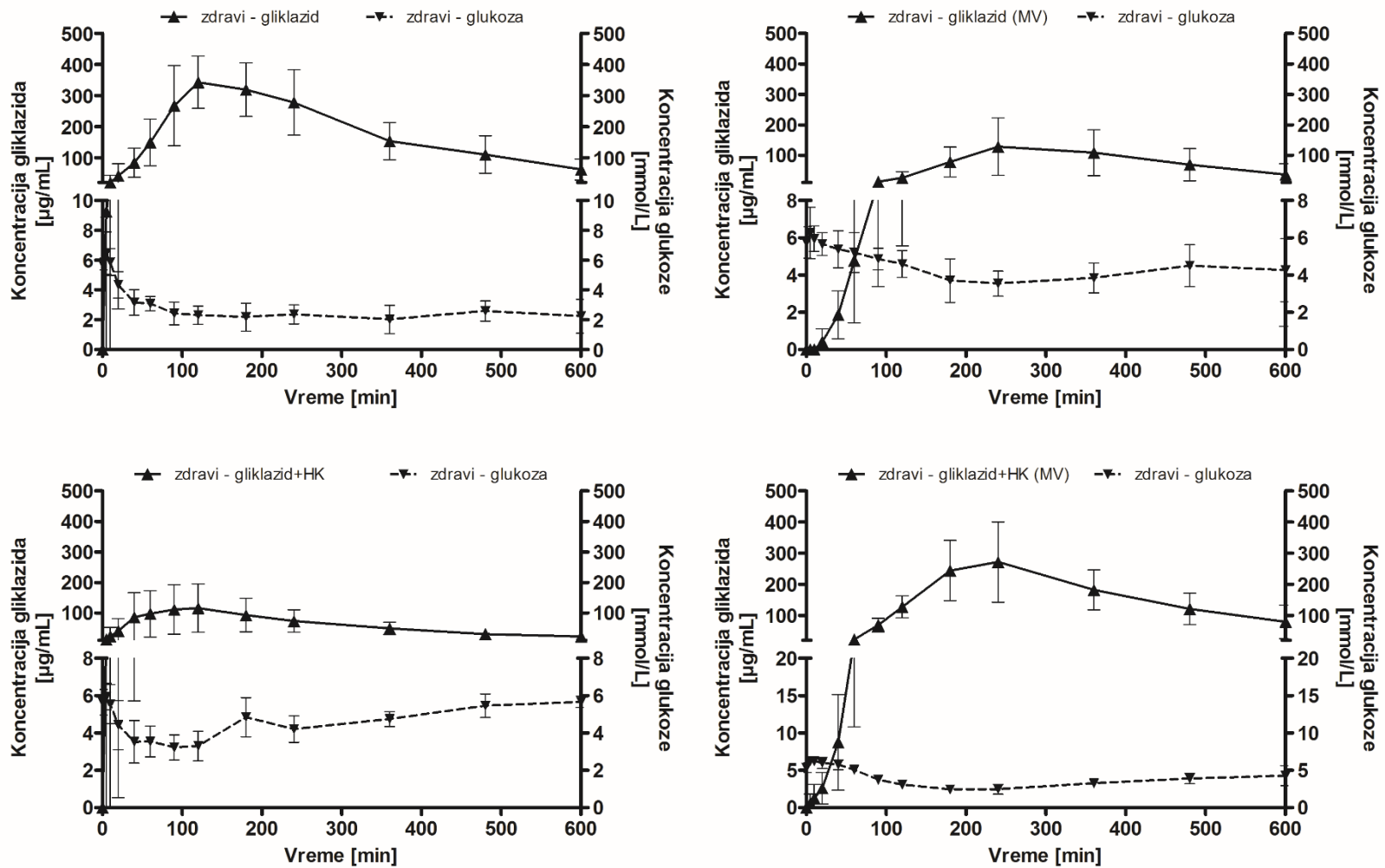
Kada je gliklazid u kombinaciji sa holnom kiselinom primenjen u vidu alginatnih mikrovezikula, kod zdravih životinja je došlo do smanjenja glikemije sa sa 5.32±0.64 na 2.21±0.89 mmol/L ($E_0-E_{max}=3.12$ mmol/L) odnosno za 58%, dok je kod životinja obolelih od dijabetesa uočeno smanjenje glikemije od 25%, sa 32.53±1.41 na 24.43±5.76 mmol/L ($E_0-E_{max}=8.1$ mmol/L).

5.4 Veza koncentracije gliklazida i nivoa glukoze u krvi

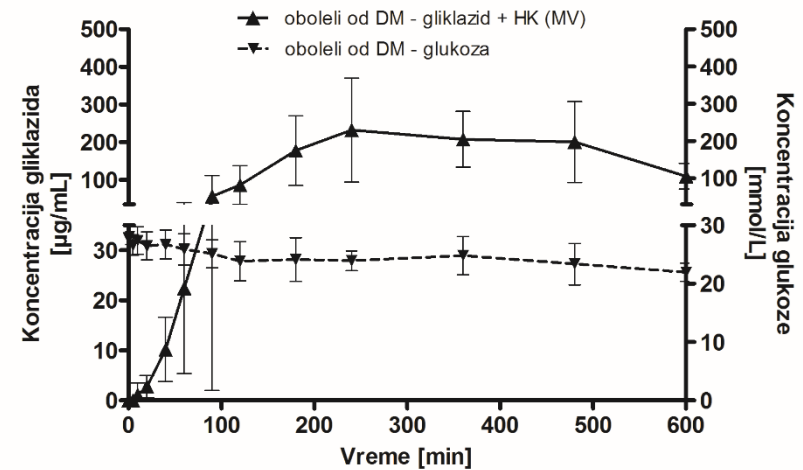
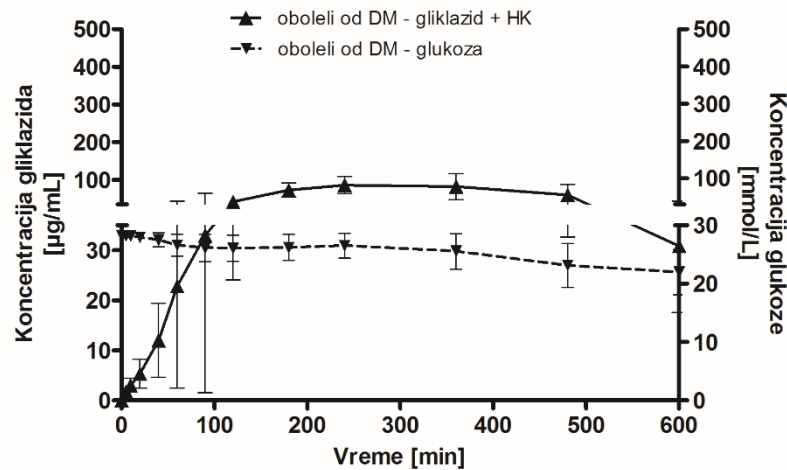
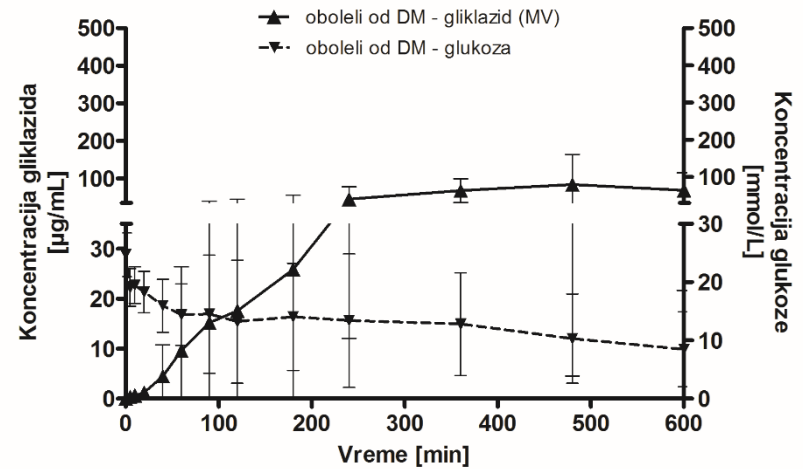
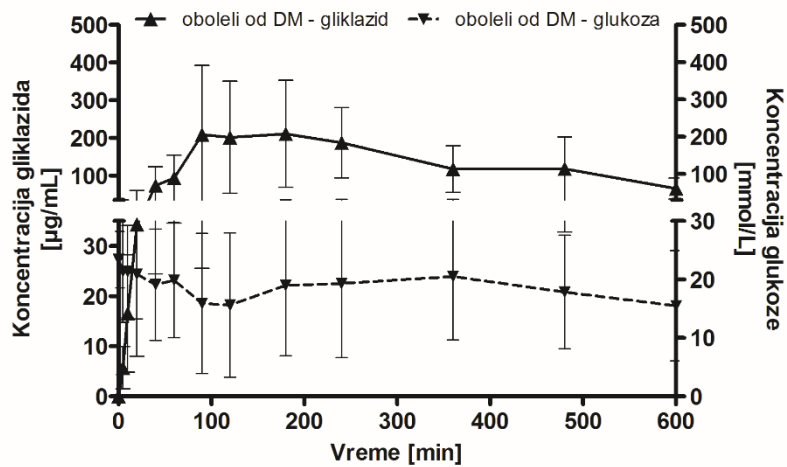
Grafikoni 18 i 19 prikazuju promenu koncentracije gliklazida nakon njegove peroralne aplikacije u različitim formulacijama u jedinici vremena kod zdravih, odnosno životinja obolelih od dijabetesa uporedo sa prikazom promene koncentracije glukoze u krvi u jedinici vremena. Kod zdravih životinja jasno se uočava da se pad koncentracije glukoze u krvi podudara sa intervalima povišenih koncentracija gliklazida. Efekat gliklazida primenjenog u obliku suspenzije traje 90 minuta, dok u grupi koja je primila gliklazid u formulaciji mikrovezikula traje 180 minuta. Tretman zdravih životinja gliklazidom u kombinaciji sa holnom kiselinom rezultirao je padom glikemije u trajanju od 40 minuta, dok je mikroinkapsulirana kombinacija gliklazida i holne kiseline imala za posledicu produžen hipoglikemijski efekat u trajanju od 180 minuta.

Kod životinja obolelih od dijabetesa smanjenje glikemije se takođe podudara sa periodom viših koncentracija gliklazida. Kao kod zdravih životinja, pad glikemije kod životinja koje su primile gliklazid u obliku suspenzije traje 90 minuta, dok je mikroinkapsulacija gliklazida rezultirala u njegovom kontinuiranom i produženom

hipoglikemijskom dejstvu do dostizanja maksimalnih koncentracija gliklazida između 6h i 8h od unete doze, nakon čega je glikemija i dalje blago nastavila da se smanjuje. Dodatak holne kiseline gliklazidu, bez obzira na to da li je kombinacija bila primenjena u vidu suspenzije ili u vidu alginatnih mikrovezikula, takođe je doveo do produženja blagog hipoglikemijskog dejstva. Tako je u slučaju primenjene neinkapsulirane formulacije gliklazida i holne kiseline glikemija neznatno opadala sa porastom koncentracija gliklazida do maksimalnog sniženja glikemije postignutog između 3h i 5h nakon unete doze, nakon čega je uprkos smanjenju koncentracije gliklazida, glikemija nastavila sa blagim padom. Slično tome, nakon administracije mikroinkapsulirane formulacije gliklazida i holne kiseline, došlo je do blagog pada glikemije sa porastom koncentracije gliklazida do dostizanja maksimalnog sniženja glikemije između 3h i 5h od unete doze, posle čega je glikemija i dalje nastavila sa blagim opadanjem.



Grafikon 18. Uporedni prikaz promene koncentracije glukoze u krvi (mmol/L) u vremenu sa promenom koncentracije gliklazida ($\mu\text{g/mL}$) u vremenu nakon peroralne aplikacije gliklazida (40 mg/kg) u različitim formulacijama kod zdravih životinja. Podaci su prikazani kao sr. vrednost $\pm\text{SD}$ ($n=6$).



Grafikon 19. Uporedni prikaz promene koncentracije glukoze u krvi (mmol/L) u vremenu sa promenom koncentracije gliklazida ($\mu\text{g/mL}$) u vremenu nakon peroralne aplikacije gliklazida (40 mg/kg) u različitim formulacijama kod životinja obolelih od dijabetesa. Podaci su prikazani kao sr. vrednost \pm SD (n=6).

6 DISKUSIJA

Analizom farmakokinetičkih parametara različitih formulacija gliklazida i njihovih hipoglikemijskih efekata kod zdravih i pacova obolelih od dijabetesa izazvanog primenom aloksana, utvrđeno je da dijabetes mellitus kao i različite formulacije gliklazida menjaju njegove farmakokinetičke karakteristike i efekat promena vrednosti koncentracija glukoze u krvi.

Nezavisno od primenjene formulacije gliklazida, kod životinja obolelih od dijabetesa zabeležene su niže vrednosti maksimalnih koncentracija gliklazida (C_{max}) i njihovo sporije postizanje (T_{max}), što može biti posledica većeg stepena presistemske eliminacije leka (77) ili usporene peristaltike creva (78) kod životinja obolelih od dijabetesa. Takođe, životinje obolele od dijabetesa su imale produženo vreme eliminacije ($t_{1/2}$) gliklazida u odnosu na zdrave, bez obzira na njegovu formulaciju.

Uočeno je da vrsta primenjene formulacije gliklazida značajno utiče na stepen njegove apsorpcije. Mikroinkapsulacija gliklazida imala je za posledicu smanjenje njegovih koncentracija u serumu te smanjenje njegove apsorpcije i kod zdravih i kod životinja obolelih od dijabetesa u odnosu na izmerene koncentracije gliklazida aplikovanog peroralnim putem u vidu suspenzije. Međutim, dodatak holne kiseline u alginatnu mikrovezikularnu formulaciju gliklazida doveo je do značajnog povećanja njegove apsorpcije i izmerenih koncentracija u serumu, dok dodatak holne kiseline aplikovanog gliklazidu u suspenziji nije imao isti efekat. Mooranian i saradnici (74) su pokazali da mikroinkapsulirana formulacija gliklazida u kombinaciji sa holnom kiselinom ima bolji profil oslobađanja nego neinkapsulirana kombinacija gliklazida i holne kiseline, i da se najviša efikasnost oslobađanja postiže kada je pH vrednost

medijuma visoka (pH 7.8), što odgovara uslovima u distalnim delovima crevnog trakta. S obzirom na činjenicu da su je u našem eksperimentu primenjen gliklazid u suspenziji rezultirao najvišem stepenu apsorpcije, a mikroenkapsulirani gliklazid bez dodatka holne kiseline u najnižem, može se pretpostaviti da ciljano oslobađanje gliklazida u distalnim delovima crevnog trakta smanjuje njegovu apsorpciju.

Niske koncentracije gliklazida i njegova smanjena apsorpcija nakon alginatne mikroenkapsulacije mogu se objasniti time da se optimalna apsorpcija gliklazida odvija u proksimalnim (npr duodenum), a ne u distalnim delu crevnog trakta (npr. Ileum ili kolon). Ovde utvrđeno smanjenje apsorpcije gliklazida kada je u kombinaciji sa holnom kiselinom primenjen u obliku suspenzije je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima koja su pokazala da derivat holne kiseline, polusintetička monoketoholna kiselina (MKC), smanjuje prodor gliklazida kroz crevnu barijeru i njegovu apsorpciju nakon peroralne primene kod pacova sa T1DM izazvim aloksanom (79). Takođe, još jedno istraživanje uticaja žučnih kiselina na prodor gliklazida kroz crevnu barijeru je pokazalo da metabolit holne kiseline mehanizmom kompetitivne inhibicije MRP2 i MRP3 transportera inhibiše apsorpciju gliklazida (76, 80).

Kod pacova obolelih od dijabetesa utvrđena je smanjena apsorpcija gliklazida primenjenog u obliku suspenzije u kombinaciji sa holnom kiselinom. Ovo može biti posledica modulacije homeostaze žučnih kiselina usled dodatka holne kiseline, jer je poznato da gliklazid podleže hepatickoj recirkulaciji (81). U tom smislu, pokazano je da kod pacova kod kojih je DM indukovano streptozotocinom (82) kao i kod onih sa aloksanom (83) dolazi do povećanja sinteze holne kiseline odnosno njene jonizovane forme i sveukupnog pula žučnih kiselina, što je za posledicu imalo izmenjene hemijske i fiziološke procese u gastrointestinalnom traktu utičući i na apsorpciju lekova. Smatra se da je interakcija između antidijabetičnih lekova i transporta žučnih kiselina zavisna od korišćene formulacije i pH uslova sredine. Tako je na primer, jedna *ex vivo* studija

pokazala da se transport žučnih kiselina nije razlikovao između zdravih i od dijabetesa obolelih pacova, dok je pH vrednost sredine i debljina vodeno-mukusnog omotača različitih segmenata gastrointestinalnog trakta imala značajan uticaj na transport žučnih kiselina, implicirajući da je transport lekova kroz biološke membrane značajnije uslovljen koncentracijama žučnih kiselina u crevima, u smislu potencijala formiranja micela, u gornjim nego u donjim delovima gastrointestinalnog trakta (84).

Uprkos činjenici da je mikroinkapsulacija gliklazida rezultirala u njegovim smanjenim koncentracijama u serumu u odnosu na gliklazid primenjen u vidu suspenzije, ova alginatna formulacija gliklazida je ispoljila značajno hipoglikemijsko dejstvo kod životinja obolelih od dijabetesa.

Koncentracija glukoze u krvi kod životinja obolelih od dijabetesa nakon peroralne primene alginatnih mikrovezikula gliklazida bila je statistički značajno smanjena u poređenju sa netretiranim kontrolama, dok je sa primenom gliklazida u obliku suspenzije došlo do pada glikemije koji nije bio statistički značajan u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

Činjenica da se mikroinkapsulirana formulacija gliklazida odlikovala smanjenom apsorpcijom gliklazida i statistički značajnim hipoglikemijskim uticajem, za razliku od aplikovanog gliklazida u obliku suspenzije kod koga je apsorpcija bila povećana, ali je hipoglikemijski efekat izostao, svedoči o tome da hipoglikemijsko dejstvo gliklazida nije povezano sa njegovom koncentracijom. Takođe, može se zaključiti da hipoglikemijski efekti gliklazida nisu dozno-zavisni niti su bili pod uticajem procesa mikroinkapsulacije ili dodatka holne kiseline. Iako dodatak holne kiseline gliklazidu primenjenom u suspenziji ili u vidu alginatnih mikrovezikula nije rezultirao u statistički značajnim promenama u koncentraciji glukoze u krvi, doveo je do značajnog povećanja peroralne apsorpcije gliklazida i njegovim povišenim koncentracijama u serumu.

Izostanak hipoglikemijskog efekta gliklazida primenjenog u vidu suspenzije je već bio pokazan u prethodnim eksperimentima iako je ovde primenjena doza gliklazida od 40 mg/kg visa od koncentracija (20-25 mg/kg) korišćenih u navedenim studijama (37, 76, 85-87). Razlog primene viših doza gliklazida u ovoj studiji leži nameri da testiramo dozu gliklazida za koju je pokazan dozno-zavisni hipoglikemijski efekat gliklazida na mišićne ćelije, nezavisno od insulina (88).

Nasuprot našim rezultatima, jedna studija je pokazala izostanak hipoglikemijskog dejstva nakon primene mikrovezikula gliklazida kod istog eksperimentalnog modela DM, dok je dodatak tauroholne kiseline u mikrovezikularnu formulaciju gliklazida rezultirao sinergističkim hipoglikemijskim efektima (89), što nije bio slučaj nakon dodatka holne kiseline u našem eksperimentu, uprkos povećanoj apsorpciji gliklazida u ovoj kombinovanoj mikroinkapsuliranoj formulaciji. Ovo ukazuje na postojanje razlike između različitih žučnih kiselina u smislu ispoljavanja sinergističkih hipoglikemijskih efekata kada se koriste u kombinaciji sa mikroinkapsuliranim gliklazidom.

S obzirom da su prethodni eksperimenti karakterizacije alginatnih mikrovezikula pokazali da dodatak holne kiseline poboljšava ciljano oslobađanje gliklazida (74, 90), iznenađujući je izostanak sinergističkog hipoglikemijskog efekta mikrovezikularne formulacije gliklazida u kombinaciji sa holnom kiselinom kod pacova obolelih od dijabetesa. Potencijalni razlozi za ovaj fenomen mogu biti objašnjeni eventualnim poremećajem apsorpcije gliklazida usled formiranja velikih kompleksnih molekula sa holnom kiselinom ili izmenjenim efektima gliklazida na sistemskom nivou ili na nivou creva, usled lokalnog uticaja holne kiseline na sredinu u gastrointestinalnom traktu ili pak interakcija između metabolite crevne flore i žučnih kiselina. Jasno se zaključuje da ovi efekti hipoglikemijskog dejstva gliklazida nisu posledica procesa mikroinkapsulacije, jer primena ni inkapsulirane ni neinkapsulirane formulacije

gliklazida u kombinaciji sa holnom kiselinom nije rezultirala u sniženju koncentracije glukoze u krvi. Međutim, mikroinkapsulacija gliklazida kod životinja obolelih od dijabetesa dovela je do najizraženijeg hipoglikemijskog efekta.

7 ZAKLJUČAK

1. Mikroinkapsulacija gliklazida (40 mg/kg) rezultuje u smanjenju njegovih koncentracija u serumu i kod zdravih i kod pacova soja Wistar obolelih od dijabetesa indukovano aloksanom, i dovodi do njegove smanjene apsorpcije iz digestivnog trakta u odnosu na peroralno primenjen gliklazid u obliku suspenzije.
2. Smanjenje apsorpcije i koncentracije gliklazida u serumu nije imalo efekta na efikasnost mikroinkapsulirane alginatne formulacije gliklazida u regulaciji koncentracije glukoze u krvi, koja je ispoljila značajno hipoglikemijsko dejstvo kod pacova obolelih od dijabetesa, implicirajući da hipoglikemijsko dejstvo gliklazida nije povezano sa njegovom koncentracijom, niti sa procesom mikroinkapsulacije.
3. Dodatak holne kiseline, prirodne žučne kiseline, u mikrovezikulnoj formulaciji gliklazida imao je za posledicu povećanje apsorpcije i povećanje koncentracije gliklazida kod pacova obolelih od dijabetesa, ali je uticao na dejstvo gliklazida u regulaciji koncentracije glukoze u krvi, smanjujući njegovo hipoglikemijsko dejstvo.
4. Alginatne mikrovezikule predstavljaju novu vrstu nosača lekova koji usklađivanjem sastava, kao i odgovarajućih uslova proizvodnje sa fizičko-hemijskim, farmakodinamičkim i farmakokinetičkim osobinama aktivne supstance u kombinaciji sa sinergističkim efektima žučnih kiselina mogu modifikovati njeno mesto i vreme oslobađanja radi optimizacije efikasnosti lekova.

8 LITERATURA

1. Martinez MN, Amidon GL. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *J Clin Pharmacol*. 2002;42(6):620-43.
2. Chillistone S, Hardman JG. Factors affecting drug absorption and distribution. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. 2017;18(7):335-9..
3. Shekhawat PB, Pokharkar VB. Understanding peroral absorption: regulatory aspects and contemporary approaches to tackling solubility and permeability hurdles. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2017;7(3):260-80.
4. Estudante M, Morais JG, Soveral G, Benet LZ. Intestinal drug transporters: an overview. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(10):1340-56.
5. Thaiss CA, Levy M, Grosheva I, Zheng D, Soffer E, Blacher E, et al. Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection. *Science*. 2018; 359(6382):1376-1383.
6. Dostalek M, Akhlaghi F, Puzanovova. Effect of diabetes mellitus on pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drugs. *Clin Pharmacokinet*. 2012;51(8):481-99.
7. Khadka P, Ro J, Kim H, Kim I, Kim JT, Kim H, et al. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. *Asian journal of pharmaceutical sciences*. 2014;9(6):304-16.
8. Ahmad M, Madni A, Usman M, Munir A, Akhtar N, Khan HS. Pharmaceutical micro encapsulation technology for development of controlled release drug delivery systems. *International Journal of Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*. 2011;75(1):384-7.
9. Singh M, Hemant K, Ram M, Shivakumar HJ. Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Research in pharmaceutical sciences*. 2010;5(2):65-77.
10. Vilos C, Velasquez LA. Therapeutic strategies based on polymeric microparticles. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:672-760.
11. Čalija BR. Funkcionalnost hitozana u formulaciji alginat-hitozan mikročestica kao nosača za nesteroidne antiinflamatorne lekove. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet. 2013.
12. Jyothi NVN, Prasanna PM, Sakarkar SN, Prabha KS, Ramaiah PS, Srawan GY. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *J Microencapsul*. 2010;27(3):187-97.
13. Chowdary KP, Rao YS. Mucoadhesive microspheres for controlled drug delivery. *Biol Pharm Bull*. 2004;27(11):1717-24.
14. Pal D, Nayak AK. Development, optimization, and anti-diabetic activity of gliclazide-loaded alginate–methyl cellulose mucoadhesive microcapsules. *AAPS PharmSciTech*. 2011;12(4):1431-41.
15. Paredes Juárez GA, Spasojevic M, Faas MM, de Vos P. Immunological and technical considerations in application of alginate-based microencapsulation systems. *Front Bioeng Biotechnol*. 2014;2:26.

16. Mitrović DD, Stojkovska JJ, Obradović BM. Controlled swelling and degradation studies of alginate microbeads in dilute sodium citrate solutions. *Hem. ind.* 2010;64(4):253-63.
17. Pawar SN, Edgar KJ. Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials.* 2012;33(11):3279-305.
18. Sosnik AJ. Alginate particles as platform for drug delivery by the oral route: state-of-the-art. Sosnik A. Alginate particles as platform for drug delivery by the oral route: state-of-the-art. *ISRN pharmaceuticals.* 2014; 2014:1-17.
19. Goh CH, Heng PWS, Chan LW. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. Goh CH, Heng PW, Chan LW. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers.* 2012; 88(1):1-12.
20. Segale L, Giovannelli L, Mannina P, Pattarino F. Calcium alginate and calcium alginate-chitosan beads containing celecoxib solubilized in a self-emulsifying phase. *Scientifica.* 2016;2016:1-8.
21. Resztak M, Hermann TW, Sawicki W, Danielak DZ. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Gliclazide from Immediate and Modified Release Formulation Tablets in Rats. *Iran J Pharm Res.* 2014; 13(1): 29–37.
22. Singh AK, Singh RJE. Is gliclazide a sulfonylurea with difference? A review in 2016. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2016;9(6):839-51.
23. Lang V, Light PE. The molecular mechanisms and pharmacotherapy of ATP-sensitive potassium channel gene mutations underlying neonatal diabetes. *Pharmacogenomics and personalized medicine.* 2010;3:145-61.
24. Sarkar A, Tiwari A, Bhasin PS, Mitra M. Pharmacological and pharmaceutical profile of gliclazide: a review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* 2011;1(09):11-9.
25. Kalra S, Aamir AH, Raza A, Das AK, Azad Khan AK, Shrestha D, et al. Place of sulfonylureas in the management of type 2 diabetes mellitus in South Asia: A consensus statement. *Indian journal of endocrinology and metabolism.* 2015;19(5):577-96.
26. CADTH Rapid Response Reports. Glyburide, Gliclazide or Glimepiride for Elderly Patients with Type 2 Diabetes: A Review of the Clinical Effectiveness and Safety - An Update. Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health. Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health.; 2015.
27. World Health Organization. WHO model lists of essential medicines. 18th edition. 2013.
28. Mikov M, Đanić M, Pavlović N, Stanimirov B, Goločorbin-Kon S, Stankov K, et al. Potential applications of gliclazide in treating type 1 diabetes mellitus: formulation with bile acids and probiotics. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2018;43(3):269-280.
29. Aguilar-Bryan L, Bryan J. Neonatal diabetes mellitus. *Endocrine reviews.* 2008;29(3):265-91.
30. Brunerova L, Rahelić D, Ceriello A, Broz J. Use of oral antidiabetic drugs in the treatment of maturity-onset diabetes of the young: A mini review. *Diabetes Metab Res Rev.* 2018;34(1):e2940.

31. Spaeth JM, Gupte M, Perelis M, Yang Y-P, Cyphert H, Guo S, et al. Defining a Novel Role for the PDX1 Transcription Factor in Islet β Cell Maturation and Proliferation During Weaning. *Diabetes*. 2017;66(11):2830-2839.
32. Del Guerra S, D'Aleo V, Lupi R, Masini M, Bugliani M, Boggi U, et al. Effects of exposure of human islet beta-cells to normal and high glucose levels with or without gliclazide or glibenclamide. *Diabetes Metab*. 2009;35(4):293-8.
33. Nakano N, Miyazawa N, Sakurai T, Kizaki T, Kimoto K, Takahashi K, et al. Gliclazide inhibits proliferation but stimulates differentiation of white and brown adipocytes. *J Biochem*. 2007;142(5):639-45.
34. Del Guerra S, Grupillo M, Masini M, Lupi R, Bugliani M, Torri S, et al. Gliclazide protects human islet beta-cells from apoptosis induced by intermittent high glucose. *Diabetes Metab Res Rev*. 2007;23(3):234-8.
35. Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress—a concise review. *Saudi Pharm J*. 2016;24(5):547-553.
36. Jennings PE. Vascular benefits of gliclazide beyond glycemic control. *Metabolism*. 2000;49(10):17-20.
37. Al-Salami H, Butt G, Fawcett JP, Tucker IG, Golocorbin-Kon S, Mikov M, et al. Probiotic treatment reduces blood glucose levels and increases systemic absorption of gliclazide in diabetic rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2008;33(2):101-6.
38. Al-Salami H, Butt G, Tucker I, Golocorbin-Kon S, Mikov M. Probiotics decreased the bioavailability of the bile acid analog, monoketocholic acid, when coadministered with gliclazide, in healthy but not diabetic rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2012;37(2):99-108.
39. Kuipers F, Bloks VW, Groen AK. Beyond intestinal soap—bile acids in metabolic control. *Nature Reviews Endocrinology*. 2014;10:488.
40. Šarenac TM, Mikov M. Bile Acid Synthesis: From Nature to the Chemical Modification and Synthesis and Their Applications as Drugs and Nutrients. *Front Pharmacol*. 2018;9:939-961.
41. Dawson PA. Bile Formation and the Enterohepatic Circulation. In: Said HM, editor. *Physiology of the Gastrointestinal Tract (Sixth Edition)*: Academic Press; 2018. p. 931-56.
42. Anwer MS, Stieger B. Sodium-dependent bile salt transporters of the SLC10A transporter family: more than solute transporters. *Pflugers Arch*. 2014;466(1):77-89.
43. Monte MJ, Marin JJ, Antelo A, Vazquez-Tato J. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol*. 2009;15(7):804-16.
44. Poša M, Kevrešan S, Mikov M, Ćirin-Novta V, Kuhajda K. Effect of cholic acid and its keto derivatives on the analgesic action of lidocaine and associated biochemical parameters in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2007;32(2):109-17.
45. Kuhre RE, Albrechtsen NJW, Larsen O, Jepsen SL, Balk-Møller E, Andersen DB, et al. Bile acids are important direct and indirect regulators of the secretion of appetite-and metabolism-regulating hormones from the gut and pancreas. *Mol Metab*. 2018;11:84-95.

46. Hofmann AF, Eckmann L. How bile acids confer gut mucosal protection against bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(12):4333-4.
47. Fiorucci S, Biagioli M, Zampella A, Distrutti E. Bile acids activated receptors regulate innate immunity. *Front Immunology* 2018;9:1853-61.
48. Amaral JD, Viana RJ, Ramalho RM, Steer CJ, Rodrigues CM. Bile acids: regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid. *J Lipid Res*. 2009;50(9):1721-34.
49. González-Regueiro JA, Moreno-Castañeda L, Uribe M, Chávez-Tapia NC. The role of bile acids in glucose metabolism and their relation with diabetes. *Ann Hepatol*. 2018;16(S1):15-20.
50. Trauner M, Claudel T, Fickert P, Moustafa T, Wagner M. Bile acids as regulators of hepatic lipid and glucose metabolism. *Dig Dis*. 2010;28(1):220-4.
51. Shapiro H, Kolodziejczyk AA, Halstuch D, Elinav EJ. Bile acids in glucose metabolism in health and disease. *J Exp Med*. 2018;215(2):383-96.
52. Yamagata K, Daitoku H, Shimamoto Y, Matsuzaki H, Hirota K, Ishida J, et al. Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via SHP-mediated repression of HNF-4 and Foxo1. *J Biol Chem*. 2004;279(22):23158-65.
53. Duran-Sandoval D, Mautino G, Martin G, Percevault F, Barbier O, Fruchart J-C, et al. Glucose regulates the expression of the farnesoid X receptor in liver. *Diabetes*. 2004;53(4):890-8.
54. Watanabe M, Houten SM, Matakai C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, et al. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature*. 2006;439(7075):484-9.
55. Duboc H, Taché Y, Hofmann AF, Disease L. The bile acid TGR5 membrane receptor: from basic research to clinical application. *Dig Liver Dis*. 2014;46(4):302-12.
56. Kumar DP, Rajagopal S, Mahavadi S, Mirshahi F, Grider JR, Murthy KS, et al. Activation of transmembrane bile acid receptor TGR5 stimulates insulin secretion in pancreatic β cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;427(3):600-5.
57. American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. 2015;38(Supplement 1):S8-S16.
58. Cho N, Shaw J, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes J, Ohlrogge A, et al. IDF Diabetes Atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018;138:271-81.
59. Institut za javno zdravlje Srbije Dr Milan Jovanovic Batut. Batut. Izveštaj br. 11. Incidencija i mortalitet od dijabetesa u Srbiji. 2016; ISSN (Online) 2560-466X.
60. Atkinson MA. The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(11):a007641.
61. Marín-Peñalver JJ, Martín-Timón I, Sevillano-Collantes C, del Cañizo-Gómez F. Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 2016;7(17):354-395.
62. Pinhas-Hamiel O, Zeitler P. Acute and chronic complications of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *Lancet*. 2007;369(9575):1823-1831.

63. Nathan DM, care DERGJD. The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: overview. *Diabetes Care*. 2014;37(1):9-16.
64. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HAWJNEJoM. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine*. 2008;359(15):1577-89.
65. American Diabetes Association. 8. Pharmacologic approaches to glycemic treatment: standards of medical care in diabetes—2018. *Diabetes Care*. 2018;41(Supplement 1):S73-S85.
66. Chaudhury A, Duvoor C, Dendi R, Sena V, Kraleti S, Chada A, et al. Clinical review of antidiabetic drugs: Implications for type 2 diabetes mellitus management. *Front Endocrinol*. 2017;8:6.
67. Weiss M, Steiner DF, Philipson LH. Insulin biosynthesis, secretion, structure, and structure-activity relationships. NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health. 2014; assessed from: www.endotext.org.
68. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*. 2017;60(9):1577-85.
69. Riddle MC. Modern sulfonylureas: dangerous or wrongly accused? *Diabetes Care*. 2017;40(5):629-31.
70. Simpson SH, Lee J, Choi S, Vandermeer B, Abdelmoneim AS, Featherstone TR, et al. Mortality risk among sulfonylureas: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015;3(1):43-51.
71. Bonadonna R, Borghi C, Consoli A, Volpe M. Novel antidiabetic drugs and cardiovascular risk: primum non nocere. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2016;26(9):759-66.
72. Rao Kondapally Seshasai S, Kaptoge S, Thompson A, Di Angelantonio E, Gao P, Sarwar N, et al. Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death. *The New England journal of medicine*. 2011;364(9):829-41.
73. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, et al. Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(22):2117-28.
74. Mooranian A, Negrulj R, Mathavan S, Martinez J, Sciarretta J, Chen-Tan N, et al. Stability and release kinetics of an advanced gliclazide-cholic acid formulation: the use of artificial-cell microencapsulation in slow release targeted oral delivery of antidiabetics. *J Pharm Innov*. 2014;9(2):150-7.
75. Al-Awar A, Kupai K, Veszelka M, Szűcs G, Attieh Z, Murlasits Z, et al. Experimental diabetes mellitus in different animal models. *J Diabetes Res*. 2016;2016:905-1006.
76. Mikov M, Al-Salami H, Golocorbin-Kon S, Skrbic R, Raskovic A, Paul Fawcett J. The influence of 3 α ,7 α -dihydroxy-12-keto-5 β -cholanate on gliclazide pharmacokinetics and glucose levels in a rat model of diabetes. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2008;33(3):137-42.

77. Stepensky D, Friedman M, Raz I, Hoffman A. Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of the glucose-lowering effect of metformin in diabetic rats reveals first-pass pharmacodynamic effect. *Drug Metab Dispos.* 2002;30(8):861-8.
78. Marathe PH, Wen Y, Norton J, Greene DS, Barbhaiya RH, Wilding IR. Effect of altered gastric emptying and gastrointestinal motility on metformin absorption. *British journal of clinical pharmacology.* 2000;50(4):325-32.
79. Al-Salami H, Butt G, Tucker I, Mikov M. Influence of the semisynthetic bile acid MKC on the ileal permeation of gliclazide in vitro in healthy and diabetic rats treated with probiotics. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology.* 2008;30(2):107-13.
80. Al-Salami H, Butt G, Tucker I, Mikov M. Influence of the semisynthetic bile acid (MKC) on the ileal permeation of gliclazide in healthy and diabetic rats. *Pharmacol Rep.* 2008;60(4):532-41.
81. Davis TM, Daly F, Walsh JP, Ilett KF, Beilby JP, Dusci LJ, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of gliclazide in Caucasians and Australian Aborigines with type 2 diabetes. *British journal of clinical pharmacology.* 2000;49(3):223-30.
82. Siow Y, Schurr A, Vitale GC. Diabetes-induced bile acid composition changes in rat bile determined by high performance liquid chromatography. *Life sciences.* 1991;49(18):1301-8.
83. Nervi FO, Severin CH, Valdivieso VD. Bile acid pool changes and regulation of cholates synthesis in experimental diabetes. *Biochimica et biophysica acta.* 1978;529(2):212-23.
84. Thomson AB. Uptake of bile acids into rat intestine. Effect of diabetes mellitus. *Diabetes.* 1983;32(10):900-7.
85. Al-Salami H, Butt G, Tucker I, Skrbic R, Golocorbin-Kon S, Mikov M. Probiotic Pre-treatment Reduces Gliclazide Permeation (ex vivo) in Healthy Rats but Increases It in Diabetic Rats to the Level Seen in Untreated Healthy Rats. *Archives of drug information.* 2008;1(1):35-41.
86. Al-Salami H, Butt G, Tucker I, Fawcett PJ, Golo-Corbin-Kon S, Mikov I, et al. Gliclazide reduces MKC intestinal transport in healthy but not diabetic rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2009;34(1):43-50.
87. Stetinova V, Kvetina J, Pastera J, Polaskova A, Prazakova M. Gliclazide: pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships in rats. *Biopharm Drug Dispos.* 2007;28(5):241-8.
88. Tsiani E, Ramlal T, Leiter LA, Klip A, Fantus IG. Stimulation of glucose uptake and increased plasma membrane content of glucose transporters in L6 skeletal muscle cells by the sulfonylureas gliclazide and glyburide. *Endocrinology.* 1995;136(6):2505-12.
89. Mathavan S, Chen-Tan N, Arfuso F, Al-Salami H. A comprehensive study of novel microcapsules incorporating gliclazide and a permeation enhancing bile acid: hypoglycemic effect in an animal model of Type-1 diabetes. *Drug Delivery.* 2016;23(8):2869-80.
90. Mooranian A, Negrulj R, Mathavan S, Martinez J, Sciarretta J, Chen-Tan N, et al. An advanced microencapsulated system: a platform for optimized oral delivery of antidiabetic drug-bile acid formulations. *Pharmaceutical Development and Technology.* 2015;20(6):702-9.