



UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
DOKTORSKE STUDIJE KLINIČKE MEDICINE

Određivanje tkivne farmakokinetike levofloksacina i daidzeina primenom mikrodijalizne metode

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Prof. dr Nebojša Stilinović

Kandidat: Asist. dr Ana Tomas Petrović

Prof. dr Pavol Benjo

Novi Sad, 2021.



UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
DOKTORSKE STUDIJE KLINIČKE MEDICINE

**Određivanje tkivne farmakokinetike
levofloksacina i daidzeina primenom
mikrodijalizne metode**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Prof. dr Nebojša Stilinović

Kandidat: Asist. dr AnaTomas Petrović

Prof. dr Pavol Benjo

Novi Sad, 2021.

**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ НОВИ САД**

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	Ana Tomas Petrović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Nebojša Stilinović Prof. dr Pavol Benjo
Naslov rada: NR	Određivanje tkivne farmakokinetike levofloksacina i daidzeina primenom mikrodijalizne metode
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2021.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja 7/ stranica 150 / tabela 35/ slika 6 /shema 9/ grafikona 20/ referenci 248/ priloga 4)
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Farmakologija sa toksikologijom i kliničkom farmakologijom
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	fluorohinoloni; levofloksacin; izoflavoni; farmakokinetika; mikrodijaliza; lekovima

	izazvane nuspojave i neželjene reakcije; antibakterijski lekovi; interakcije lekova
UDK	615.281.015.1/4 543.544.5
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Doktorska disertacija posvećena je implementaciji mikrodijalizne metode za <i>in vivo</i> uzorkovanje levofloksacina i daidzeina iz intersticijalne tečnosti poprečno-prugastog mišića, i ispitivanju interakcije ove dve supstance u cilju povećanja terapijske efikasnosti levofloksacina. Takođe je ispitana i bezbednost konkomitantne primene levofloksacina i daidzeina. Uticaj daidzeina na prodor levofloksacina pasivnom difuzijom ispitan je PAMPA metodom. Na animalnom modelu, nakon oralne primene levofloksacina i daidzeina pojedinačno i u kombinaciji određene su koncentracije navedenih supstanci u plazmi, intersticijalnoj tečnosti mišića buta primenom mikrodijalizne metode i u homogenatima tkiva. Razvijena je metoda visokosenzitivne tečne hromatografije za detekciju obe supstance u plazmi i uzorcima dijalizata. Ispitan je uticaj daidzeina na farmakokinetiku levofloksacina u plazmi, mišiću, bubregu, jetri, plućima, mozgu, urinu i fecesu. Takođe je ispitan uticaj daidzeina na osetljivost bakterija na levofloksacin, u cilju ispitivanja mogućnosti njegove primenjivosti kao inhibitora efluks pumpi. Interakcija daidzeina i levofloksacina ispitana je na kliničkim izolatima bakterija primenom modifikovane metode šahovske ploče. <i>In silico</i> ispitivanjima određene su interakcije levofloksacina i daidzeina na nivou transportera. Levofloksacin se nakon peroralne primene rapidno distribuiše postićući visoke koncentracije u plazmi i u intersticijumu, sa indeksom distribucije u tkiva od 0,78, ali sa velikim interindividualnim razlikama u vrednostima maksimalnih koncentracija u tkivu. Nakon peroralne primene, uzorkovanja plazme i primene mikrodijalize, pokazano je da se daidzein distribuiše u mišićno tkivo, sa indeksom distribucije u tkiva od 0,35. Daidzein je doveo do</p>

	<p>povećanja slobodnih koncentracija levofloksacina u mišiću, mozgu, smanjio izlučivanje levofloksacina u urin i doveo do povećanja koncentracija levofloksacina u fecesu. Zajednička primena daidzeina i levofloksacina nije imala negativan uticaj na bihemijske i histološke parametre toksičnosti. Nije zabeležen porast vrednosti bihemijskih parametara funkcije jetre i bubrega niti narušavanje tkivne arhitektonike ovih organa. Daidzein je povećao osetljivost testiranih bakterija na levofloksacin što ide u prilog daljim ispitivanjima daidzeina u pravcu razvoja efluks inhibitora sa visokim translacionim potencijalom. Kroz uticaj na farmakokinetiku i osetljivost bakterija na levofloksacin, daidzein povećava vrednosti farmakokinetiko/farmakodinamskih indeksa povezanih sa antibakterijskom aktivnošću fluorohinolona.</p>
<p>Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP</p>	<p>14.09.2017.</p>
<p>Datum odbrane: DO</p>	
<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	

University of Novi Sad
Faculty
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	
Author: AU	Ana Tomas Petrović
Mentor: MN	Prof. dr Nebojša Stilinović Prof. dr Pavol Benjo
Title: TI	Determination of tissue pharmacokinetics of levofloxacin and daidzein by the method of microdialysis
Language of text: LT	srp.
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2021
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Physical description: PD	Number of chapters 7 / pages 150 / pictures 6 / graphs 20 / tables 35 / schemes 9 / references 248 / appendix 4
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Pharmacology, toxicology and clinical pharmacology
Subject, Key words SKW	Fluoroquinolones; Levofloxacin; Isoflavones; Pharmacokinetics; Microdialysis; Drug-Related Side Effects and Adverse Reactions; Anti-Bacterial Agents; Drug Interactions

UC	615.281.015.1/4 543.544.5
Holding data: HD	Library of Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad
Note: N	
Abstract: AB	<p>This doctoral dissertation is dedicated to the implementation of microdialysis method for the <i>in vivo</i> sampling of levofloxacin and daidzein in striated muscle, and to the study of the interaction between these compounds with the aim of increasing therapeutic efficacy of levofloxacin. The safety of concomitant use of levofloxacin and daidzein was also examined. The effect of daidzein on the penetration of levofloxacin by passive diffusion was investigated by the PAMPA method. In an animal model, after oral administration of levofloxacin and daidzein individually and in combination, the concentrations of both substances were determined in plasma, muscle interstitial fluid and in tissue homogenates. A high-performance liquid chromatography method was developed for the detection of levofloxacin and daidzein in plasma, dialysate and tissue samples. The effect of daidzein on the pharmacokinetics of levofloxacin in plasma, muscle, kidney, liver, lung, brain, urine and feces was examined. The effect of daidzein on bacterial susceptibility to levofloxacin was determined to examine its potential use as an efflux pump inhibitor. The interaction of daidzein and levofloxacin was investigated on clinical isolates of bacteria by the modified checkerboard method. Interactions between levofloxacin and daidzein at the transporter level have been studied using <i>in silico</i> methods.</p> <p>Levofloxacin rapidly distributed after oral administration, achieving high plasma and interstitial muscle fluid concentration, with a tissue distribution index of 0.78, but with large interindividual differences in maximum tissue concentrations.</p> <p>Following oral administration, plasma sampling, and microdialysis, daidzein has been shown to distribute into muscle tissue with a tissue distribution index of 0.35. Daidzein led to an increase in the free concentrations of levofloxacin</p>

	<p>in muscle, brain, decreased urinary excretion of levofloxacin and an increase in levofloxacin concentration in feces. Concomitant use of daidzein and levofloxacin did not adversely affect biochemical and histological parameters of toxicity. No increase in the values of biochemical parameters of liver and kidney function or disturbance of the tissue architecture of these organs was observed. Daidzein increased the susceptibility of the tested bacteria to levofloxacin, which supports further studies of daidzein as a promising efflux pump inhibitor with high translation potential. Through its effect on the pharmacokinetics and susceptibility of bacteria to levofloxacin, daidzein increases the pharmacokinetic/ pharmacodynamic index values associated with the antibacterial activity of fluoroquinolones.</p>
<p>Accepted on Senate on: AS</p>	<p>14.09.2017.</p>
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	

Ovu stranicu koristim da se zahvalim svima koji su doprineli da moja doktorska disertacija ugleda svetlo dana.

Najveću, najiskreniju i najdublju zahvalnost dugujem mom mentoru i prijatelju prof. dr Nebojši Stilinoviću što je verovao u mene i podržavao me čak i kada drugi nisu, i učestvovao i podržavao me u svakoj od faza izrade doktorata uključujući i laboratorijski rad. Mentoru prof. dr Pavolu Benju zahvaljujem se na pomoći oko mikrobiološkog dela ispitivanja.

Takođe želim da se zahvalim i prof. dr Ani Sabo i prof. dr Zdenku Tomiću koji su nesebično delili sa mnom iskustvo i znanje iz oblasti farmakokinetike i farmakodinamike antibakterijskih lekova, od kojih je i potekla ideja da se metoda mikrodijalize implementira u našoj laboratoriji. Prof. dr Momiru Mikovu se zahvaljujem kao rukovodiocu projekta 41012 u sklopu kojeg sam dobila priliku da se bavim naukom i u sklopu kojeg je urađena ova doktorska disertacija, kao i na prilici da se preko projekta Medlem Horizon2020 usavršavam u inostranstvu i steknem znanje i iskustvo koje mi je neizmerno koristilo u izradi disertacije. Prof. dr Aleksandru Raškoviću se posebno zahvaljujem na podršci koju mi je pružio u procesu prijave teze. Prof. dr Olgi Horvat zahvalna sam što je još kao mentor na mom diplomskom radu prepoznala moje interesovanje i podržala me da se i dalje bavim naukom.

Zahvaljujem se prof. dr Saši Vukmiroviću na pomoći u izvođenju HPLC analize i interpretaciji rezultata farmakokinetičkih ispitivanja. Doc. dr Nebojši Pavloviću zahvaljujem se na pomoći oko izvođenja in vitro i in silico ispitivanja, i na korisnim savetima i sugestijama tokom rada na disertaciji. Dr Veljku Čučuzu se zahvaljujem na korisnim komentarima tokom pisanja disertacije. Laborantu Slavenu Šuputu zahvaljujem se na pomoći tokom rada u laboratoriji. Zahvaljujem se i svim kolegama sa Zavoda za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju, a posebno dr Milici Paut Kusturici i Jeleni Pašćan na kolegijalnosti i drugarstvu tokom svih godina zajedničkog rada.

Hvala mojim saborcima dr Snežani Bulat i Nebojši Kartaliji, na svim satima koje smo proveli pričajući o problemima koje samo jedan doktorand može i da ima, i da razume. Mojim prijateljima Ivoni i Ceci, Vladi, Jovani, Neveni, Brani, Deji i Andrei hvala na godinama iskrenog prijateljstva uz koje je lakše bilo prebroditi brojne teške situacije sa kojima sam se sretala.

Na kraju, posebno se zahvaljujem mome ocu, bratu i sestri što su imali strpljenja da mi ceo život budu podrška da ostvarim sve što sam zamislila. Mom Vanji hvala što je još od studentskih dana uz mene, i kad je bilo lepo, a posebno kad je bilo teško. Vanja, minimum polovina ovog doktorata je tvoja.

Mama, ovo je za tebe

Ana

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1	Hinoloni	3
1.1.1	Levofloksacin	5
1.1.2	Farmakokinetiko/farmakodinamski parametri fluorohinolona	7
1.1.3	Farmakokinetika antibakterijskih lekova – tehnike određivanja	13
1.3.1	Mikrodijalizna metoda	15
1.3.2	Pregled istraživanja primene mikrodijalize u određivanju tkivne farmakokinetike fluorohinolona	18
1.2	Rezistencija na fluorohinolone	26
1.2.1	Efluks pumpe bakterija	27
1.2.1	Inhibitori efluks pumpe	28
1.2.2	Daidzein	29
2.	CILJEVI I HIPOTEZE	33
3.	MATERIJAL I METODE	34
3.1	Materijal	34
3.1.1	Hemikalije i reagensi	34
3.1.2	Mikrodijalizni sistem	35
3.1.3	Eksperimentalne životinje	35
3.1.4	Mikrobiološki materijal	36
3.2	Metode	36
3.2.1	In vitro ispitivanja	36
3.2.1.1	Retrodijaliza	36
3.2.1.2	PAMPA test permeabilnosti	37
3.2.2	In vivo ispitivanja	38
3.2.2.1	Tretman eksperimentalnih životinja	38
3.2.2.2	Prikupljanje uzoraka intersticijalne tečnosti - mikrodijaliza	39
3.2.2.3	Prikupljanje uzoraka plazme, seruma i tkiva	40
3.2.2.4	Ispitivanje parametara toksičnosti (biohemijsko i histološko)	41
3.2.3	Kvantitativna analiza uzoraka plazme, tkiva i dijalizata	42
3.2.3.1	Procedura za pripremu uzoraka plazme i dijalizata	42
3.2.3.2	Ekstrakcija iz homogenata tkiva i uzoraka fecesa i urina	42
3.2.3.3	Kvantifikacija primenom metode tačne hromatografije pod visokim pritiskom	43

3.2.4	In vitro mikrobiološka ispitivanja	45
3.2.5	In silico ispitivanja.....	47
3.2.5.1	In silico ispitivanja farmakokinetičkih i farmakodinamskih parametara	47
3.2.5.2	In silico ispitivanja interakcija daidzeina i levofloksacina sa transportnim proteinima	48
3.2.6	Statistička obrada podataka.....	49
3.2.6.1	Statistička analiza farmakokinetičkih parametara	49
3.2.6.2	Statistička analiza mikrobioloških parametara	49
3.2.6.3	Statistička obrada dobijenih rezultata	50
4.	REZULTATI.....	51
4.1	Rezultati in vitro ispitivanja	51
4.1.1	Retrodijaliza in vitro.....	51
4.1.2	Permeabilnost levofloksacina na modelu paralelnih veštačkih membrana (eng. Parallel Artificial Membrane Permeability Assay, PAMPA)	52
4.2	Rezultati farmakokinetičkih ispitivanja in vivo	54
4.2.1	Farmakokinetika levofloksacina u plazmi i perifernim tkivima.....	54
4.2.1.1	Farmakokinetika levofloksacina u plazmi	54
4.2.1.2	Farmakokinetika levofloksacina u intersticijalnoj tečnosti poprečno-prugastog mišića.....	56
4.2.1.3	Farmakokinetika levofloksacina u homogenatima tkiva, uzorcima fecesa i urina	59
4.2.2	Farmakokinetika daidzeina u plazmi i perifernim tkivima.....	60
4.2.2.1	Farmakokinetika daidzeina u plazmi	60
4.2.2.2	Farmakokinetika daidzeina u intersticijalnoj tečnosti poprečno-prugastog mišića	66
4.2.2.3	Koncentracije daidzeina u homogenatima tkiva, uzorcima fecesa i urina	72
4.2.3	Farmakokinetika levofloksacina u plazmi i perifernim tkivima nakon konkomitantne primene sa daidzeinom	73
4.2.3.1	Farmakokinetika levofloksacina u plazmi nakon primene u kombinaciji sa daidzeinom.....	73
4.2.3.2	Farmakokinetika levofloksacina u intersticijalnoj tečnosti poprečno-prugastog mišića nakon primene sa daidzeinom	79
4.2.3.3	Farmakokinetika levofloksacina u organima pacova nakon konkomitantne primene sa daidzeinom.....	88
4.2.3.4	Uticaj daidzeina na farmakokinetiku levofloksacina	91
4.3	Rezultati ispitivanja parametara toksičnosti	99
4.3.1	Uticaj na biohemijske parametre funkcije jetre i bubrega.....	99
4.3.1	Uticaj daidzeina i levofloksacina na morfologiju jetre i bubrega pacova	102
4.4	Uticaj daidzeina na osetljivost bakterija na levofloksacin.....	104
4.4.1	Određivanje vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija.....	104
4.4.2	Ispitivanje interakcije levofloksacina i daidzeina - metoda šahovske ploče	104

4.5 In silico analiza.....	113
4.5.1 In silico ispitivanje vezivanja za transportne proteine	113
4.5.2 FK/FD indeksi levofloksacina.....	114
4.5.3 Predikcija efikasnosti različitih doznih režima levofloksacina kod kritično obolelih pacijenata.	117
5. DISKUSIJA.....	118
6. ZAKLJUČAK	134
7. LITERATURA.....	136
8. PRILOZI	151

1. UVOD

Bakterijska rezistencija je jedan od najvažnijih problema današnjice, sa značajnim uticajem kako na zdravlje pojedinca, tako i na celokupan sistem zdravstvene zaštite. Infekcije izazvane rezistentnim mikroorganizmima su teže za lečenje, imaju lošije ishode i češće dovode do komplikacija u odnosu na infekcije izazvane osetljivim patogenima. Poseban izazov predstavljaju intrahospitalne infekcije, gde je češća pojava multirezistentnih sojeva u odnosu na opštu populaciju. Kako je otkrivanje novih antibakterijskih lekova skup i spor proces, postoji više strategija za očuvanje i povećanje efikasnosti već dostupnih antibiotika sa ciljem da se premosti vreme do identifikacije novih terapijskih opcija. Mogućnost primene antibiotika u kombinaciji sa supstancama koje mogu pojačati njihovo terapijsko dejstvo jedna je od metoda za borbu protiv multirezistentnih mikroorganizama. Kod rezistentnih bakterija kod kojih je rezistencija posledica pojačane ekspresije efluks transportera bakterija, osetljivost se može povratiti inhibicijom efluks pumpi. Aktivan efluks igra važnu ulogu u rezistenciji na fluorisane hinolone, stoga je ova grupa antibiotika od interesa prilikom ispitivanja mogućnosti inhibicije efluks pumpi kao strategije za borbu protiv rezistencije. Istraživanja u sklopu ove doktorske disertacije posvećena su identifikaciji i ispitivanju efluks inhibitora koji imaju visok translacioni potencijal. Ovaj proces sproveden je kroz određivanja efekata konkomitantne primene levofloksacina, fluorohinolonskog antibiotika i daidzeina, izoflavona koji prema literaturnim podacima ispoljava inhibitorne efekte na efluks pumpe bakterija, povećavajući na taj način intracelularne koncentracije konkomitantno primenjenih antibiotika i pojačavajući im efekat. Od brojnih supstanci koje se u literaturi navode kao inhibitori efluks pumpi prirodnog porekla, daidzein je izabran za dalja istraživanja usled dostupnih podataka o farmakokinetici, farmakodinamici, povoljnom profilu

neželjenih dejstava i dugogodišnjoj primeni kod ljudi, kroz konzumaciju različite hrane i suplemenata koji ga sadrže. Ipak, da bi daidzein ispoljio svoje dejstvo u smislu povećanja osetljivosti bakterija u kliničkim uslovima, neophodno je da na samom mestu infekcije postiže koncentracije dovoljno visoke za inhibiciju bakterijskih efluks pumpi. Kako je najveći broj infekcija lociran u perifernim tkivima, a ne u krvi, uobičajene metode određivanja koncentracija lekovitih supstanci u plazmi, ne pružaju dovoljno informacija. U literaturi ne postoje podaci o tkivnoj farmakokinetici daidzeina, niti o efektu koje koadministracija ima na uobičajenu farmakokinetiku primenjenih antibiotika. Ove informacije su neophodne da bi se ispitao translacioni potencijal daidzeina, i primenjivost strategije inhibicije efluks pumpi u kliničkim uslovima. Brojne su metode za određivanje koncentracija supstanci od interesa u perifernim tkivima, ali se posebno izdvojila mikrodijaliza, koja je zlatni standard u ispitivanjima ovog tipa, i neophodan deo prilikom registracije novih antibakterijskih lekova. Implementacija ove metode u našim uslovima, omogućila bi povećanje istraživačkih kapaciteta naše institucije, posebno usled činjenice da nijedna druga istraživačka grupa u zemlji i regionu još uvek ne primenjuje ovu metodu. Mikrodijalizni metod poseduje određena ograničenja poput male zapremine uzoraka dostupnih za analizu i potrebe za sofisticiranim tehnikama za kvantifikaciju koje dozvoljavaju detekciju niskih koncentracija analita u ograničenoj zapremini uzorka. Levofloksacin spontano fluorescira i stoga ga je moguće i bez komplikovane pripreme uzoraka detektovati tačnom hromatografijom sa fluorescentnim detektorom, metodom koja je od 10-50 puta osetljivija od klasične tačne hromatografije. Visoka osetljivost kao i nekomplikovana priprema uzoraka za analizu su, pored kliničkog značaja i aktuelnosti problema rezistencije na levofloksacin, takođe, razlozi ispitivanja baš ovog antibiotika. Doktorska disertacija sastoji se od ispitivanja *in vivo* tkivne farmakokinetike i bezbednosti daidzeina i levofloksacina samostalno i u kombinaciji na animalnom modelu i ispitivanja interakcije ove dve supstance na nivou bakterijskih kultura iz kliničkih izolata. U nastavku, uvod daje pregled dostupne literature o osobinama hinolona, farmakokinetici, farmakodinamici, mehanizmima rezistencije i aktuelnim strategijama za prevazilaženje ovog problema.

1.1 Hinoloni

Hinoloni su grupa sintetskih antibiotika, dobijena tokom sinteze hlorokina, pre više od pola veka. Prvi predstavnik, nalidiksična kiselina, brzo je ušao u kliničku primenu, za infekcije urinarnog trakta izazvane Gram-negativnim bakterijama [1]. Osamdesetih godina prošlog veka, biva razvijena nova generacija hinolona, fluorohinoloni, sa boljim farmakološkim osobinama i aktivnošću i protiv Gram-pozitivnih bakterija. Podela hinolona na generacije bazirana je na antibakterijskom spektru i farmakokinetici. Prva generacija uključuje već spomenutu nalidiksičnu kiselinu i pipemidinsku kiselinu, primenjivala se za nekomplikovane urinarne infekcije, usled loše distribucije u ostala tkiva. Predstavnici druge generacije imaju širi spektar dejstva a predstavnici su ciprofloksacin i ofloksacin, koji se koriste i za komplikovane infekcije urinarnog trakta i infekcije kože i mekih tkiva. Treća generacija (levofloksacin, gatifloksacin, sparfloksacin) deluje i na atipične bakterije, a četvrta generacija (gemifloksacin, trovafloksacin) ima izraženo dejstvo i na anaerobe.

Antibakterijsko dejstvo ostvaruju inhibicijom topoizomeraze II (DNK giraze) i topoizomeraze IV, bakterijskih enzima neophodnih za replikaciju, transkripciju i reparaciju bakterijske DNK [1, 2]. DNK giraza je enzim koji proizvodi negativne supernavoje u DNK oko svoje ose. Ovaj process koji se naziva superspiralizacija važan je za funkcionisanje bakterijskih ćelija [3]. Superspiralizacija čini bakterijski hromozom kompaktnijim i reguliše nivo genske transkripcije. Bakterije u logaritamskoj fazi rasta imaju najviše izraženu superspiralizaciju, a ovaj proces nastupa i u odgovoru na stresogene iz okoline bakterijske ćelije [4]. Negativno superspiralizovana DNK omogućava inicijaciju i replikaciju DNK. Topoizomeraza IV je enzim strukturno srodan girazi koji ima ulogu na kraju DNK replikacije omogućavajući segregaciju novosintetisane DNK u ćerke ćelije [5]. Fluorohinoloni inhibišu navedene enzime, stabilišući DNK-giraza ili DNK-topoizomeraza komplekse, što dovodi do brze inhibicije DNK sinteze i smrti bakterijske ćelije [1].

U tabeli 1. prikazane su fizičko-hemijske i farmakokinetičke osobine fluorohinolona. Većina fluorohinolona ima molekulsku masu od oko 300 Da, umereno su lipofilni, sa izuzetkom ciprofloksacina, a za proteine plazme se vezuju u procentu od 20 do 40% [6]. Na fiziološkim vrednostima pH, nalaze se u nejonizovanom obliku i distribuišu se lako u periferna tkiva, često postižući koncentracije više nego u plazmi. Uglavnom se izlučuju nepromenjeni urinom, gde se koncentruju. Izuzetak je moksifloksacin, koji se metaboliše u jetri i izlučuje putem žuči [7].

Fluorisanii hinoloni predstavljaju jednu od najvažnijih grupa antibakterijskih lekova. Ovi baktericidni antibiotici imaju širok spektar dejstva, te se koriste i u vanbolničkim i bolničkim uslovima za infekcije kože, mekih tkiva, kostiju, respiratornog i urinarnog trakta [6].

Tabela 1. Pregled fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih osobina fluorohinolona

Ime leka	Bioraspoloživost (%) ¹	Vezivanje za proteine plazme (%) ¹	Fracija koja podleže eliminaciji (%) ²	Fracija koja podleže metabolizmu (%) ²	Poluvreme elaminacije (h) ¹	pKa ²	logP ²	VD (L/kg)
ciprofloksacin	70	30	40-50	15	3.5	6.09	0.28	1.74 -5.0 L/kg ⁴
levofloksacin	99	35	87	<5%	6.9	5.45	2.1	1.1 L/kg ³
moxifloksacin	86	47	Urin - 20 Feces - 25	52	12.1	5.69	2.9	1.7 - 2.7 L/kg
gemifloksacin	71	60-70	Urin - 36 ± 9.3 Feces - 61 ± 9.5	<10%	8.0	5.53	2.3	1.66 - 12.12 L/kg
ofloksacin	98	32	Urin - 65-80 Feces - 4-8	<10%	9.0	5.45	-0.39	

Izvori:¹[8], ²[9], ³[10], ⁴[11]

Uprkos nesumnjivom kliničkom značaju, ova grupa antibiotika povezana je sa, iako vrlo retkim, ipak značajnim neželjenim dejstvima, te su istraživanja bezbednosnog profila unazad 15-20 godina dovela do ograničenja u primeni hinolona, i do povlačenja pojedinih agenasa sa tržišta [12]. Prva generacija hinolona, povučena je sa tržišta, jer indikacije za koje su se koristili (nekomplikovane urinarne infekcije) nisu opravdavale rizik od njihove primene. U najvećem broju slučajeva, neželjena dejstva su blaga, ali utvrđena je i povezanost primene hinolona i nastanka tendinopatija, artralgijska i ruptura tetiva. Tačan mehanizam kojim fluorohinoloni oštećuju tetive nije u potpunosti razjašnjen, ali neki od

pretpostavljenih mehanizama povezuje se sa direktnim citotoksičnim efektima na hondroците i fibroblaste, izmene ćelijskog matriksa i sa inhibicijom sinteze i stimulacijom razgradnje kolagena tip 1 [13]. Toksičnost prema vezivnom tkivu nije ograničena na tetive, te su ispitivanja pokazala da je primena fluorohinolona povezana sa povećanim rizikom od aneurizme i disekcija aorte [14]. Takođe je opisan i nastanak periferne neuropatije, konvulzija i fotosenzitivnost.

1.1.2 Levofloksacin

Levofloksacin je patentiran 1985, a pušten u promet 1996. godine. Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji, svrstan je na listu esencijalnih lekova [15]. Dostupan je i kao generik, u obliku formulacija za oralnu i intravensku primenu. Levofloksacin je sintetski S (-) enantiomer ofloksacina, aktivan prema Gram-pozitivnim, Gram-negativnim i atipičnim bakterijama koje su kauzalni agensi kako u vanbolničkim tako i u bolničkim infekcijama. Levofloksacin deluje na sojeve *Staphylococcus* (meticilin osetljivi) i enterobakterije ali ima posebno izraženo dejstvo na *Streptococcus pneumoniae* i druge mikroorganizme koji izazivaju respiratorne infekcije poput *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Legionella spp.*, *Mycoplasma spp.* i *Chlamydia pneumoniae* [16]. Deluje i na *Mycobacterium tuberculosis* i predstavlja antituberkulotik druge linije [17]. Levofloksacin se koristi kod odraslih osoba za lečenje akutnog bakterijskog sinuzitisa, egzacerbacija hroničnog bronhitisa, vanbolničkih i bolničkih pneumonija, komplikovanih infekcije kože, mekih tkiva i urinarnog trakta, uključujući pijelonefritis i bakterijski prostatitis. Takođe se koristi u prevenciji i lečenju infekcija izazvanih bakterijom *Yersinia pestis*, i kod inhalacionog antraksa. Široki spektar dejstva omogućava efikasnost monoterapije levofloksacina, dok se u bolničkim uslovima u empirijskoj primeni često koristi i u kombinaciji sa drugim antibioticima [15]. Usled već spomenutog rizika od teških i ozbiljnih neželjenih dejstava (tendinitis, ruptura tetiva, neuropatija i CNS efekti), kod egzacerbacija hroničnog bronhitisa, sinuzitisa i nekomplikovanih urinarnih infekcija, levofloksacin se preporučuje kod pacijenata gde ne postoji alternativa. Oftalmički preparati levofloksacina koriste se u terapiji

konjuktivitisa. U cilju smanjena razvoja rezistencije, preporučuje se primena levofloksacina isključivo kod potvrđenih bakterijskih infekcija.

Levofloksacin je dostupan u obliku tableta za *per os* primenu (250, 500 i 750 mg) i rastvora za intravensku primenu. Usled rizika od nastanka hipotenzije, bolus injekcija ili brza venska primena se ne preporučuje, te se levofloksacin intravenski primenjuje u sporoj infuziji. Kod pacijenata sa bubrežnom insuficijencijom (glomerularna filtracija 10 do 50 ml/min) preporučuje se za 50% smanjenje ukupne dnevne doze. Nakon oralne primene, levofloksacin se rapidno resorbuje, i bioekvivalentan je intravenskoj formulaciji, što omogućava tkz. „svič“ terapiju, odnosno prelazak sa intravenskog na oralnu formulaciju, smanjujući na taj način troškove lečenja i neophodnost zadržavanja pacijenata u bolničkim uslovima. Maksimalne koncentracije se postižu posle 1h posle *per os* primene, a hrana ima mali efekat na resorpciju levofloksacina. Dobro se distribuiše u periferna tkiva, a približno 30-40% levofloksacina vezuje se za proteine plazme. Višekratnim doziranjem, ravnotežno stanje se postiže nakon tri dana. Apsorpcija se dešava putem OATP1A2 influks transportera [15, 18], dok se prema rezultatima *in vitro* ispitivanja, transport u bazolateralno-apikalnom smeru odvija putem P-glikoproteina (P-GP) [19, 20]. Levofloksacin postiže visoke koncentracije u plućima i prostati, više nego one u plazmi, dok slabo prodire u cerebrospinalnu tečnost. Levofloksacin se u manjoj meri metaboliše – metaboliti dezmetil-levofloksacin i levofloksacin-N-oksidi čine manje od 5% doze izlučene u mokraći. Najveći deo se izlučuje neizmenjen putem bubrega. Eliminacija levofloksacina se prvenstveno odvija putem bubrega [10, 21], te se doza mora prilagoditi kod pacijenata sa oštećenom bubrežnom funkcijom. Posle oralne, a i intravenske primene, izlučivanje iz plazme je relativno sporo, sa poluvremom eliminacije od oko 6 do 8 sati. Prema EUCAST standardima, granica osetljivosti korespondira sa koncentracijom levofloksacina u plazmi od 2 mg/L. Prilikom razmatranja efikasnosti antibakterijskih lekova, izbora i korekcije doze i doznog režima, pored farmakokinetičkih, neophodno je uzeti u obzir i farmakodinamiku kao i međusobne odnose ovih parametara.

1.1.2 Farmakokinetičko/farmakodinamski parametri fluorohinolona

Farmakokinetika je nauka koja prati sudbinu leka u organizmu, tj. procese resorpcije, distribucije, metabolizma i ekskrecije lekova. Osnovni procesi u farmakokinetici obuhvataju fazu apsorpcije, distribucije, metabolizma i eliminacije. Na osnovu izmerenih koncentracija lekova i farmakokinetičkih ispitivanja, preračunavaju se i određuju različiti farmakokinetički parametri: klirens leka (Cl), volumen distribucije (Vd), poluvreme eliminacije ($t_{1/2}$), površina ispod krive koncentracija-vreme (AUC), konstante brzine resorpcije i eliminacije (α, β) i drugi [22]. Farmakokinetička ispitivanja daju osnov za izbor i korekciju režima doziranja lekova, omogućavaju bolje razumevanje farmakodinamike (FD) lekova kao i utvrđivanje farmakokinetičko-farmakodinamske (FK/FD) korelacije.

Određivanje farmakokinetičkih parametara moguće je primenom kompartmentne i nekompartmentne, model-nezavisne analize, od kojih drugi pristup znatno više odgovara kliničkoj praksi usled jednostavnog i brzog izvođenja.

Primenom nekompartmentne FK analize, brzina eliminacije lekova (k_{el}) izračunava se prema sledećoj formuli:

$$k_{el} = \frac{\ln C_1 - \ln C_2}{t_2 - t_1}$$

C_1 =izmerena koncentracija leka u vremenu t_1

C_2 =izmerena koncentracija leka u vremenu t_2

Brzinu eliminacije leka opisuje i parametar poznat kao poluvreme eliminacije ($t_{1/2}$), što odgovara vremenu za koje se koncentracija leka smanji na polovinu od inicijalne vrednosti:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_{el}}$$

Različiti farmakokinetički parametri koji opisuju kretanje leka u organizmu, poput maksimalne koncentracije leka (C_{max}) i površine ispod krive koncentracija-vreme (AUC) od značaja su prilikom tumačenja FK/FD indeksa antibakterijskih lekova. AUC omogućava procenu ukupne koncentracije leka u organizmu, odnosno izloženost leku. Na osnovu podataka o izmerenim koncentracijama leka u različitim vremenskim tačkama merenja, primenom trapezoidnog metoda dobija se vrednost AUC koju matematički opisuje:

$$AUC = \sum_{i=1}^n \left[\frac{(C_{n+1} + C_n)}{2} * (t_{n+1} + t_n) \right]$$

t_n - vreme merenja koncentracija leka

C_n - koncentracija leka u datom vremenu

Uvid u distribuciju lekova daje podatak o prividnom volumenu distribucije, a za fazu eliminacije lekova, koja je za antibakterijske lekove od velikog značaja za određivanje i korekciju doznog režima i uvid daju poluvreme eliminacije i klirens. Prividni volumen distribucije (V_d) predstavlja teoretsku vrednost koji povezuje količinu leka u organizmu i njegovu koncentraciju u krvi (plazmi).

Klirens leka (Cl) predstavlja teoretski određen volumen telesne tečnosti koji se očisti od leka u jedinici vremena. Klirens leka (Cl) je osnovni farmakokinetički parametar koji opisuje izlučivanje lekova. Ukupni klirens (CIP) predstavlja volumen plazme koji se u jedinici vremena očisti od primenjenog leka (metabolisanjem, ali i svim drugim putevima izlučivanja – bubreg, jetra, pluća). Bubrežni (renalni) klirens (CIR) je volumen plazme koji se u jedinici vremena očisti od leka izlučivanjem preko bubrega. Hepatički klirens (CIH) predstavlja deo zapremine plazme koji se od leka očisti preko jetre u jedinici vremena. Klirens leka opisuje matematička formula:

$$Cl = k_{el} * V_d$$

k_{el} = konstanta eliminacije

V_d =volumen distribucije

Značaj farmakodinamskih parametara antibakterijskih lekova, odnosno mehanizma ubijanja bakterija, post-antibiotskog efekta i uticaja sub-inhibitornih koncentracija je primećen pre dvadesetak godina. Odgovor za kompleksnost interakcije između antibiotika i mikroorganizma pronađen je u kvantitativnom odnosu između farmakokinetičkih parametara antibakterijskih lekova i mikrobioloških parametara (minimalna inhibitorna koncentracija, MIK), takozvanim farmakokinetičko/farmakodinamskim (FK/FD) indeksima. Brojne studije su pokušale da kvantifikuju aktivnost antibakterijskih lekova i utvrde FK/FD indekse [23-25] i njihove vrednosti koje najbolje koreliraju sa terapijskom efikasnošću. Značaj određivanja MIK leži u činjenici da antibiogram kao mera osetljivosti bakterija često nije dovoljno precizna mera, pa i u slučaju pozitivnog nalaza antibiograma, ne dolazi do očekivanog odgovora na primenjenu terapiju [26]. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije je preciznija mera potencije antibiotika i neophodan je za doziranje na osnovu FK/FD parametara. Minimalne inhibitorne koncentracije su važne u dijagnostičkim laboratorijama pri određivanju otpornosti mikroorganizama na antimikrobni agens, kao i pri praćenju aktivnosti novih antimikrobnih agenasa [27]. MIK se smatra najosnovnijim laboratorijskim merenjem aktivnosti antimikrobnog agenasa protiv organizma i postoje različiti načini određivanja [28]. Dilucione metode koriste niz dvostrukih razblaženja antibiotika u odgovarajućoj podlozi i registruje se ona koncentracije gde dolazi do zaustavljanja rasta bakterija nakon perioda inkubacije [29]. Prema podlozi u kojoj se prave razblaženja antibiotika postoje bujon dilucioni metod i agar dilucioni metod. Agar dilucioni metodom se zasniva na principu difuzije antibiotika kroz čvrstu hranljivu podlogu (agar) prethodno zasejanu ispitivanom bakterijskom kulturom. Za bujon dilucionu metodu kao standardna podloga koriste se različite tečne podloge. Bujon diluciona metoda može da se izvodi u epruvetama ili kao mikrodiluciona tehnika – u pločama za mikrotitraciju [30]. Brža ali i skuplja jeste E-test metoda na agaru, gde se koriste fabrički standardizovane E-test trake koje sadrže opadajući gradijent koncentracije antibiotika i vrednost MIK se očitava na skali koncentracija na E-test traci na

mestu gde linija zone inhibicije rasta preseca ivicu E-test trake. Prednost je direktno očitavanje vrednosti MIK i moguće istovremeno ispitivanje osetljivosti na veći broj antibiotika. Moguće je određivanje MIK i primenom automatizovanih sistema [30].

FK/FD indeksi koji kvantifikuju aktivnost antibiotika i koreliraju sa terapijskom efikasnošću su C_{max}/MIK (maksimalna koncentracije leka u plazmi/MIK), %t >MIK (procenat doznog intervala u kome koncentracija antibiotika prevazilazi MIK) i AUC/MIK (odnos između površine ispod krive koncentracija/ vreme i MIK) [23, 31, 32]. Ispitivanja su rađena na *in vitro* modelima, laboratorijskim životinjama, a zatim potvrđena kroz kliničke studije.

Važno je objasniti pozadinu koja stoji iza navedenih FK/FD indeksa. Koncept farmakodinamike antibakterijskih lekova odnosi se na mehanizam ubijanja bakterija, vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), post-antibiotski efekat (PAE) [33, 34], efekat sub-inhibitornih koncentracija (sub-MIK) [35] kao i post-leukocitni efekat (PALE). PAE predstavlja pojavu prestanka deljenja bakterija izloženih antibiotiku i nakon uklanjanja antibiotika iz medijuma koji sadrži bakterije. Dužina trajanja PAE predstavlja razliku u vremenu koje je potrebno bakterijama tretiranim antibiotikom da postignu umnožavanje broja kolonija jednako bakterijama koje nisu bile izložene dejstvu testiranog antibiotika. Međutim, nije samo PAE zaslužan za sprečavanje ponovnog rasta bakterija. Dodavanje niskih, sub-inhibitornih koncentracija u toku post-antibiotskog efekta dodatno produžava inhibiciju rasta bakterija. Takođe, kod imunokompetentnih pacijenata, bakterije izložene niskim, sub-inhibitornim koncentracijama antibiotika podložnije su fagocitozi. Ovo povećanje aktivnosti leukocita (eng. *postantibiotic leukocyte enhancement*, PALE) pokazano je za fluorohinolone, makrolide i peneme [36]. Uz učešće imunog sistema domaćina, trajanje inhibicije rasta je obično je duže *in vivo* nego *in vitro* i upravo ovo omogućava manje čestu primenu (duži dozni interval) antibiotika sa izraženim PAE, sub-MIK i PALE efektima.

Tabela 2. Najvažniji FK/FD indeksi za izabrane antibakterijske lekove i vrednosti koje koreliraju sa terapijskom efikasnošću

Grupa antibiotika	FK/FD indeks	Vrednost indeksa
Penicilini	% t>MIK	50-60%
Cefalosporini	% t>MIK	60-70%
Karbapenemi	% t>MIK	40-50%
Makrolidi	AUC*/MIK	25
Glikopeptidi (vankomicin)	AUC/MIK	250
Tigeciklin	AUC/MIK	17,9
Linezolid	AUC/MIK	100
Aminoglikozidi	C _{max} /MIK	10
Fluorohinoloni	C _{max} /MIK	10
	AUC/MIK	125

*AUC_{0-24h}

Uprkos velikom broju antibakterijskih lekova, svi ispoljavaju neki od dva tipa antibakterijske aktivnosti – **vremenski zavisno** ubijanje bakterija ili **koncentracijski zavisno** ubijanje bakterija. U tabeli 2. su prikazani najvažniji FK/FD indeksi i njihove vrednosti za izabrane grupe antibakterijskih lekova. Vrednosti prikazane u tabeli, predstavljaju donju granicu za postizanje terapijske efikasnosti. Za lekove sa **vremenski zavisnim** ubijanjem bakterija udeo vremenskog intervala u kome se koncentracije leka nalaze iznad MIK (%t>MIK) najbolje koreliraju sa terapijskim ishodom [37]. Ovaj indeks je posledica činjenice da antibiotici sa vremenski zavisnim ubijanjem bakterija pokazuju najizraženiju antibakterijska aktivnost tek nakon višesatnog kontakta između antibakterijskog leka i bakterije, a sama koncentracija antibiotika nije od presudne važnosti (dovoljne su vrednosti 2-3 puta iznad MIK) [23]. Stoga se dozni režimi određuju tako da se poveća trajanje ekspozicije antibiotiku – kraći dozni intervali ili produžena infuzija u slučaju parenteralne administracije. Međutim, pojedine klase antibiotika pokazuju vremenski zavisnu antibakterijsku aktivnost, ali imaju izražen PAE, te se mogu dozirati u dužim intervalima. U tu grupu spadaju makrolidi, tetraciklini, linkozamini, triciklini, a kod ovih klasa antibiotika najvažniji indeks efikasnosti je AUC₀₋₂₄/MIK [38-40].

Predstavnici antibiotika sa **koncentracijski zavisnim** ubijanjem bakterija su aminoglikozidi i fluorohinoloni. Cilj doziranja je postizanje što viših koncentracija na mestu infekcije. Za

aminoglikozide, postizanje koncentracije leka od 10–12× iznad MIK-a dovodi do eradikacije preko 90% bakterija [41]. Dug PAE aminoglikozidnih antibiotika dozvoljava administraciju jednom dnevno što smanjuje toksične efekte, a povećava terapijsku efikasnost. Za fluorohinolone, pored C_{\max}/MIK , važan je i AUC/MIK , gde je kliničkim ispitivanjima potvrđeno da ovaj parametar korelira sa terapijskim ishodom [32, 40, 42]. Kao što je već spomenuto, fluorohinoloni ispoljavaju koncentracijski zavisno ubijanje bakterija, gde su minimalne baktericidne koncentracije slične MIK za većinu bakterija, a veličina inokuluma ima minimalan efekat na njihovu efikasnost [29]. Visoke koncentracije na mestu infekcije su od kritičnog značaja za fluorohinolone [32]. Vrednost $C_{\max}/\text{MIK} > 10$ [32], opšte je prihvaćen prediktor kliničkog ishoda pri terapiji fluorohinolonima. Pri nižim dozama, pri vrednostima $C_{\max}/\text{MIK} < 10$, odnos AUC/MIK bolje korelira sa terapijskim odgovorom. Ciljane vrednosti $\text{AUC}/\text{MIK} > 25\text{h}$ predložene su za manje teške infekcije, dok su kod teških infekcija i imunokompromitovanih pacijenata, vrednosti $f\text{AUC}/\text{MIK} > 100\text{h}$ neophodne za uspešan terapijski odgovor [29]. Važno je napomenuti da parametar $f\text{AUC}$ označava površinu ispod krive koncentracija-vreme određen na osnovu slobodnih koncentracija leka, koji nije vezan za proteine, a $t\text{AUC}$, na osnovu ukupne koncentracije leka. Retrospektivno istraživanje kod pacijenata sa bakterijemijom izazvanom *P. aeruginosa*, procenat izlečenja je bio iznad 90% sa vrednostima C_{\max}/MIK iznad 8 [43]. Vrednost $t\text{AUC}/\text{MIK}$ od 125h koju su utvrdili Forest i saradnici ispitujući farmakodinamiku ciprofloksacina kod kritično obolelih, opšte je prihvaćena ciljana vrednost za koju je potvrđeno da najbolje korelira sa rapidnim bakteriološkim i kliničkim odgovorom kod infekcija izazvanih Gram-negativnim bakterijama [42]. Kod infekcija izazvanih Gram-pozitivnim bakterijama, odnos $f\text{AUC}_{0-24}/\text{MIK} \geq 33,7\text{h}$ predložen je za *S. pneumoniae*, a odnos $t\text{AUC}/\text{MIK} \geq 87\text{h}$ za *S. aureus* [44].

Pored efikasnosti, za FK/FD parametre fluorohinolona je utvrđeno da koreliraju sa razvojem rezistencije. Jedna od predloženih farmakodinamskih mera, razvijena za usporavanje razvoja otpornosti prema antibioticima, koja opisuje odnos između farmakodinamike antibiotika i razvoja rezistencije je tkz. prozor selekcije rezistentnih sojeva (PSR) [45]. Koncept PSR je prvobitno utvrđen

za fluorohinolone, 1999. godine [46], a potom i za beta-laktame, polimiksine, makrolide i aminoglikozide, *in vitro* [47-51]. Unutar osetljive bakterijske populacije izložene antibioticima, deo ćelija ostaje nepogođen dejstvom antibiotika. Umnožavanje ove otporne sub-populacije odvija se u rasponu koncentracija između minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) osetljivih ćelija i MIK-a najmanje osetljive sub-populacije, koja se naziva koncentracija prevencije rasta rezistentnih sojeva (MPK) [52]. Ovaj raspon koncentracija odgovara prozoru selekcije rezistentnih sojeva (PSR). Takoreći, MPK je koncentracija koje sprečava rast rezistentnih mutanata, odnosno MIK najmanje osetljivog soja unutar heterogene bakterijske populacije [53]. Tradicionalni režimi doziranja često daju antibakterijske koncentracije unutar PSR-a, omogućavajući selektivno umnožavanje rezistentnih bakterija. Za fluorohinolone, PSR određen *in vitro* primenjiv je za optimizaciju režima doziranja u cilju smanjenja mogućnosti razvoja rezistencije i u kliničkim uslovima [54, 55].

1.1.3 Farmakokinetika antibakterijskih lekova – tehnike određivanja

Klinička farmakokinetika ima za cilj da prilagodi doziranje leka individualnim potrebama organizma. Ovo se zasniva na hipotezi da postoji odnos između koncentracije leka u krvi i odgovora na lek, bilo da se radi o terapijskom ili toksičnom efektu [28, 56, 57]. Ovaj koncept je tačan za većinu lekova. Prolazak leka sa mesta aplikacije (iz creva, *i.m.* ili *s.c.* injekcije) određuje količinu aktivne supstance koja dolazi u sistemska cirkulaciju, kao i brzinu kojom se to postiže. Koncentracije leka u krvi mogu značajno varirati inter- i intraindividualno zavisno od osobina samog leka i/ili pacijenta. Farmakokinetički parametri nekog leka mogu biti značajno promenjeni kod dece, trudnica i dojilja, starih osoba (iznad 65 godina), insuficijencije bubrega, insuficijencije jetre, istovremene primene drugih lekova, sepse, septičnog šoka i teške traume [56]. Za optimalno doziranje antibiotika, poseban izazov predstavlja sepsa i septični šok, kako zbog izmenjene farmakokinetike kod ovih pacijenata, tako i zbog izmenjenih karakteristika izazivača infekcije – u hospitalnim uslovima, posebno u jedinicama intenzivne nege, veća je učestalost multirezistentnih bakterija [58]. Praćenje koncentracije leka i primena farmakokinetičkih principa u cilju prilagođavanja terapijske doze pojedinačnom

pacijentu sa ciljem da se postigne optimalan efekat i smanje neželjena dejstva omogućava individualno doziranje kod ugroženih pacijenata. Uključivanje FK/FD parametara u određivanju optimalnog režima doziranja antibiotika kod ovih pacijenata povećava šansu za postizanje adekvatnog terapijskog odgovora [59].

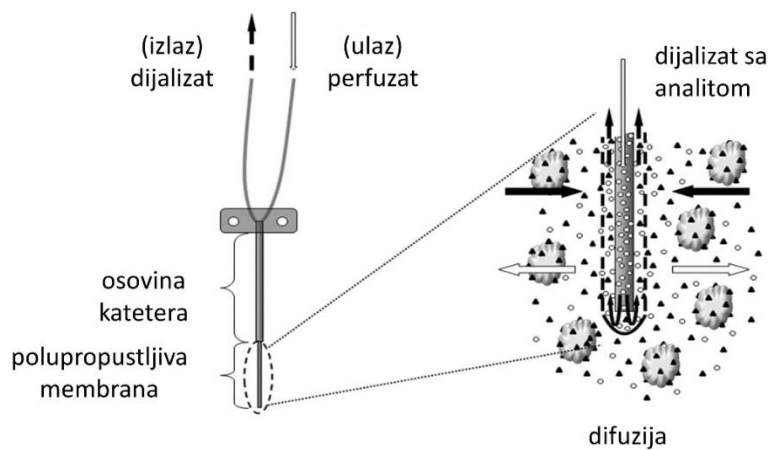
Važno je napomenuti da je za antibakterijske lekove posebno značajna distribucija antibiotika tj. prelazak iz plazme u tkiva - na ciljno mesto infekcije i vezivanje antibakterijskog leka za proteine plazme [60-62]. Vezivanje lekova za proteine je opšti biološki fenomen i cirkulišući proteini služe kao transportni mehanizam ili kao depo za lekove. Samo slobodna, nevezana frakcija leka može ostvariti antibakterijski efekat, te merenje ukupne koncentracije leka u plazmi može preceniti očekivani terapijski efekat. Takođe, najveći broj infekcija nije lokalizovan u plazmi već u intersticijalnom prostoru tkiva, te je poznavanje koncentracija koje antibiotik postiže u tkivima koja su ishodište bakterijske infekcije nezaobilazni deo adekvatnog doziranja antibiotika. Na primer, kod lečenja nekomplikovanih urinarnih infekcija, koncentracije u plazmi su manje važne od nivoa leka u urinu a kod infekcija centralnog nervnog sistema, značajan je podatak o prolasku leka kroz hematoencefalnu barijeru [57, 63]. Tačne tkivne koncentracije ne mogu se uvek ekstrapolirati na osnovu koncentracija u plazmi, te postoje različiti načini merenja tkivnih koncentracija. Karakterizacija tkivne farmakokinetike je značajna jer pruža precizne informacije o prodoru u tkiva, koji je često neujednačen, a između različitih tkiva postoje velike razlike [64]. Neke od tradicionalnih metoda za određivanje tkivne farmakokinetike su indirektno modelovanje nivoa lekova u tkivu na osnovu koncentracija u plazmi, uzimanje uzoraka ili bioptata tkiva ili telesnih tečnosti kao i metoda izazivanja plika i uzorkovanja iz eksudata (eng. *skin blister technique*) [65, 66]. Brojne imidžing metode se takođe mogu koristiti za određivanje tkivne farmakokinetike – planarna gama scintigrafija, emisiona tomografija zasnovana na emisiji fotona (eng. *SPECT-Single Photon Emission Tomography*), pozitronska emisiona tomografija (eng. *PET-Positron Emission Tomography*) i magnetno rezonantna spektroskopija [67-69]. Ograničenje im je visoka cena i problematični i složeni

postupci neophodni za obeležavanje antibiotika radioaktivnim izotopima, te je veoma mali broj studija o kinetici antibiotika koristio spomenute metode [67, 70-73]. Klasične metode koje se primenjuju zavise od tkiva koje je ishodište infekcije. Na primer, merenja koncentracija lekova u respiratornom traktu važno je za antibiotike koji se koriste u lečenju pneumonija, egzacerbacija hronične opstruktivne bolesti pluća i sl. Jedna od metoda merenja jeste uzorkovanje iz donjih partija respiratornog sistema primenom bronhoalveolarne lavaže [74]. Uzorak bronhoalveolarnog lavata se uzima nakon instilacije sterilnog fiziološkog rastvora u bronh i aspiracije sadržaja. Merenje koncentracije lekova u centralnom nervnom sistemu moguće je uzorkovanjem likvora. Sve ove metode su invazivne i rezervisane samo za određene grupe pacijenata. Merenje koncentracije antibiotika izvodi se i u homogenatima tkiva. Ovo je najčešće rezervisano za animalne modele, ali se izvodi i na isečcima tkiva dobijenih prilikom biopsija ili operacija. Koncentracije u homogenatu tkiva međutim ne prave razliku između koncentracija intracelularno i u intersticijumu, a to je od značaja da bi se imao uvid u frakciju leka koja može ostvariti antibakterijski efekat [75]. Za antibiotike koji se akumuliraju intracelularno, poput fluorohinolona, tkivni biotat može preceniti mogućnost ovih lekova da ostvare antibakterijski efekat za infekcije koje su lokalizovane intersticijalno. Posebno značajna metoda za određivanje slobodnih tkivnih koncentracija antibiotika, kojom je moguće uspešno prevazići spomenuta ograničenja lekova je mikrodijaliza.

1.3.1 Mikrodijalizna metoda

Mikrodijaliza je minimalno invazivna metoda koja omogućava uzimanje uzoraka intersticijalne tečnosti (IT) različitih tkiva te samim tim i precizno merenje raspodele antibiotika [76-78]. Mikrodijaliza je razvijena 1960ih za merenje koncentracije neurotransmitera u mozgu pacova, a sa unapređenjem tehnike mikrodijaliza nalazi i kliničku primenu [37, 79, 80]. Postojanje specijalnih katetera za kliničku primenu, omogućilo je merenje koncentracija lekova u gotovo svim ljudskim tkivima, uključujući potkožno masno tkivo, mišić, mozak, kosti i pluća.

Mikrodijaliza se bazira na implantaciji katetera sa dvostrukim lumenom i polupropustljivom dijaliznom membranom na vrhu koja imitira pasivnu funkciju kapilara (**slika 1**) [81]. Nakon implantacije u ciljno tkivo, mikrodijalizni kateter se konstantno ispira perfuzionim rastvorom, i u zavisnosti od veličine pora na membrani, samo određene supstance difunduju preko membrane iz intersticijalne tečnosti u dijalizat [82]. Kao perfuziona tečnost najčešće se koriste različiti vodeni rastvori, te je primena mikrodijalize najpogodnija za hidrofilne lekove [83].



Slika 1. Princip mikrodijalizne metode [84]. Slika preuzeta iz reference [84] i modifikovana.

Korišćenje membrane sa porama veličine od 20-30 kDa dozvoljava prolazak malih molekula (većina lekova, uključujući antibiotike), ali ne dozvoljava prolazak proteina, ćelija ili ćelijskog debrisja. Stoga, centrifugiranje i precipitacija proteina nisu neophodni pre kvantifikacije. Mikrodijalizni kateteri se razlikuju u dužini, debljini i obliku u zavisnosti od tkiva u koje se implantiraju. Koncentrične sonde od nerđajućeg čelika se koriste za implantaciju u centralni nervni sistem prilikom neurohemijskih studija, za meka tkiva poput jetre, srca i kože koriste se linerane sonde, a za kanulaciju krvnih sudova razvijene su posebne fleksibilne sonde [85]. Razmena se odvija obostrano preko polupropustljive membrane mikrodijalizne sonde zavisno od koncentracijskog gradijenta. Samim time, ne dolazi do

potpune ravnoteže u koncentracijama sa obe strane membrane, te posledično celokupna količina leka prisutna u tkivu ne prolazi u perfuzat. Razvijene su različite metode kalibracije mikrodijalizne sonde da bi se odredila stopa preuzimanja odnosno procenat od ukupne količine leka prisutnog u tkivu koji se nalazi u perfuzionoj tečnosti mikrodijaliznog katetera [76, 86]. Najčešće korišćena je metoda retrodijalize – implantacija katetera u tkiva, ubrizgavanje poznate koncentracije leka mikrodijaliznom pumpom u tkiva, i merenje količine koja se nalazi u perfuzatu nakon perioda potrebnog za približno postizanje ekvilibrijuma (najčešće oko pola h). Ovi rezultati dobijeni retrodijalizom se uključuju u dalja izračunavanja stvarnih tkivnih koncentracija [87-90]. Stopa preuzimanja zavisi od sastava perfuzionog rastvora, građe mikrodijalizne membrane, brzine protoka mikrodijalizne pumpe, temperature i fizičko-hemijskih osobina analiziranog leka. Dužina mikrodijalizne membrane direktno utiče na stopu preuzimanja analita, a ne dijametar. Generalno gledano, mali hidrofilni molekuli dobro difunduju preko mikrodijalizne membrane i imaju visoku stopu preuzimanja [86].

Mikrodijalizom su uspešno određene koncentracije supstanci u pretkliničkim i kliničkim uslovima u poprečno-prugastim mišićima, srcu, potkožnom masnom tkivu, kostima, plućima, jetri, srednjem uhu, produženoj moždini, oku, sinovijalnoj tečnosti, crevima, likvoru, peritoneumu i tkivu tumora [91-103]. U kliničkim uslovima, za periferna meka tkiva i kožu implantaciju katetera može obaviti zdravstveno osoblje bez potrebe za posebnom obukom, a procedura implantacije katetera nije ništa invazivnija niti bolnija od plasiranja periferne venske linije [83]. Jednom postavljeni, mikrodijalizni kateteri mogu ostati plasirani tokom više sati, čak i dana ili nedelja, a pacijenti ne moraju biti vezani za postelju tokom izvođenja oglada. Ispitivanja metabolizma i lipolize u potkožnom masnom tkivu uspešno su sprovedena na pacijentima u toku fizičke aktivnosti korišćenjem fleksibilnih mikrodijaliznih katetera [104]. Procedura se toleriše dobro i tokom kliničkih ispitivanja nisu prijavljene komplikacije od strane pacijenata. Naredno poglavlje daje pregled dostupne literature o primeni mikrodijalize za određivanje farmakokinetike fluorohinolona, značaju i primenjivosti ovih rezultata.

1.3.2 Pregled istraživanja primene mikrodijalize u određivanju tkivne farmakokinetike fluorohinolona

Pretklinička ispitivanja pružila su informacije o distribuciji fluorohinolona u teško dostupnim tkivima u kliničkim uslovima, poput prostate, centralnog nervnog sistema i pankreasa. Primenom mikrodijalize određene su slobodne koncentracije u prostati pacova [91] i upoređene sa koncentracijom u plazmi nakon primene u bolusu u dozi od 7 mg/kg kod Wistar pacova. Nakon *i.v.* primene, levofloksacin se brzo distribuisao postižući u prostati nivoe koji su odgovarali 78% koncentracija nevezanog levofloksacina u plazmi. Prethodna ispitivanja, merenjem koncentracija u bioplatu tkiva prostate pokazala su odnos koncentracija u prostati 3:1 u odnosu na one u plazmi [91, 105, 106]. Ova razlika potvrđuje značaj određivanja slobodnih frakcija leka, koje su jedine i odgovorne za farmakološki efekat. Merenje ukupnih koncentracija u homogenatima tkiva može dovesti do nesrazmerne procene kliničke efikasnosti [91]. Mikrodijalizom su određene slobodne koncentracije levofloksacina u pankreasu pacova nakon oralne i intravenske administracije u dozi koja je odgovarala humanoj dozi od 400 mg/dan [107]. Levofloksacin se u jednakoj meri distribuisao u intersticijum pankreasa nakon intravenske ($AUC_{\text{pankreas}}/AUC_{\text{krv}}, 0,97\pm 0,02$) i oralne ($AUC_{\text{pankreas}}/AUC_{\text{krv}}, 0,96\pm 0,03$) administracije. Takođe, simultanim merenjem koncentracija u krvi i bilijarnom traktu pokazano je da dolazi do rapidne distribucije i ekvilibrijuma između krvi i bilijarnog trakta i da levofloksacin podleže hepatobilijarnoj ekskreciji. Sa druge strane, AUC slobodnog levofloksacina je bio značajno viši u žuči nego u krvi, ukazujući na aktivnu bilijarnu ekskreciju levofloksacina [108]. Ispitivanjem koncentracija u mozgu pacova pokazano je da pojedini fluorohinoloni imaju ograničen prodor u intersticijum mozga uprkos visokim koncentracijama u cerebrospinalnoj tečnosti. Važno je spomenuti da je u kliničkim uslovima najlakši i najzastupljeniji način za ispitivanje koncentracija ksenobiotika u centralnom nervnom sistemu uzorkovanje likvora iz uzoraka lumbalne punkcije ili postavljenih ventrikularnih šantova. Koncentracije u cerebrospinalnoj tečnosti smatraju se dobrim surogatom za procenu koncentracija leka na mestu infekcije u centralnom nervnom sistemu. Ipak, postoje razlike između krvno-moždane i krvno-likvorske barijere, što dovodi

do razlika u distribuciji lekova između likvora i intersticijuma mozga. Na primer, koncentracije fluorohinolona u likvoru dvostruko su više nego one postignute u intersticijumu mozga, sa izuzetkom norfloksacina [104]. Primenom mikrodijalize određena penetracija u centralni nervni sistem, izražena kao odnos $AUC_{\text{mozak}}/AUC_{\text{krv}}$ bila je 0,036 za pefloksacin i 0,05 za norfloksacin [109, 110]. Penetracija norfloksacina nije zavisila od primenjene doze. U ravnotežnom stanju, slobodne koncentracije ofloksacina, fleroksacina i pefloksacina izmerene u intersticijumu mozga primenom mikrodijalize bile su 7 do 30 puta niže od slobodnih koncentracija u serumu. Za sparfloksacin, ispitivanjem na *mdr1a* (-/-) i *wild-type* miševima pokazano je da odsustvo P-glikoproteina povećava prodor sparfloksacina u mozak. Nije bilo razlike u koncentracijama u plazmi kod ova dva soja miševa, ali su koncentracije u intersticijumu mozga bile 4 puta više kod *mdr1a* (-/-) miševa [104]. Ovo potvrđuje tvrdnju da je pasivna difuzija, praćena efluksom preko krvno-moždane barijere, predominantan put eliminacije fluorohinolona [111].

Mikrodijalizom su u kliničkim uslovima uzimani uzorci intersticijalne tečnosti ciprofloksacina, levofloksacina, moksifloksacina, gemifloksacina i ofloksacina u različitim tkivima. Tačni transportni mehanizmi fluorohinolona još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni, zbog toga su rezultati ovih istraživanja od izuzetnog značaja za bolje razumevanje tkivne farmakokinetike fluorisanih hinolona.

Ciprofloksacin se dobro resorbuje nakon oralne primene uprkos hidrofilnosti, što implicira uključenost mehanizama aktivnog transporta u proces apsorpcije [112]. Neki od transportera za koje se smatra da su uključeni u transport ciprofloksacina su P-glikoprotein (P-GP ili MDR-1, efluks pumpa eksprimovana u epitelu creva, ćelija jetre, proksimalnih tubula bubrega i krvno-moždane barijere [113]), *Breast Cancer Resistance* protein (BCRP, poznati i kao MXR ili ABCG2, efluks pumpa lokalizovana na apikalnoj strani enterocita, hepatocita i proksimalnih kanalića bubrega) i organski anjonski transportni polipeptid (OATP, transporter eksprimovan u jetri i drugim tkivima na bazolateralnoj i apikalnoj strani [112]). Inluks transporteri poput OATP1A5 [112] i OATP1A2 [18] su delimično odgovorni za intestinalnu apsorpciju ciprofloksacina. Ne postoji konsenzus da li je

ciprofloksacin supstrat za P-GP: pojedini autori tvrde da P-GP ima minornu ulogu u efluksu ciprofloksacina [114], dok drugi tvrde da polimorfizam gena koji kodiraju P-GP utiče na klirens ciprofloksacina [115]. BCRP je transporter koji ograničava apsorpciju nakon oralne primene i povećava renalnu sekreciju, dovodeći do visokih koncentracija u urinu [116, 117]. Takođe je pokazano da pasivni i aktivni transport doprinose prolasku ciprofloksacina kroz ćelije plućnog epitela, ali usled loše permeacije kroz sekretorne puteve, visoke doze su neophodne za postizanje klinički relevantnih koncentracija u respiratornom traktu [114]. Zbog toga, istraživanja kinetike u ciljanim tkivima neophodna su da bi se odredila razmera u kojoj se ciprofloksacin distribuiše u tkiva. Za merenje koncentracija ciprofloksacina u mišićnom i potkožnom masnom tkivu pacijenata i zdravih dobrovoljaca primenjena je mikrodijaliza. Ciprofloksacin dobro prodire u IT mišića (t_{AUC} odnos 0,92 do 1,33), postičući koncentracije slične onima u plazmi [118]. Prodor ciprofloksacina u IT kože je nešto niži, sa oko 0,55 ukupne koncentracije u plazmi [119], što ukazuje da ne nastaje potpuna ravnoteža između slobodnih koncentracija u plazmi i koži jer je oko 30% ciprofloksacina vezano za proteine.

Ispitivanjima u potkožnom masnom tkivu zdravih volontera dobijeni su konzistentni rezultati sa AUC-om u tkivu koji odgovara 80-90% nivoa slobodne frakcije ciprofloksacina u plazmi [120-122]. Mikrodijalizom su takođe upoređene penetracije ciprofloksacina u IT tkiva nakon parenteralne i oralne primene, i pokazano je da ne postoje razlike u distribuciji nakon različitih puteva primene. Potom je primenom simulacija i *in vitro* modela infekcije, pokazano je da su 400mg *i.v.* i 500mg *p.o.* ekvivalentne i u farmakodinamici tj. efektu na ubijanje bakterija, a ne samo sa farmakokinetikog aspekta [123].

Mikrodijalizom su ispitani i faktori koji mogu uticati na distribuciju ciprofloksacina poput inflamacije tkiva i promena u vaskularnom protoku. Lokalna inflamacija ne utiče na distribuciju ciprofloksacina, odnosi koncentracija u plazmi i potkožnom masnom tkivu su bili slični kod pacijenata sa dijabetesom sa i bez infekcija na ulkusnim promenama [122]. Međutim, kod pacijenata sa perifernom arterijskom

okluzivnom bolešću, koncentracije ciprofloksacina su bile značajno niže u ishemičnom tkivu (mediana, 7, raspon 3,5-13,0) u poređenju sa zdravim tkivom (mediana 11,3, raspon, 3,4-19,0). Nakon perkutane transluminalne angioplastike, nestali su zabeleženi efekti mikrookluzije [120]. *In vitro* simulacije na osnovu *in vivo* tkivnih koncentracija pokazale su da ove razlike dovode i do promena u antimikrobnoj aktivnosti. Stoga, poboljšanje arterijskog protoka povećava distribuciju ciprofloksacina u IT [120]. Zagrevanjem ispitivanog područja i posledičnog povećanja kapilarnog protoka potvrđenog laser doplerskom floumetrijom, takođe je postignuto povećanje distribucije u potkožno masno tkivo kod zdravih dobrovoljaca [124]. Navedeni rezultati idu u prilog teoriji da oštećenja u vaskularnom protoku ograničavaju distribuciju antimikrobnih lekova, što je od posebnog značaja za kritično obolele pacijente gde primena vazopresora može biti faktor koji remeti uobičajenu distribuciju i dovodi do nižih koncentracija antibiotika u perifernim tkivima [125]. Oštećen vaskularni protok usled slabije perfuzije tkiva i oštećene vazodilatacije zbog endotelne disfunkcije i smanjenja relativne veličine kapilarnog korita ograničavajući je faktor za distribuciju ciprofloksacina kod gojaznih osoba [126]. Koncentracije ciprofloksacina u IT se nisu razlikovale između gojaznih i ispitanika sa normalnom telesnom masom nakon doza korigovanih u odnosu na telesnu masu (*i.v.* 2,85 mg/kg), ali odnos koncentracija u plazmi i IT potkožnog masnog tkiva bio je značajno niži kod gojaznih (0,4) u odnosu na ispitanike normalne telesne mase (0,8) [126]. Da bi se postigle odgovarajuće koncentracije u intersticijumu, doze ciprofloksacina kod gojaznih bi trebalo da budu bazirane na telesnoj masi, što dovodi do značajno viših koncentracija u plazmi i povećanog rizika od dozno zavisnih neželjenih dejstava. Sa uobičajenim režimom doziranja, koncentracije ciprofloksacina na mestu infekcije kod gojaznih osoba mogu biti neadekvatne uprkos odgovarajućim nivoima u plazmi [123].

Više ispitivanja kinetike **levofloksacina** u IT različitih tkiva pokazalo je da je ova metoda pogodna za ispitivanje tkivne farmakokinetike levofloksacina, i pružilo informacije o faktorima koji utiču na distribuciju kao i efekata koje to može imati na terapijski odgovor. Teške infekcije identifikovane su

kao jedan od faktora koji utiče na penetraciju levofloksacina u periferna tkiva. Više vrednosti AUC u mišiću i potkožnom masnom tkivu, izmerene su kod zdravih pacijenata [127], nego kod pacijenata sa sepsom. Distribucija kod septičnih pacijenata (0,85 od plazma koncentracije) ipak je bila viša nego što je prethodno zabeleženo za beta-laktame, što se može objasniti akumulacijom levofloksacina u leukocitima i drugim ćelijama koje se ponašaju kao depoi. Zeitlinger i saradnici [127] izmerili su koncentracije levofloksacina u plazmi i poprečno-prugastim mišićima sedam pacijenata sa sepsom nakon doze od 500mg primenjene intravenski, nakon čega su primenili *in vitro* modelovanje za simulaciju ubijanja bakterija na mestu infekcije u odnosu na izmerene koncentracije. Uprkos dobrom prodoru levofloksacina u tkiva, kada su ispitivane tkivne koncentracije levofloksacina na *in vitro* modelu infekcije *P. aeruginosa* (MIK=2 μ g/ml), zabeležene su značajne interindividualne razlike u stopi ubijanja bakterija, dok isti model sa plazma koncentracijama pokazuje odličnu aktivnost levofloksacina. Rezultati su uputili na potrebu za korekcijom doze levofloksacina kod pacijenata sa sepsom izazvanim patogenima poput *P. aeruginosa*. Takođe, ovi rezultati dodatno potvrđuju tvrdnju da se koncentracije u tkivima ne mogu ekstrapolirati na osnovu plazma koncentracija kod septičnih pacijenata. Pored razlika u farmakokinetici, infekcije rezistentnim mikroorganizmima su učestalije u ovoj populaciji, što dodatno smanjuje mogućnost postizanja vrednosti FK/FD indeksa koji koreliraju sa efikasnošću. Podaci o sub-terapijskim koncentracijama antibiotika u tkivima pacijenata sa sepsom i septičnim šokom nakon primene vazopresora postoje za više antibiotika uključujući cefpirom, fosfomicin i piperacilin [128-134]. Teška sepsa i septični šok menjaju farmakokinetiku antibiotika usled primene velikih količina infuzionih rastvora, izmena u cirkulaciji, perfuziji organa i hipoalbuminemiji. Posebno kod hidrofилnih lekova, usled primene rastvora za nadoknadu tečnosti, dolazi do povećanja volumena distribucije, dodatno naglašenog hipoalbuminemijom, što posledično dovodi do još nižih tkivnih koncentracija [132]. Promene volumena distribucije su manje izražene kod lipofilnih antibiotika (poput hinolona, makrolida, tigeciklina i linkozamida) [135], ali farmakokinetika je izmenjena usled promena u klirensu. Smanjen klirens usled hipoperfuzije, ali i porast renalnog

klirensa usled hiperdinamskog cirkulatornog stanja, povećanje slobodne frakcije leka usled hipoalbuminemije su promene koje se mogu očekivati kod ovih pacijenata. Sve spomenuto može dovesti do nižih koncentracija antibiotika na samom mestu infekcije uprkos odgovarajućim koncentracijama postignutim u serumu. Primena mikrodijalize pruža mogućnost prevazilaženja problema povezanih sa velikim varijacijama u farmakokinetici kod septičnih pacijenata.

Već spomenuta činjenica da lokalno zapaljenje ne utiče na prodor fluorohinolona u periferna tkiva [122] potvrđena je i u ispitivanju Belmana i saradnika [136]. Međutim, primećene su velike interindividualne razlike u penetraciji u periferna tkiva, sa koeficijentom varijacije od 82% za odnos $AUC_{tkivo} / AUC_{plazma}$ [136]. Ipak, autori su zaključili da levofloksacin odlično prodire u periferna tkiva i da je izostanak terapijskog odgovora kod pojedinih pacijenata posledica interindividualnih razlika u prodoru na mesto infekcije, što pokazuje značaj određivanja tkivne farmakokinetike levofloksacina.

Primenom mikrodijalize određene su slobodne koncentracije levofloksacina u intersticijumu pluća. Rezultati određivanja farmakokinetike levofloksacina u plućima pacijenata podvrgnutih elektivnim intervencijama na plućima [137] konzistentni su sa onim dobijenim na pacijentima kojima je urađen arteriokoronarni bajpas [138], i visoko reproducibilni nezavisno od populacije na kojoj su sprovedena ispitivanja. Mana mikrodijalize u plućima u kliničkim uslovima je činjenica da je ova procedura ograničena na pacijente podvrgnute operaciji na otvorenom srcu i plućima. Važno je spomenuti da su preklinička i klinička ispitivanja pokazala da se za beta-laktamske antibiotike koncentracije u plućima mogu sa visokom sigurnošću ekstrapolirati iz koncentracija izmerenih u intersticijumu perifernih tkiva, lako dostupnih mikrodijalizi [139-144], što za fluorohinolone, nažalost, nije slučaj. Zeitlinger i saradnici izmerili su 1,5 do 2 puta vrednosti AUC u intersticijumu skeletnih mišića i masnog tkiva zdravih dobrovoljaca u odnosu na AUC u plućima pacijenata podvrgnutih elektivnim operacijama na plućima, iako nisu postojale razlike u koncentraciji levofloksacina u plazmi [137]. Kako nisu zabeležene razlike u maksimalnim koncentracijama u plućima, mišiću i masnom tkivu, primećena razlika u AUC pripisana je pojačanom klirensu levofloksacina iz pluća, što je potvrđeno i kraćim

poluvremenom eliminacije iz pluća u odnosu na mišić i masno tkivo. Moguće objašnjenje za ovaj fenomen je razlika u kapilarnom protoku u plućima i perifernim tkivima [137].

Kod pacijenata podvrgnutim operaciji na otvorenom srcu, $fAUC_{\text{pluća}}/AUC_{\text{total-plazma}}$ za levofloksacin iznosio je 0,6, sa malim interindividualnim razlikama [138]. Ista istraživačka grupa ispitala je i uticaj perioperativne atelektaze na penetraciju levofloksacina u pluća [145] i pokazano je da atelektaza utiče negativno na prodor levofloksacina u pluća.

Sve navedene studije, na osnovu FK/FD proračuna baziranih na slobodnim koncentracijama levofloksacina, došle su do zaključka da levofloksacin u standardnoj dozi ne postiže dovoljno visoke koncentracije u plućima za eradikaciju *P. aeruginosa* i *K. pneumoniae*.

Značaj slobodnih tkivnih koncentracija antibiotika u plućnom intersticijumu je nešto o čemu još uvek ne postoji konsenzus. Najveći broj patogena dospeva u donje respiratorne puteve putem bronha i infekcija se dešava u alveolarnim šupljinama. Više autora je pokazalo da su koncentracije fluorohinolona u tečnosti koja oblaže epitel alveola višestruko više od nivoa u plazmi [146-149]. Transporteri uključeni u distribuciju antibiotika u plućni trakt uključuju P-GP, organske katjonske transportere (OCTs), organske anjonske transportere (OATs) i transportne polipeptide organskih anjona (OATPs) [112]. Kako je levofloksacin supstrat za efluks posredovan P-GP, ekskrecija putem P-GP bi mogla objasniti više koncentracije u alveolama u odnosu na plazmu. Ovo je takođe posledica oslobađanja levofloksacina iz intracelularnih depoa – fluorohinoloni se akumuliraju u fagocitima, postičući koncentracije 10 do 20 puta više nego u plazmi [32]. Stoga, za najveći broj infekcija lociranih u šupljinama alveola, koncentracije levofloksacina u intersticijumu pluća nisu od presudnog značaja. Koncentrisanje levofloksacina intracelularno povoljno je i za infekcije izazvane intracelularnim bakterijama poput sojeva *Legionella* spp. i *Chlamydia pneumoniae*. Ipak, napredovanjem infekcija prvobitno lokalizovanih pretežno u unutrašnjosti alveola, konsolidacijom parenhima, infekcija zahvata i intersticijum pluća. Stoga, kod teških pneumonija, procena efikasnosti levofloksacina isključivo na osnovu koncentracija izmerenih u traheobronhijalnom aspiratu, može biti netačna.

Podaci o distribuciji levofloksacina u pluća dobijeni primenom mikrodijalize pokazali su da levofloksacin postiže visoke koncentracije kako u traheobronhijalnom aspiratu tako i u intersticijumu pluća, ali velike interindividualne razlike u tkivnoj farmakokinetici levofloksacina ostavljaju prostora za dalja istraživanja u cilju optimizacije lečenja.

Moksifloksacin je sintetički fluorohinolon četvrte generacije koji se dobro resorbuje posle oralne primene, pretežno podleže glukuronidaciji i sulfataciji u jetri i eliminaciji nastalih konjugata putem urina (glukuronid-konjugati) i fecesa (sulfat-konjugati). Moksifloksacin je lipofilan, vezuje se za proteine u niskom procentu, ima velik volumen distribucije što bi sve zajedno trebalo da dovede do odlične distribucije u tkiva. Moksifloksacin je indikovano u infekcijama kože, respiratornog trakta i komplikovanih intra-abdominalnih infekcija, sa izraženijim dejstvom na Gram-pozitivne bakterije i anaerobe u poređenju sa levofloksacinom i ciprofloksacinom [2]. Ispitivanjem koncentracija moksifloksacina u potkožnom masnom tkivu 12 zdravih dobrovoljaca nakon primene u dozi od 400 mg *p.o.* i *i.v.* pokazala je da dolazi do skoro potpunog ekvilibrijuma između slobodnih koncentracija u plazmi, mišićnom i potkožnom masnom tkivu [2, 150], sa odnosom AUC od 0,81 to 0,86. Ipak, kako je ovo ispitivanje rađeno na zdravim dobrovoljcima, nije ih nužno moguće preneti na patološka stanja poput zapaljenja koja mogu uticati na kinetiku lekova. Stoga, Joukhadar i saradnici, uporedili su penetraciju moksifloksacina u potkožno masno tkivo kod zdravih dobrovoljaca i pacijenata sa dijabetesom koji su zahtevali primenu antimikrobne terapije u zdravom tkivu i inflamiranom tkivu na rubu kruralnih ulkusa. Kod zdravih pacijenata, prodor moksifloksacina bio je veći u inflamiranom ($fAUC_{tkivo/plazma}=1,2$) nego u zdravom potkožnom masnom tkivu ($fAUC_{tkivo/plazma}=0,5$). Kod pacijenata sa dijabetesom, primećeno je obrnuto - prodor moksifloksacina bio je manji u inflamiranom ($fAUC_{tkivo/plazma}=0,5$) nego u zdravom potkožnom masnom tkivu ($fAUC_{tkivo/plazma}=0,9$). Ograničena penetracija moksifloksacina u inflamirano potkožno masno tkivo kod obolelih od dijabetesa prisutan je usled izmena u vaskularnom protoku koji je posledica mikro- i makroangiopatskih promena do kojih dolazi zbog dugogodišnje osnovne bolesti. Kao što je već spomenuto, uticaj krvnog protoka na

distribuciju fluorohinolona već je potvrđen na primeru ciprofloksacina [120, 124]. Farmakokinetско ispitivanje moksifloksacina koje je sprovedeno sakupljanjem uzoraka biopsije tkiva i određivanjem koncentracija u homogenatu tkiva takođe je pokazalo da su koncentracije moksifloksacina u tkivima pacijenata obolelih od dijabetesa niže u odnosu na zdravu populaciju [151].

1.2 Rezistencija na fluorohinolone

U februaru 2017. godine, Svetska zdravstvena organizacija objavila je listu prioriternih patogena (Priority 1: CRITICAL), koji najviše ugrožavaju ljudsko zdravlje usled multirezistencije, među kojima su bakterije soja *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* i *Enterobacteriaceae* (uključujući bakterije *Escherichia coli* i *Salmonellae*) identifikovani kao glavni uzroci teških nozokomijalnih infekcija, za koje su istraživanja novih lekova neophodna [152]. Prema podacima CAESAR-a (eng. *Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance*) rezistencija na antibiotike predstavlja ozbiljan problem, kako u svetu, tako i u Srbiji. Čak 39% izolata *E. coli*, 59% izolata *P. aeruginosa*, 73% izolata *K. pneumoniae* i većina (97%) izolata soja *Acinetobacter* spp. izolovanih u Srbiji u 2018. rezistentno je na fluorohinolone [153]. Mehanizmi rezistencije na fluorohinolone povezani su sa mutacijama u genima odgovornim za produkciju topoizomeraza. Opisano je više gena povezanih sa rezistencijom na hinolone, od kojih su mutacije gena koji kodiraju podjedinice bakterijske giraze, *gyrA* i *gyrB* relevantni za rezistenciju Gram-negativnih bakterija dok su kod Gram-pozitivnih bakterija mutacije prisutne u genima *parC* and *parR*, koji kodiraju podjedinice bakterijske topoizomeraze IV. Otkriće efluks pumpi odgovornih za višestruku rezistenciju na lekove (eng. *multidrug resistance*, MDR), i identifikacija njihovih supstrata, dovela je do promene stavova da su mutacije gena odgovornih za produkciju enzima glavni mehanizam rezistencije na hinolone.

1.2.1 Efluks pumpe bakterija

Bakterijske MDR efluks pumpe, uprkos sintetskoj prirodi hinolona, sposobne su da aktivno izbacuju fluorohinolone iz unutrašnjosti bakterijske ćelije, posledično smanjujući intracelularne koncentracije leka i čineći bakteriju otpornom na dejstvo antibiotika. Efluks igra važnu ulogu i u urođenoj i u stečenoj rezistenciji bakterija na antibiotike [154]. Efluks pumpe se dele na primarne i sekundarne aktivne transportere. Primarni aktivni transporteri koriste za aktivni transport energiju nastalu hidrolizom ATP, transportujući supstance nasuprot koncentracionom gradijentu, dok sekundarni transporteri koriste energiju nastalu gradijentom H^+ i Na^+ jona na membrani. Sekundarni transporteri se mogu ponašati kao sinporteri, transportujući supstrat i jone u istom smeru i antiporteri koji prenose supstrat i jone u suprotnim smerovima [155]. Transporteri bakterija se klasifikuju u 6 familija: *ATP-binding cassette* (ABC), *major facilitator super family* (MFS), *resistance-nodulation-cell division transporter super family* (RND), *small multidrug resistant transporter super family* (SMR), *proteobacterial antimicrobial compound efflux family* (PACE) *multiple antimicrobial extrusion protein super family* (MATE) [156-161]. MFS, RND i SMR pripadaju H^+ /supstrat antiporterima dok su MATE transporteri Na^+ /supstrat antiporteri. ABC su primarni transporteri, koji poseduju homologe i na eukariotskim ćelijama a kao što je već spomenuto, za transport koriste energiju nastalu hidrolizom ATP-a. PACE transporteri su tek nedavno identifikovani kod Gram-negativnih bakterija [162], njihova trodimenzionalna struktura još uvek nije poznata [163], kao ni tačan način transporta supstrata, ali se smatra da najverovatnije uključuje elektrohemijski gradijent. Neke od dobro ispitanih efluks pumpi klasa, sa identifikovanom kristalografskom strukturom koje su relevantne za rezistenciju na fluorohinolone su NorA iz MFS superfamilije transportera na *S. aureus* [164, 165] i transportere iz RND superfamilije na Gram-negativnim poput MexAB–OprM, MexA (MFP), MexB (RND) i OprM (OMF) pumpi na *P. aeruginosa*, i AcrAB na *E. coli* [166]. Nakon izlaganja antibioticima, selekcijom mutanata sa pojačanom ekspresijom EP dolazi do gubitka efikasnosti fluorohinolona [164, 165, 167].

Svega nekolicina novih grupa antibiotika sa novim mehanizmom dejstva ušlo je u kliničku primenu poslednjih decenija, poput oksazolidinona i lipopetida, aktivnih isključivo protiv Gram- pozitivnih bakterija. Razlozi za smanjen broj istraživanja antibiotika od strane farmaceutske industrije su, pre svega, ekonomske prirode. Antibiotici se koriste kratko vreme tokom trajanja infekcije, a primena novoregistrovanih antibiotika je ograničena na situacije gde već dostupni lekovi nisu efikasni, što dovodi do nedovoljne isplativosti istraživanja novih antibiotika u odnosu na lekove za različite hronične bolesti. U svetlu rastuće rezistencije na fluorohinolone, modifikacija aktivnosti efluks pumpi, u cilju smanjenja izbacivanja leka iz bakterijske ćelije, i postizanja visokih koncentracija unutar ćelije jedna je od strategija kojom se može očuvati aktivnost trenutno dostupnih lekova i kupiti dragoceno vreme neophodno za identifikaciju, razvoj, ispitivanje i stavljanje u promet novih antibiotika. Ovo je posebno značajno za Gram-negativne bakterije gde su kod multirezistentnih sojeva terapijske opcije dodatno sužene i ograničene na lekove sa nepovoljnim profilom neželjenih dejstava. Tako je identifikovano više lekova koji mogu da utiču na efluks pumpe bakterija, od kojih su posebno intenzivno ispitivane različite supstance biljnog porekla [155, 168-170].

1.2.1 Inhibitori efluks pumpe

Biljke proizvode supstance sa antimikrobnim efektom kao samoodbranu od gljivičnih i bakterijskih infekcija. Supstance biljnog porekla mogu povratiti efikasnost konvencionalnih antibiotika blokirajući aktivnost bakterijskih efluks pumpi i omogućavajući konvencionalnim antibioticima da postignu koncentracije dovoljne za antibakterijsko dejstvo u unutrašnjosti ćelije [155]. Taninska kiselina pokazuje sinergističko dejstvo kada se daje zajedno sa antibioticima, slično dokazanim inhibitorima efluks pumpe. Ovaj efekat primećen je na NorA efluks pumpi na bakteriji *S. aureus*, povezane sa rezistencijom na fluorohinolone kod ovog soja [168]. Studija koja je ispitivala uticaj biljnog alkaloida rezerpina na bakterijske EP pokazala je da rezerpin povećava osetljivost Gram-pozitivnih bakterija na fluorohinolone. Dodatak rezerpina doveo je do četvorostrukog smanjenja vrednosti IC_{50} i MIK za sparfloksacin, moksifloksacin i ciprofloksacin. Ovaj efekat bio je posledica inhibicije MSAF i ABC

transportera [171, 172]. Epigalokatehin-galat, izolovan iz ekstrakta zelenog čaja ispitivan je na sojevima *S. aureus* rezistentnim na tetracikline. Ovaj katehin je inhibisao NorA i Tet(K) EP na *S. aureus* i doveo do povećanja intracelularnih koncentracija tetraciklina [173]. Shiu i saradnici su ispitivali uticaj olimpicina, izolovanog iz biljke *Hypericum olympicum* na osetljivost MRSA i multirezistentnog *S. aureus*-a. Olimpicin je pokazao koncentracijski zavisnu inhibiciju EP [174, 175]. Pojedine supstance biljnog porekla su patentirane kao inhibitori EP. Neki od primera su tetranidrin i likvirtin, patentirani kao EP za sojeve *E. coli* i geraniol patentiran kao EP inhibitor za sojeve enterobakter [176]. Kumarini su pokazali sposobnost potencijacije efikasnosti norfloksacina protiv sojeva *S. aureus* i MRSA putem inhibicije NorA pumpe, [177]. Konezin, steroidni alkaloid izolovan iz biljke *Holarrhena antidysenterica* pokazao je sinergističko dejstvo sa cefotaksimom, levofloksacinom i tetraciklinima smanjujući vrednosti MİK kod *P. aeruginosa* putem inhibicije MexAB-OprM efluks pumpe [178]. Aparna i saradnici su ispitivali nove potencijalne inhibitore EP metodama molekularnog dokinga [179]. Daidzein, izoflavon izolovan iz ploda soje (*Glycine max* L.) se izdvojio kao posebno efikasan.

1.2.2 Daidzein

Daidzein (7-hidroksi-3-(4-hidroksifenil)-4Hhromen-4-on) se sintetiše u biljkama putem fenil propanoida kao odbrambena reakcija na različite patogene [180]. Biljke koje su bogate daidzeinom su pre svega crvena detelina (*Trifolium pratense*), alfalfa (*Medicago sativa*), soja (*Glycine max* L.), i pojedine leguminoze [181]. Soja i proizvodi od soje smatraju se najboljim izvorom daidzeina, ali tačna količina varira od uslova gajenja, sorte soje i godine žetve. U fermentisanim proizvodima od soje, količina daidzeina je viša nego u nefermentisanim, jer fermentacija povećava udeo aktivnih, aglikonskih formi daidzeina [182]. Ovaj proces se dešava pod dejstvom različitih mikroorganizama tokom procesa fermentacije. Pored proizvoda od soje, daidzein je prisutan u nutritivnim suplementima, pićima za oporavak posle treninga kao i u adaptiranom mleku [183].

Daidzein pripada klasi jedinjenja poznatih kao izoflavonoidi koji sadrži benzenski prsten povezan na hromonsku jedinicu [181, 183]. Daidzein je klasifikovan i kao fitoestrogen zbog njegove strukturne i funkcionalne sličnosti sa endogenim estrogenom. U biljkama, daidzein postoji u formi konjugovanoj sa glukozom, ali se opisuju i 600-*O*-malonil ili 600-*O*-acetilglukoza konjugati [184]. Glikozid daidzeina, poznat kao daidzin, biološki je neaktivan, a nakon unošenja u organizam, pod uticajem crevne mikroflore, dolazi do biokonverzije daidzeina. Enzim laktaza u tankom crevu odnosno β -glukozidaze koje luče bakterije soja bifidobakterija i laktobacilus kidaju glikozidne veze u daidzeinu dovodeći do nastanka bioaktivne forme, daidzeina [185]. Oslobođeni aglikon, daidzein podleže apsorpciji i posledičnoj glukuronidaciji ili se dalje metaboliše pod uticajem crevne mikroflore. Pod dejstvom crevne mikroflore nastaje više derivata daidzeina, uključujući *O*-desmetilangolensin (*O*-DMA, 20, 40, 400-trihidroksi- α -metil dezoksibenzoin), DHD (40,7-dihidroksiizoflavanon) i cis-4-OH-ekvol (407-dihidroksiizoflavan-4-ol) [186]. Kada dospe u sistemsku cirkulaciju, daidzein se vezuje za proteine plazme u visokom procentu (>85%). Distribuiše se u tkiva bubrega, jetre, mišića, placentu i dojke. Daidzein prolazi krvno-moždanu barijeru i postiže merljive koncentracije u mozgu sat vremena nakon administracije, distribuišući se u više regija mozga uključujući hipokampus, strijatum, koru velikog mozga, mali mozak moždano stablo i hipotalamus. U jetri, daidzein podleže glukuronidaciji, a konjugati se ili izlučuju urinom nepromenjeni ili putem žuči gde podležu enterohepatičnoj recirkulaciji. Postoje velike interindividualne razlike u metabolizmu daidzeina, koje su velikim delom uslovljene navikama u ishrani i kompozicijom crevne mikroflore. Uzrast takođe utiče na kinetiku daidzeina – apsorpcija je bolja kod dece u odnosu na odrasle. Daidzein i njegovi derivati ispoljavaju antioksidantno i antiinflamatorno dejstvo. Zabeleženo je stimulatívno dejstvo na superoksid dismutazu, katalazu, mRNA i ekspresiju proteina na ćelijama HepG2 humanog hepatocelularnog karcinoma, koje je bilo najizraženije za ekvol i *O*-DMA [187, 188]. Genistein i daidzein inhibišu ključne enzime u metabolizmu steroida, inhibišući konjugaciju estrogena i prekursora, dovodeći do promena nivoa steroidnih hormona. Ovaj efekat je dozno zavisán [189].

Daidzein utiče i na kontraktilnu disfunkciju miokarda, uz smanjenje nivoa tumor nekrosis faktora i interleukina 6 u plazmi. Zabeleženo je i smanjenje aktivnosti mijeloperoksidaze, nivoa malonilaledhida, koji je proksi za nivo lipidne peroksidacije ćelijskih membrana i infiltraciju neutrofila. Primećena je inhibicija apoptoze u ćelijama miokarda pacova, a mehanizam odgovoran za ovaj efekat uključuje direktno smanjenja oštećenja i prekida integriteta niti DNK i aktivnosti kaspaze-3 [187]. Daidzein i njegovi metaboliti imaju brojne pozitivne efekte na zdravlje ljudi smanjujući učestalost i težinu više hroničnih bolesti, uključujući kardio-vaskularna oboljenja, rak dojke i prostate, simptome menopauze i gubitak koštane gustine. Nije iznenađujuće da je daidzein prisutan u različitim suplementima baziranim na soji koji pokazuju visoku bezbednost i čestu kliničku primenu.

Pored prethodno opisanih efekata, kao što je spomenuto, daidzein a i drugi izoflavoni se ispituju i u pravcu razvoja novih terapijskih opcija za infekcije, kako virusne tako i bakterijske. Ispitivanjem molekularnih interakcija različitih fitohemikalija sa ciljnim proteinima EP na Gram-negativnim bakterijama pokazan je afinitet daidzeina za efluks pumpe sojeva *E. coli* i *P. aeruginosa*. Inhibitorski efekat daidzeina na EP je potvrđen i u *in vitro* ispitivanjima. Na sojevima sa pojačanom ekspresijom EP, daidzein je ispoljio sinergističko dejstvo sa karbenicilinom i levofloksacinom. Kombinacija levofloksacina i daidzeina imala je sinergističko dejstvo na sojeve *P. aeruginosa* (FIK index=0,27) i *E. coli* (FIK index=0,13) [179]. Aparna i saradnici su primenom testa sa etidijum bromidom dokazali da je ovaj sinergizam posledica inhibicije EP. Daidzein je povećao intracelularnu akumulaciju etidijum bromida (fluorescentnog EP supstrata) u bakterijskim ćelijama. Daidzein je takođe pokazao modulatorno dejstvo na efluks pumpe na *Mycobacterium smegmatis*[190]. Pored antibakterijskog dejstva, daidzein je pokazao i druga farmakološka dejstva koja u svojoj osnovi imaju sličan mehanizam. Studija na kulturama ćelija je dokazala da daidzein povećava osetljivost ćelija humanog cervikalnog karcinoma sa pojačanom ekspresijom P-GP na antitumorske lekove [191].

Višegodišnja klinička primena, povoljan profil neželjenih dejstava i podaci iz *in vitro* studija o stupanju u interakcije sa efluks pumpama, čine daidzein pogodnim kandidatom za poboljšanja

terapijske efikasnosti levofloksacina. Identifikacija netoksične, bezbedne supstance koja bi mogla povratiti ili pojačati antibakterijsko dejstvo levofloksacina predstavljala bi značajan doprinos u savremenoj antiinfektivnoj terapiji [192]. Primena levofloksacina u kombinaciji sa EP inhibitorima jedna je od strategija za povećanje njegove efikasnosti [193]. Kao što je spomenuto, daidzein utiče na transportne proteine bakterija i dejstvo pojedinih antibiotika. Inhibicijom bakterijskih EP daidzein može dovesti do povećanja intracelularnih koncentracija levofloksacina [193, 194]. Povećanje intracelularnih koncentracija levofloksacina dovodi do smanjenja vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija. Ovo smanjenje vrednosti MIK olakšava postizanje adekvatnih vrednosti FK/FD indeksa značajnih za efikasnost fluorohinolona. Da bi u *in vivo* uslovima daidzein ispoljio ovo dejstvo, on mora postizati odgovarajuće slobodne koncentracije u tkivima [195]. Podaci o farmakokinetici daidzeina su ograničeni, a o slobodnim koncentracijama koje on postiže u tkivima nema podataka. Takođe, ne postoje podaci o bezbednosti zajedničke primene daidzeina i levofloksacina. Stoga, postoji potreba za daljim *in vivo* i *in vitro* ispitivanjima kako bi se procenila mogućnost primene daidzeina kao bezbednog, efikasnog i potencijalnog klinički primenjivog inhibitora EP.

2. CILJEVI I HIPOTEZE

Ciljevi istraživanja su:

1. Ispitati prisustvo daidzeina u intersticijalnoj tečnosti mišićnog tkiva uzorkovanog mikrodijaliznom metodom
2. Ispitati uticaj daidzeina na intersticijalne i tkivne koncentracije levofloksacina
3. Ispitati uticaj kombinacije daidzeina i levofloksacina na biohemijske (serumska koncentracija aspartat i alanin aminotransferase, ureje i kreatinina) i histološke (standardna hematoksilin eozin metoda bojenja tkiva jetre i bubrega) parametre toksičnosti
4. Odrediti uticaj daidzeina na *in vitro* osetljivost bakterija na levofloksacin
5. Odrediti vrednosti FK/FD indeksa povezanih sa efikasnošću levofloksacina primenjenog zajedno sa daidzeinom

Hipoteze koje smo postavili su:

1. Daidzein je prisutan u intersticijalnoj tečnosti mišićnog tkiva uzorkovanog mikrodijaliznom metodom
2. Primena daidzeina ne utiče na intersticijalne i tkivne koncentracije levofloksacina
3. Zajednička primena daidzeina i levofloksacina ne utiče na biohemijske (serumska koncentracija aspartat i alanin aminotransferaze) i histološke (standardna hematoksilin eozin metoda bojenja tkiva jetre i bubrega) parametre toksičnosti
4. Daidzein dovodi do povećanja *in vitro* osetljivosti testiranih bakterija na levofloksacin
5. Primena daidzeina povoljno utiče na vrednosti FK/FD indeksa efikasnosti levofloksacina

3. MATERIJAL I METODE

Istraživanje se sastojalo od 4 dela:

- a) eksperimenti na laboratorijskim životinjama u cilju određivanja farmakokinetike levofloksacina i daidzeina pojedinačno i u kombinaciji, u intersticijalnoj tečnosti poprečno-prugastog mišića i plazmi kao i u uzorcima organa i tkiva
- b) određivanje uticaja zajedničke primene navedenih supstanci na parametre jetrene i bubrežne funkcije, kao i tkivnu arhitektoniku u cilju procene bezbednosti konkomitantne administracije
- c) mikrobiološka ispitivanja uticaja daidzeina na osetljivost bakterija na levofloksacin u *in vitro* uslovima
- d) *in silico* ispitivanja interakcije daidzein-levofloksacin

3.1 Materijal

3.1.1 Hemikalije i reagensi

Levofloksacin hidrohlorid (HPLC čistoća ~ 98%), daidzein (HPLC čistoća ~ 98%), uretan (etil karbamat, $\geq 99\%$) i indikator rasta 2,3,5-Triphenyl-tetrazolium hlorid (TTC) su proizvedeni od strane firme Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Acetonitril, metanol i voda čistoće za tečnu hromatografiju pod visokim pritiskom bili su od proizvođača JT Baker (USA). Trietanolamin, formalin i fosforna kiselina proizvedeni su od strane firme Merck (Darmstadt, Nemačka). Heparin (5000IU/ml) je nabavljen od proizvođača Galenika (Beograd, R. Srbija). Podloga za rast bakterija (Mueller Hinton hranljivi agar i Mueller Hinton bujon) nabavljeni su od proizvođača Torlak (Beograd, R. Srbija).

3.1.2 Mikrodijalizni sistem

Mikrodijalizni sistem se sastojao od: CMA 402 pumpe sa *gas-tight* špricem, CMA 20 mikrodijaliznih katetera (4 mm dužina membrane, 100 kDa *cutoff*) i CMA 142 frakcionog kolektora (CMA Microdialysis, Harvard Apparatus, Holliston, MA). Za perfuziju tkiva korišćena je CMA perfuziona tečnost za periferna tkiva (CMA Microdialysis, Harvard Apparatus, Holliston, MA). CMA 402 pumpa ima dva nosača za graduisane špriceve i dizajnirana je specijalno za mikrodijalizne eksperimente, dozvoljavajući protok od 0,1-20 $\mu\text{l}/\text{min}$. U eksperimentima su korišćeni kalibrisani stakleni špricevi zapremine 1 ml. Za izvođenje *in vitro* ispitivanja korišćen je dodatak za mikrodijalizni sistem (CMA 402 Syringe Pump with Accessory Kit). Mikrodijalizni kateteri CMA 20 su linearni kateteri namenjeni plasiranju u periferna tkiva, dužine membrane od 4mm, sa internim volumenima *inlet* dela od 1,4 μl i *outlet* dela volumena od 3 μl .

3.1.3 Eksperimentalne životinje

Za izvođenje *in vivo* ispitivanja korišćeni su beli laboratorijski pacovi soja *Wistar*, muškog pola, telesne mase 300-400 grama odabrani metodom slučajnog izbora iz okota sa Vojnomedicinske akademije u Beogradu (n=42). Pre samog eksperimenta životinje su boravile 14 dana u standardnim laboratorijskim uslovima u štali Zavoda za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu u cilju aklimatizacije. Briga o životinjama i sve eksperimentalne procedure su sprovedene u skladu sa etičkim načelima rada sa laboratorijskim životinjama, Zakonom o dobrobiti oglednih životinja i regulativom Evropske Unije (2010/63/EU) i ARRIVE smernicama. Istraživanje je odobreno od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Univerziteta u Novom Sadu (broj odobrenja: 01-78/31). Temperatura je bila sobna (20-25° C), vlažnost vazduha 55% \pm 1,5%, sa ciklusom svetlost – tama po 12 sati, životinjama je bio omogućen slobodan pristup vodi dok je pristup hrani bio onemogućen 10 sati pre izvođenja oglada, kako bi se izbegle eventualne interakcije hrane sa supstancom koja je bila primenjena.

3.1.4 Mikrobiološki materijal

Sojevi poreklom iz humanog patološkog materijala korišćeni u ispitivanju uticaja daidzeina na osetljivost bakterija na levofloksacin u *in vitro* uslovima su dobijeni iz Službe za mikrobiološku dijagnostiku, Instituta za plućne bolesti Vojvodine u Sremskoj Kamenici. Dobijeno je ukupno 8 sojeva čija je identifikacija do nivoa vrste sprovedena standardnim bakteriološkim (morfološkim, kulturelnim i fiziološko-biohemijским) metodama. Osetljivost na antibiotike sojeva korišćenih u istraživanju ispitana je standardnom disk-difuzionom agar metodom. Sve bakterije su okarakterisane kao osetljive, umereno osetljive ili rezistentne na testirane konvencionalne antibiotike prema EUCAST preporukama [196]. U ispitivanjima su korišćeni klinički izolati bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (2 R (na levofloksacin), 1 S), *Escherichia coli* (2 S, 1 R) i *Staphylococcus aureus* (1 R i 1 MRSA).

3.2 Metode

3.2.1 *In vitro* ispitivanja

3.2.1.1 Retrodijaliza

Pre pristupanja *in vivo* ogledima sprovedena je kalibracija da bi se odredio stepen prolaska ispitivanih supstanci kroz membrane mikrodijaliznog katetera pri standardnim uslovima ispitivanja (temperatura 37° C, brzina protoka 1 µg/ml) metodom *in vitro* retrodijalize. Kalibracija je bila sprovedena merenjem prolaska ispitivane supstance iz epruvete koja je sadržala poznatu koncentraciju ispitivanog leka (2 µg/ml za levofloksacin i 1 µg/ml za daidzein) u lumen mikrodijaliznog katetera, tj. određivanjem razlike u koncentraciji u ispitivanom rastvoru i dijalizatu. Nakon perioda od 30 minuta za postizanje ekvilibrijuma, uzorci su uzimani na 20 minuta tokom 2 sata i zamrzavani na -20°C do analize. Relativno preuzimanje leka (eng. *relative recovery* – RR) izračunato je po formuli:

$$RR (\%) = 100 - 100 \times \frac{\text{Koncentracija(dijalizat)}}{\text{Koncentracija(perfuzat)}}$$

3.2.1.2 PAMPA test permeabilnosti

Za ispitivanje permeabilnosti levofloksacina, samog i u kombinaciji sa rastućim koncentracijama daidzeina, primenjen je test permeabilnosti na paralelnim veštačkim membranama (engl. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*, PAMPA). Hidrofobne MultiScreen PVDF mikrofiltracione ploče sa 96 odeljaka i dijametrom pora od 0,45 μm (Millipore, SAD) su korišćene kao akceptorske ploče i kao nosači za veštačku membranu. Svaki odeljak akceptorske ploče je impregniran sa po 6 μL 2% rastvora lecitina soje u n-dodekanu i nakon otparavanja rastvarača je formirana veštačka membrane [197]. U odgovarajuće odeljke akceptorske ploče je dodato po 200 μL 10 mM fosfatnog pufera pH 7,4, dok je u odeljke donorske ploče MultiScreen Transport Receiver Plate (Millipore, SAD) dodato po 300 μL rastvora ispitivanih jedinjenja u istom puferu. Ispitivane grupe su uključivale: levofloksacin 50 μM (grupa L), levofloksacin 50 μM sa 10 μM daidzeina (grupa LD10), levofloksacin 50 μM sa 25 μM daidzeina (grupa LD25) i levofloksacin 50 μM sa 50 μM daidzeina (grupa LD50). Sve analize su rađene u triplikatu.

Poklapanjem donorske ploče akceptorskom pločom započeta je inkubacija. Akceptorska ploča je prekrivena odgovarajućim poklopcem kako bi se sprečilo isparavanje rastvarača. Nakon inkubacije u trajanju od 2 h, 4 h i 6 h na sobnoj temperaturi uz konstantno blago mešanje, ploče su rastavljene i vršeno je uzorkovanje iz svakog donorskog i akceptorskog odeljka kako bi se dalje odredila koncentracija levofloksacina u oba kompartmana pomoću HPLC metode.

Nakon određivanja koncentracija levofloksacina u donorskom i akceptorskom odeljku, izračunati su prividni koeficijenti permeabilnosti (P_{app}) i izraženi u jedinicama cm/s, na osnovu jednačine:

$$P_{app} = C_x \left[-\ln \left(1 - \frac{[Ca]}{[C_{eq}]} \right) \right];$$

$$C = \frac{V_d \times V_a}{(V_d + V_a) \times S \times t}$$

gde je:

C_a - koncentracija u akceptorskom odeljku;

C_{eq} - koncentracija ekvilibrijuma;

V_a - zapremina rastvora u akceptorskim odeljcima (mL);

V_d - zapremina rastvora u donorskim odeljcima (mL);

t - vreme inkubacije (s);

S - površina veštačke membrane (cm^2).

Izračunato je da površina veštačke membrane iznosi $0,24 \text{ cm}^2$, s obzirom da prema podacima proizvođača, filter membrane akceptorske ploče imaju površinu od $0,32 \text{ cm}^2$ i poroznost od 75%.

3.2.2 *In vivo* ispitivanja

3.2.2.1 Tretman eksperimentalnih životinja

Sedam dana pre izvođenja oglada životinje su dobijale hranu koja je imala nizak sadržaj soje i izoflavona drugog porekla. Svim životinja u svakoj grupi su uzeti uzorci krvi i slobodne tkivne tečnosti iz mišića buta primenom mikrodijalize, a nakon žrtvovanja su uzeti i uzorci tkiva. Levofloksacin je bio aplikovan oralnim putem kao rastvor (koncentracije 25 mg/ml), a zapremina koja je aplikovana životinjama je preračunata na osnovu merenja telesne mase na dan oglada. Daidzein je primenjivan kao suspenzija, oralnim putem, tako što je za svaku životinju preračunata doza na sam dan oglada, nakon merenja telesne mase, odmerena je odgovarajuća količina supstance i suspendovana sa $0,75 \text{ ml}$ destilovane vode. Nakon toga, u epruvetu je dodato još $0,25 \text{ ml}$ destilovane vode i nakon mućkanja i ta količina je primenjena životinjama, da bi se smanjilo rasipanje. Primenjenje doze su bile bazirane na preporučenim humanim dozama levofloksacina i daidzeina [198, 199]. Doze primenjenih supstanci su izračunate primenom FDA (eng. *Food and Drug Administration*) preporuka za konverziju između humanih i životinjskih doza, za čoveka mase 70kg [200]:

$$\text{Doza leka za pacova (mg/kg)} = \frac{\text{ekvivalentna doza za čoveka (mg/kg)}}{\left(\frac{\text{masa životinje(kg)}}{\text{masa čoveka (kg)}}\right)^{0,33}}$$

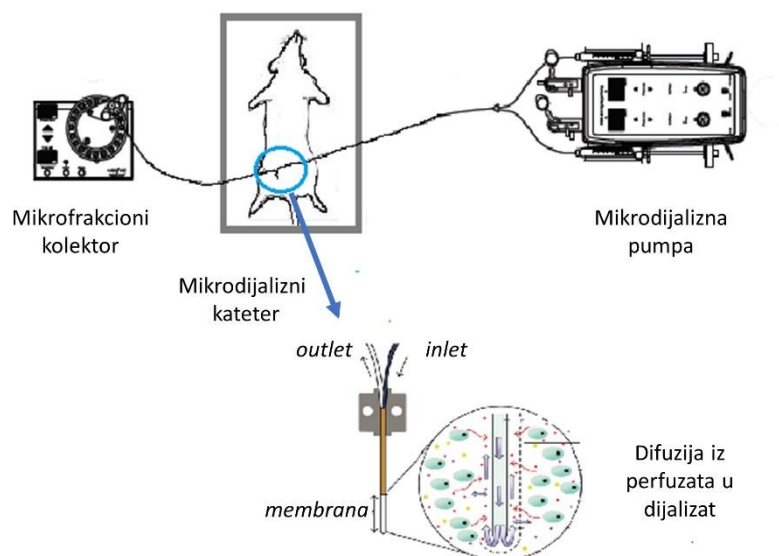
Raspored grupa eksperimentalnih životinja je predstavljen u **tabeli 3**. Sve supstance su primenjene *per os* u putem sonde, u jednoj dozi. Životinje su nasumično raspoređene u različite grupe.

Tabela 3. Prikaz grupa eksperimentalnih životinja

Br.	Šifra	Lek	Doza	Broj životinja
1	D1	daidzein	1,9 mg/kg	6
2	D2	daidzein	3,8 mg/kg	6
3	D3	daidzein	5,7 mg/kg	6
4	LVX	levofloksacin	48 mg/kg	6
5	D1LVX	daidzein + levofloksacin	1,9 mg/kg + 48 mg/kg	6
6	D2LVX	daidzein + levofloksacin	3,8 mg/kg + 48 mg/kg	6
7	D3LVX	daidzein + levofloksacin	5,7 mg/kg + 48 mg/kg	6

3.2.2.2 Prikupljanje uzoraka intersticijalne tečnosti - mikrodijaliza

Na dan ogleđa, nakon merenja telesne mase, životinje su bile uvedene u anesteziju uretanom (1,5 mg/kg, intraperitonealno). Nakon gubitka refleksa bola na prednjoj šapi, životinja je fiksirana na hirurški stalak. Pre aplikovanja bilo kojih ispitivanih supstanci, pacovima je uveden mikrodijalizni kateter (prečnika 0,5 mm) u butni mišić. Za uvođenje mikrodijaliznog katetera je načinjen minimalni rez (3-5 mm) na koži koja je prethodno obrijana. Vrh mikrodijaliznog katetera dužine 24 mm, mikrodijalizne membrane od 4 mm i prečnika 0,5 mm je bio uveden u mišićno tkivo i fiksiran sa dva šava za kožu hirurškim koncem, kroz postojeće, za to predviđene otvore na ivicama mikrodijaliznog katetera. Nakon plasiranja i fiksiranja katetera, pomoću plastičnih spojnica, kateter je povezan sa jednim krajem (*inlet*) na špic mikrodijalizne pumpe a sa drugim krajem (*outlet*) nastavljen na providnu plastičnu cevčicu i sproveden i fiksiran u sistem mikrofrakcionog kolektora za automatsko sakupljanje uzoraka (**slika 2**).



Slika 2. Prikaz postavke mikrodijaliznog sistema

Mikrodijalizna pumpa je bila podešena na perfuzionu brzinu od $1 \mu\text{g/ml}$, i nakon plasiranja katetera, sistem je napunjen perfuzionim rastvorom i ispiran tokom 30 minuta. Potom je sprovedena kalibracija primenom retrodijalize u *in vivo* uslovima, za svaku životinju, tokom 2 časa. Retrodijaliza je sprovedena perfuzijom rastvora poznatih koncentracija ispitivanih supstanci, levofloksacina (2 mg/ml) i daidzeina (1 mg/ml) kroz mikrodijalizni sistem, pri stalnom protoku od $1 \mu\text{l/min}$. Uzorci su sakupljeni u intervalima od 30 minuta tokom 2 sata, i zamrzavani na -20°C do analize i izračunavan je RR *in vivo* primenom prethodno spomenute formule. Nakon sprovođenja retrodijalize, tokom sat vremena ponovo je kroz sistem pušten čist perfuzioni rastvor za ispiranje sistema. Potom je započeto sakupljanje uzoraka (0 tačka) i životinjama su oralno aplikovane ispitivane supstance.

3.2.2.3 Prikupljanje uzoraka plazme, seruma i tkiva

Uzorkovanje krvi kod životinja u svakoj grupi je sprovedeno neposredno pre aplikacije ispitivanih supstanci (0), te u 30., 60., 90., 120., 150., 180., 210. minutu i zatim nakon 4, 5, 6, i 7 sati od početka uzorkovanja. Potapanjem repa pacova u posudu sa toplom vodom i masiranjem sa vazelinom je bila

izazvana hiperemija. Lanceta je upotrebljena za perforiranje kože na 1 cm od vrha repa i u prethodno obeleženu mikroeprevetu iz repne vene je uzorkovano 100 μ l krvi u epruvete sa 10 μ l heparina. Uzorkovano je 13 uzoraka krvi po životinji. Istim eksperimentalnim životinjama je uzet uzorak krvi i slobodne tkivne tečnosti iz mišića buta mikrodijaliznom procedurom. Nakon završetka oglada, životinje su dobile još jednu dozu uretanske anestezije, a potom su bile žrtvovane kardiopunkcijom u skladu sa etičkim principima postupanja sa laboratorijskim životinjama. Neposredno nakon žrtvovanja, sakupljeni su uzorci pune krvi od svake životinje. Krv je nakon koagulisanja centrifugirana 10 minuta na 3500 obrtaja/min i odvojen je serum, u kom su analizirani biohemijski pokazatelji jetrene i bubrežne funkcije. Uzorci tkiva mišića buta, jetre, pluća, bubrega, mozga, fecesa, urina, prostate uzeti su u prethodno izvagane epruvete, koje su neposredno posle uzorkovanja ponovo izmerene da bi se omogućilo preračunavanje koncentracija ispitivanih supstanci na g tkiva. Potom su zamrznuti na 20° C do analize. Uzorci jetre i bubrega su uzeti za histološka ispitivanja i čuvani u formalinu do pregleda.

3.2.2.4 Ispitivanje parametara toksičnosti (biohemijsko i histološko)

Od biohemijskih pokazatelja funkcije jetre u serumu određivane su enzimске aktivnosti aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT) i gama-glutamil transferaze (GGT), kao i koncentracije ukupnog i konjugovanog bilirubina. Od parametara funkcije bubrega određene su koncentracije ureje i kreatinina u serumu pacova. Sve analize su rađene prema standardnim spektrofotometrijskim metodama na automatskom sistemu za hemijske analize Olympus AU 400 (Hamburg, Nemačka), u skladu sa uputstvima proizvođača odgovarajućih komercijalnih kitova. Uzorci jetre i bubrega su histološki obrađeni. Uzeti uzorci tkiva jetre i bubrega držani su u formalinskom rastvoru do pregleda. Potom je izvršena dehidratacija rastućim koncentracijama izopropil alkohola, kalupljenje u parafin i sečenje na rotacionom mikrotomu pri debljini isečka od 5 μ m. Nakon toga, tkivo je obojeno standardnom hematoksilin-eozin metodom i analizirano pod

mikroskopom Leica DM LB pri uveličanju objektiva od 100 puta, i fotografisani kamerom marke Leica DC 100.

3.2.3 Kvantitativna analiza uzoraka plazme, tkiva i dijalizata

3.2.3.1 Procedura za pripremu uzoraka plazme i dijalizata

Priprema uzoraka plazme za analizu podrazumevala je dodavanje acetonitrila u v/vodnosu 1:2, mešanje na vorteksu 15 sekundi i centrifugiranje na 4°C na 3500 obrtaja u trajanju od 10 minuta. Supernatant (150 µl) je prenet u vijale. Injektovano je 10 µl supernatanta u HPLC sistem. Za analizu mikrodijaliznih uzoraka je uzet alikvot od 20 µl dijalizata koji je dodat u 40 µl acetonitrila i promešan na vorteksu. Posle ove procedure, ispitivani rastvori su direktno podvrgnuti HPLC analizi. Uzorci plazme za određivanje koncentracija daidzeina dopunjeni su sa acetonitrirom u v/v odnosu 1:2, vorteksovani u trajanju od 15 sekundi i centrifugirani na 4°C na 3500 obrtaja u trajanju od 10 minuta. Supernatant (150 µl) je prenet u vijale. Injektovano je 10 µl supernatanta u HPLC sistem. Za analizu mikrodijaliznih uzoraka je uzet alikvot od 20 µl dijalizata koji je dodat u 40 µl acetonitrila i promešan na vorteksu. Posle ove procedure, ispitivani rastvori su direktno podvrgnuti HPLC analizi.

3.2.3.2 Ekstrakcija iz homogenata tkiva i uzoraka fecesa i urina

Prilikom uzimanja uzoraka, obeležene mikrotube su izmerene pre i posle uzorkovanja. Uzorci tkiva homogenizovani su sa 3 ml destilovane vode na Potter-Elvehjem homogenizatoru (Braun, Nemačka) i vorteksovani 10 s. Odvojeno je 500 µl i pomešano sa 2 ml hloroforma, vorteksovano tokom 10 s i potom centrifugirano na 5°C tokom 10 min na 3000 obrtaja. Odvojeno je 1,5 ml supernatanta i upareno do suva na 50°C strujom azota. Dobijeni ekstrakt rekonstituisan je u 120 µl mešavine acetonitrila i vode HPLC čistoće u v/vodnosu 2:1. Koncentracija dobijena analizom preračunata je u µg/g uzorka sledećom formulom:

$$\text{Koncentracija } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{\text{koncentracija u uzorku } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) \times 0,12 \times 1,33 \times 6}{\text{masa organa (g)}}$$

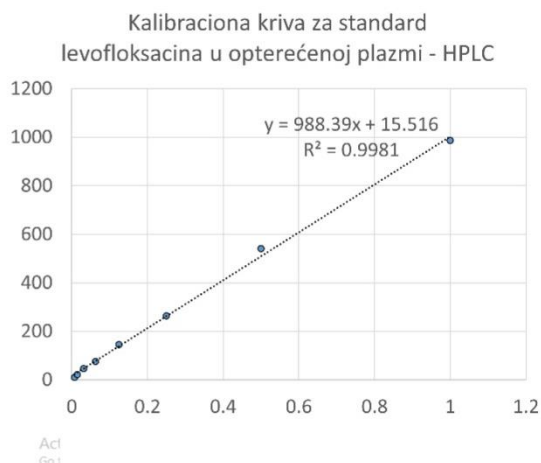
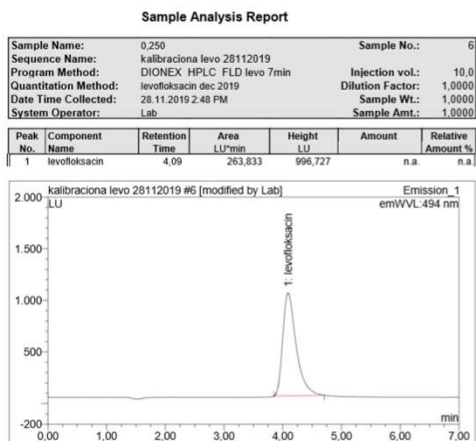
Uzorci urina pripremljeni su vorteksovanjem 100 μ l uzorka urina i 2ml hloroforma tokom 10s, centrifugiranjem na 5°C na 3000 obrtaja tokom 10 minuta. Odvojeno je 1,5 ml supernatanta i upareno do suva na 50°C strujom azota. Dobijeni ekstrakt rekonstituisan je u 2,4 ml mešavine acetonitrila i vode HPLC čistoće u v/vodnosu 2:1. Koncentracija dobijena analizom preračunata je u μ g/g uzorka sledećom formulom:

$$\text{Koncentracija u urinu } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}\right) = \text{koncentracija u uzorku } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}\right) \times 2,4 \times 1,33 \times 10$$

3.2.3.3 Kvantifikacija primenom metode tečne hromatografije pod visokim pritiskom

Za levofloksacin, plazma i mikrodijalizati uzeti iz mišića buta su analizirani uz pomoć tečne hromatografije pod visokim pritiskom (High-pressure liquid chromatography – HPLC, Dionex USA) sa fluorescentnim detektorom (FLD). Za levofloksacin, hromatografsko razdvajanje je rađeno pomoću kolone ODS *Hypersil* (Agilent, 150mm x 2,1mm, 5 μ m) sa ODS predkolonom (Agilent; 20mm x 2,1mm, 5 μ m). Temperatura kolone je održavana na 35°C za vreme trajanja analize. Izokratska mobilna faza je predstavljala smešu 0,4% rastvora trietilamina (pH podešen sa fosfornom kiselinom na 3,0) – metanola – acetonitrila (75:22,5:2,5 [vol/vol/vol]), a elucija je sprovedena pri brzini od 0,3 ml/min. Detekcija je sprovedena Agilent fluorescentnim detektorom ($\lambda_{\text{ekscitacija}} = 292$ nm i $\lambda_{\text{emisija}} = 494$ nm). Dobijeni podaci su obrađeni preko Dionex softvera Chromeleon.

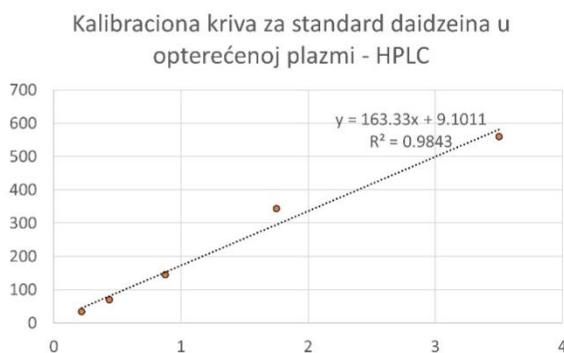
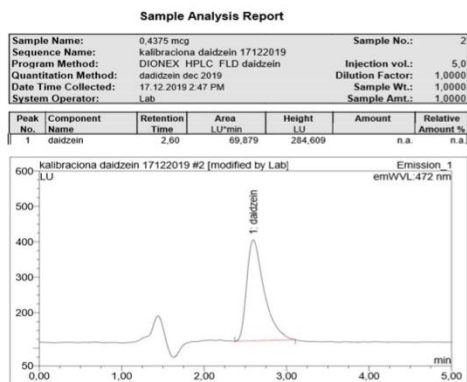
HPLC sa fluorescentnim detektorom je korišćen prema FDA smernicama [201]. Uzeta je blank plazma pacova od 6 različitih pacova, uključujući i hemolizovanu plazmu, da bi se odredio metod specifičnosti. Kalibracione krive su određene metodom najmanjeg kvadrata linearne regresije služeći se softverom Microsoft Excel 2010. Limit kvantifikacije za levofloksacin iznosio je 10 ng/ml za dijalizat i 20 ng/ml za uzorke plazme. Metoda je pokazala linearnu zavisnost u opsegu od 20 do 2500 ng/ml za uzorke uzete iz plazme i od 10 do 1250 ng/ml za uzorke dijalizata sa faktorom korelacije (r^2) 0,996, odnosno 0,999 za levofloksacin.



Slika 3. Hromatogram standarda levofloksacina u plazmi i kalibraciona kriva standarda levofloksacina u plazmi - HPLC

Za daidzein, plazma i mikrodijalizati uzeti iz mišića buta su analizirani uz pomoć tečne hromatografije pod visokim pritiskom (High-pressure liquid chromatography – HPLC, Dionex USA) sa fluorescentnim detektorom. Hromatografsko razdvajanje je rađeno pomoću kolone ODS *Hypersil* (Agilent, 150mm x 2,1mm, 5 µm) sa ODS predkolonom (Agilent; 20mm x 2,1mm, 5 µm). Temperatura kolone je održavana na 30°C za vreme trajanja analize [202]. Mobilna faza je predstavljala smešu acetonitrila i KH₂PO₄–trietilamin pufera (0,01 M, pH 7,4), a elucija je sprovedena pri brzini od 0,3 ml/min. Detekcija je sprovedena Agilent fluorescentnim detektorom ($\lambda_{\text{ekscitacija}} = 350 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{emisija}} = 472 \text{ nm}$). Dobijeni podaci su obrađeni preko Dionex softvera Chromeleon.

Limit kvantifikacije za daidzein iznosio je 13,67 ng/ml za dijalizat i 27,34 ng/ml za uzorke plazme. Metoda je pokazala linearnu zavisnost u opsegu od 20 do 3750 ng/ml za uzorke uzete iz plazme i od 10 do 1875 ng/ml za uzorke dijalizata sa faktorom korelacije (r^2) 0,996, odnosno 0,984.



Slika 4. Hromatogram standarda daidzeina u plazmi i kalibraciona kriva standarda daidzeina u plazmi - HPLC

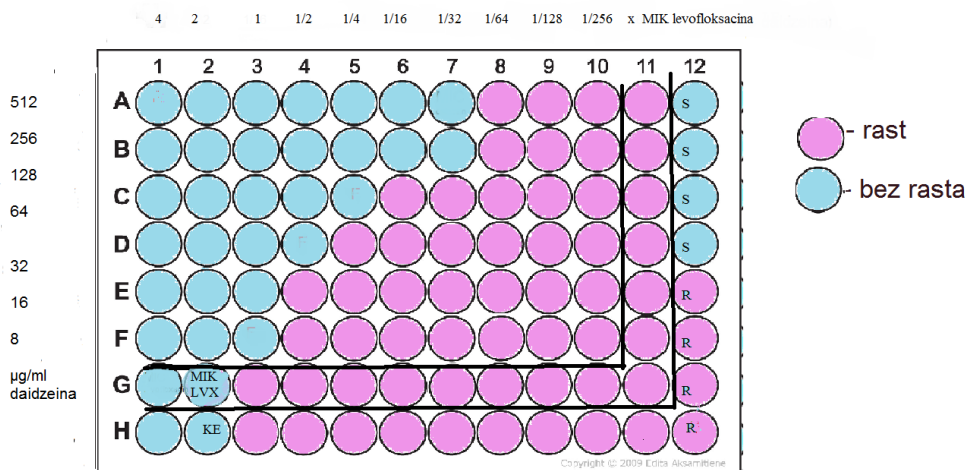
3.2.4 *In vitro* mikrobiološka ispitivanja

Određivanje uticaja daidzeina na osetljivost bakterija u *in vitro* uslovima sprovedeno je određivanjem vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija za levofloksacin i daidzein samostalno i u kombinaciji. Za ispitivanja su se koristili klinički izolati sojeva *P. aeruginosa*, *E. coli* i *S. aureus* (MRSA i metilicin senzitivni, ali rezistentan na levofloksacin). Minimalna inhibitorna koncentracija određena je metodom mikrodilucije na mikrotitar pločama. Za procenu interakcije određena je vrednost fracionih inhibitornih koncentracija - FIK (eng. *fractional inhibitory concentration*).

Za određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija pripremljeni su radni rastvori levofloksacina u destilovanoj vodi i daidzeina u 70% etanolu. Rastvori za ispitivanje (početne koncentracije 512 $\mu\text{g/ml}$) sunapravljeni dodavanjem 512 μl štoka (1000 $\mu\text{g/ml}$) i 488 μL destilovane vode. Dalje su pravljena serijska dvostruka razblaženja sa destilovanom vodom u odnosu 1:1. Za ispitivanje je kao medijum rasta korišćen Mueller-Hinton bujon a tetrazolijum hlorid kao indikator rasta (TTC). Od prekonocnih kultura bakterija je neposredno pre izvođenja mikrodilucije pripremljena suspenzija u fiziološkom rastvoru. Turbiditet suspenzije je bio podešen pomoću denzitometra na 0,5 McFarland-a, što odgovara koncentraciji bakterija 1×10^8 CFU/ml (eng. *colony forming units* - jedinica za formiranje kolonija). Finalni inokulum je pripremljen razblaženjem sa Mueller-Hinton bujonom u odnosu 1:100 radi

dobijanja koncentracije bakterija 1×10^6 CFU/ml. Mueller-Hinton bujon je bio inokulisan u količini od 160 μ l u bunarčice mikrotitar ploče, u koje je zatim dodato po 20 μ l odgovarajuće ispitivane supstance u opadajućim koncentracijama i 20 μ l bakterijske suspenzije. Fiziološki rastvor je dodat umesto rastvora levofloksacina a 70% etanol umesto daidzeina za kontrolu rasta, a za kontrolu sterilnosti je umesto bakterijske suspenzije dodato 20 μ l fiziološkog rastvora. Ukupni volumen u svakom bunarčiću iznosio je 200 μ l, sa finalnom gustinom bakterijskih ćelija od 10^5 CFU/ml. Nakon 24 časovne inkubacije na 37°C u aerobnim uslovima, sledećeg dana, u svaki bunarčić dodato je po 10 μ l TTC-a kao indikatora rasta, i bakterije su inkubirane još 20 minuta. Potom je vizuelnom inspekcijom identifikovan rast bakterija, gde roza boja indikuje rast. TTC je bezbojan rastvor koji se u prisustvu živih bakterijskih ćelija redukuje do formazana koji je intenzivno crvene boje. Minimalna inhibitorna koncentracija je očitana kao najniža koncentracija ispitivanih supstanci koja je inhibirala vidljivi rast mikroorganizama (roza boja – prisutan rast mikroorganizama, izostanak boje-inhibicija rasta). Potom je za određivanje baktericidnih koncentracija sa svake ploče presejan sadržaj bunarčića koji je odgovarao vrednosti MIK prema vizuelnoj inspekciji kao i još dva bunarčića sa nižom odnosno višom koncentracijom antibiotika na Mueller-Hinton agar. Nakon 24 časovne inkubacije, određene su vrednosti minimalnih baktericidnih koncentracija. Sve je rađeno u tri ponavljanja.

Uticaj kombinacije levofloksacina i daidzeina na rast ispitivanih mikroorganizama ispitan je metodom šahovske table inokulacijom rastućih koncentracija levofloksacina po apscisi a daidzeina po oridnati mikrotitarske ploče [203]. Kolone 1 do 10 sadržale su serijska razblaženja daidzeina, a redovi A do F serijska razblaženja levofloksacina. U koloni 11 su dvostruka razblaženja samog daidzeina, a u redu G levofloksacina. Red H je služio kao kontrola rastvarača (kombinacija 70% etanola i levofloksacina) a kolona 12 kao kontrola sterilnosti i kontrola rasta. Nakon 24h inkubacije na 37°C, ponovljena je procedura opisana za određivanje MIK i očitane su vrednosti frakcionih inhibitornih koncentracija. Šematski prikaz ploče za ispitivanje interakcije levofloksacina i daidzeina prikazan je na **shemi 1**.



F- FIC levofloksacin + daidzein

R- kontrola rasta
 S- kontrola sterilnosti
 Ke - Kontrola rastvarača (70% etanol)

Shema 1. Prikaz ploče za određivanje frakcionih inhibitornih koncentracija

3.2.5 *In silico* ispitivanja

3.2.5.1 *In silico* ispitivanja farmakokinetičkih i farmakodinamskih parametara

Određivanje farmakokinetičkih i farmakodinamskih indeksa efikasnosti za levofloksacin sprovedeno je izračunavanjem vrednosti FK/FD indeksa samostalno za levofloksacin i u kombinaciji sa daidzeinom. Određene su vrednosti AUC/MIK i C_{max} /MIK za sve ispitane bakterije na osnovu koncentracija u plazmi i poprečno-prugastom mišiću.

Potom je sprovedena Monte-Karlo simulacija u kojoj je simulirana kohorta od 2000 pacijenata lečenih u jedinicama intenzivne nege. Faza eliminacije je najznačajniji faktor koji utiče na kinetiku antibiotika, a koncentracije antibiotika se mogu preračunati na osnovu izračunavanja klirensa (CLT, total body clearance) odnosno zapremine krvi koja se očisti od leka u jedinici vremena. Na osnovu podataka populacione farmakokinetike levofloksacina [44], vrednosti klirensa (L/h) se mogu izračunati kod pacijenata, na osnovu klirensa kreatinina prema sledećoj formuli:

$$CLT = 5,945 - 1,486 + (S \times - 0,032) + (CrCl \times 0,07)$$

S = starost pacijenta

CrCl = klirens kreatininina

$$AUC = \frac{D}{CLT}$$

D = doza

CLT = klirens leka

Podaci o vrednostima klirensa i starosti pacijenata na osnovu kojih je generisana kohorta dobijeni su iz četiri klinička ispitivanja na pacijentima hospitalizovanih u jedinicama intenzivne nege [204-207]. Simulirana su tri različita dozna režima za intravenski primenjen levofloksacin (400 mg, 500mg i 750mg i.v.) i izračunate vrednosti AUC/MIK za raspon MIK od 0,002 do 128 µg/ml. Potom je za svaki dozni režim izračunata verovatnoća postizanja ciljane vrednosti (eng. *Probability of target attainment*, PTA) za indeks AUC/MIK za koji je pokazano da korelira sa efikasnošću fluorohinolona u kliničkim uslovima, i upoređena sa vrednostima MIK identifikovanih na kliničkim izolatima u ovom istraživanju.

3.2.5.2 *In silico* ispitivanja interakcija daidzeina i levofloksacina sa transportnim proteinima

Potencijal vezivanja levofloksacina i daidzeina na humane transportne proteine određen je primenom softvera *Vienna LiverTox Workspace* (<https://livertox.univie.ac.at/>), 2020) javno dostupnog veb servisa za predikciju interakcija lekova sa transporterima u jetri, koji koristi modele mašinskog učenja za procenu vezivanja ispitivanih supstanci za odabrane transportere. Servis dozvoljava predikciju interakcije između malih molekula i osam različitih transportera. Strukture daidzeina i levofloksacina su preuzete sa PubChem baze podataka [208] u .sdf formatu, i importovane u servis. Analiza je dala rezultat u vidu bikategorijalne varijable za ponašanje ispitivane supstance kao supstrata (da/ne), odnosno inhibitora (da/ne) određenog transportnog proteina.

3.2.6 Statistička obrada podataka

3.2.6.1 Statistička analiza farmakokinetičkih parametara

Sprovedena je nekompartmanska analiza (eng. *noncompartmental analysis* – NCA) individualnih profila pomoću add-in programa PKSolver za Microsoft Excel 2010 [209]. Parametri koje smo računali bili su: konstanta eliminacije - λ_z , poluvreme eliminacije - $t_{1/2}$, vreme u kome je dostignuta maksimalna koncentracija t_{max} , maksimalna dostignuta koncentracija C_{max} , površina ispod krive koncentracija-vreme (eng. *area under the curve* – AUC) od nula do određenog vremena – AUC_{0-t} , od nula do beskonačnosti – $AUC_{0-\infty}$, prosečno vreme tokom kojeg se lek zadržava u telu (eng. *mean residence time*) – $MRT_{0-\infty}$. Primenom nekompartmanske analize moguće je izračunati i konstantu eliminacije i volume distribucije. U korišćenom softveru, konstanta brzine eliminacije generiše se na osnovu najmanje tri vrednosti koncentracija primenom multiple regresione analize, u koju ne ulaze vrednosti koje su prethodile C_{max} . Na osnovu nagiba krive u fazi eliminacije generišu se i parametri $t_{1/2}$, MRT i CI.

3.2.6.2 Statistička analiza mikrobioloških parametara

Za procenu ove interakcije određena je vrednost frakcionih inhibitornih koncentracija - FIK (eng. *fractional inhibitory concentration*) po sledećoj formuli:

$$\Sigma FIK = FIK_{levofloksacin} + FIK_{daidzein},$$

gde je $FIK_{levofloksacin} = MIK_{(levofloksacin+daidzein)} / MIK_{levofloksacin}$,

a $FIK_{daidzein} = MIK_{(levofloksacin+daidzein)} / MIK_{daidzein}$.

Kombinacija se smatra sinergističkom ako je $\Sigma FIK \leq 0,5$, bez interakcije ako je $\Sigma FIK > 0,5$ do < 2 , i antagonističkom kada je $\Sigma FIK \geq 2$, bilo gde na ploči. Za daidzein je prilikom računanja FIK kao vrednost MIK uzeta dvostruko veća koncentracija od maksimalno testirane [203, 210].

3.2.6.3 Statistička obrada dobijenih rezultata

Statistička obrada dobijenih rezultata ispitivanja sprovedena je u programima Excel 2016 i IBM SPSS Statistics, verzija 22. Od mera centralne tendencije korišćena je aritmetička sredina, a mera varijacije izražena je standardnom devijacijom. Statistička značajnost razlika određenih među grupama je ispitivana Studentovim t testom za nezavisne uzorke i jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) sa Tukey post hoc analizom. Statističke hipoteze su testirane na nivou statističke značajnosti (alfa nivo) od 0,05. Rezultati su predstavljeni tabelarno i grafički.

4. REZULTATI

4.1 Rezultati *in vitro* ispitivanja

4.1.1 Retrodijaliza *in vitro*

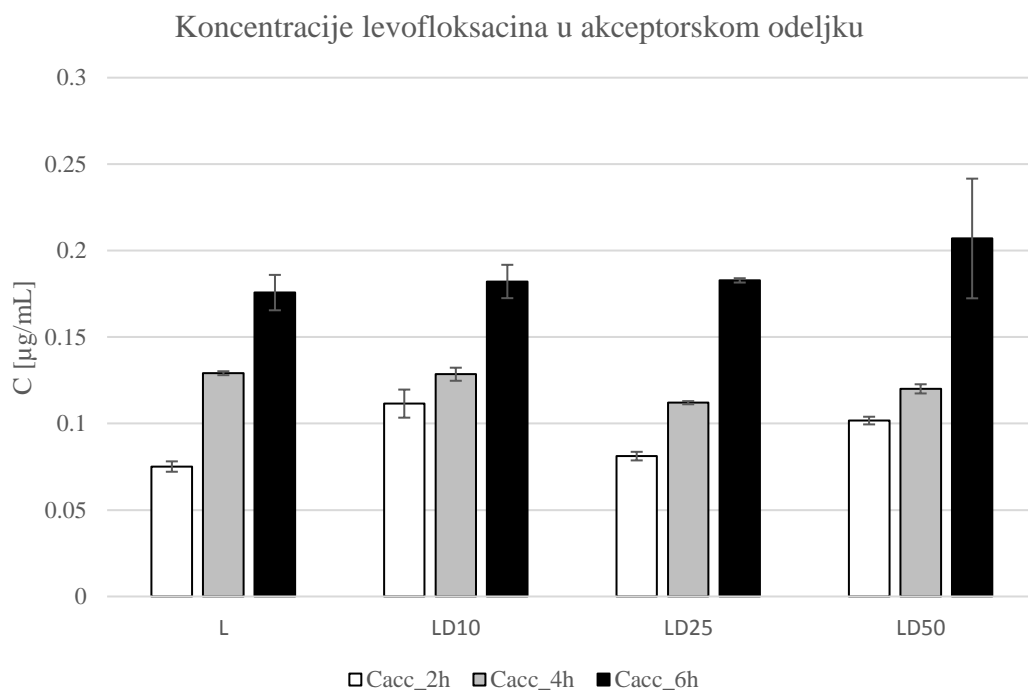
U **tabeli 4.** prikazani su rezultati određivanja prolaska levofloksacina i daidzeina kroz membranu mikrodijaliznih katetera u *in vitro* uslovima. Na osnovu merenja koncentracije u perfuzatu koji je sadržao poznate koncentracije ispitivanih supstanci, i smanjenja koncentracije tokom intervala praćenja, preračunat je stepen preuzimanja. Stepenn preuzimanja nakon 2 sata je iznosio 51,25% za levofloksacin i 34,71% za daidzein.

Tabela 4. Koncentracija levofloksacina i daidzeina u perfuzatu i stepen preuzimanja tokom *in vitro* retrodijalize u trajanju od 2 sata pri protoku od 1 μ l/min

Interval (min)	Levofloksacin		Daidzein	
	Koncentracija ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, $\mu\text{g/ml}$)	Stepen preuzimanja ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, %)	Koncentracija ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, $\mu\text{g/ml}$)	Stepen preuzimanja ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, %)
0-30	1,230 \pm 0,107	38,500 \pm 3,334	0,947 \pm 0,083	5,260 \pm 0,458
30-60	1,066 \pm 0,111	46,700 \pm 4,853	0,800 \pm 0,048	19,980 \pm 1,195
60-90	1,045 \pm 0,079	47,766 \pm 3,585	0,772 \pm 0,057	22,790 \pm 1,686
90-120	0,975 \pm 0,068	51,250 \pm 3,551	0,653 \pm 0,027	34,710 \pm 0,040

4.1.2 Permeabilnost levofloksacina na modelu paralelnih veštačkih membrana (eng. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay, PAMPA*)

Na **grafikonu 1.** prikazane su koncentracije levofloksacina u akceptorskom odeljku nakon 2, 4 i 6 časova od početka inkubacije za levofloksacin samostalno, i u kombinaciji sa daidzeinom u tri koncentracije. Primećuje se stabilan porast koncentracija levofloksacina u akceptorskom odeljku sa prolaskom vremena od početka ogleada.



Grafikon 1. Koncentracije levofloksacina u akceptorskom odeljku (Cacc) nakon inkubacije od 2, 4 i 6 h na pH 7,4

U **tabeli 5.** prikazani su prividni koeficijenti permeabilnosti za levofloksacin samostalno i u kombinaciji sa daidzeinom u tri koncentracije. Granica dobre permeabilnosti prema primenjenom protokolu iznosi $1,5 \times 10^{-6}$ cm/s, tako da već sam levofloksacin poseduje odličnu permeabilnost. Dodatak daidzeina doveo je do povećanja permeabilnosti, mada ove razlike nisu bile statistički značajne.

Tabela 5. Pravidni koeficijenti permeabilnosti (P_{app}) levofloksacina nakon inkubacije od 6 h

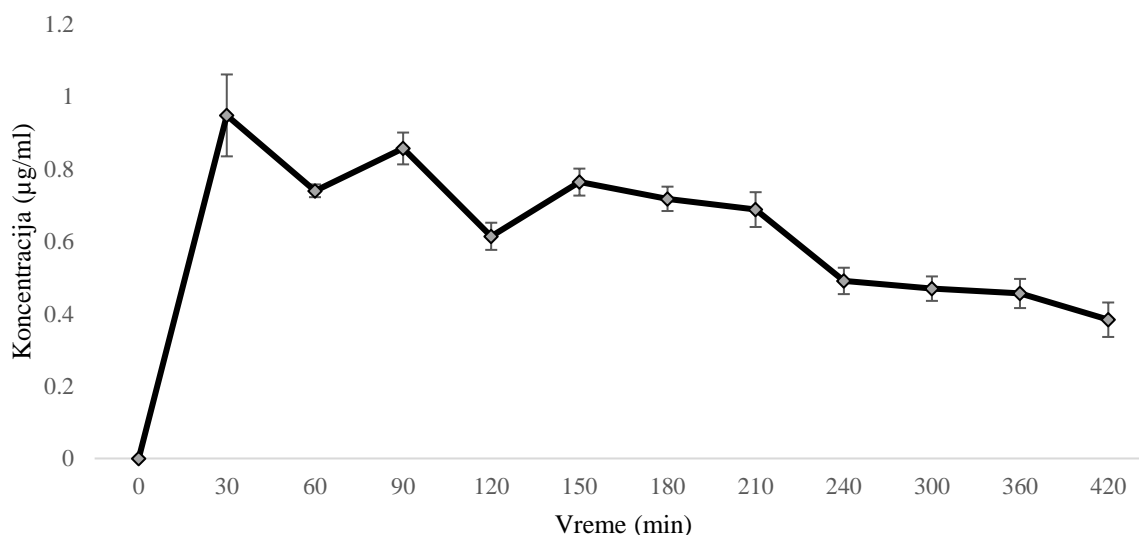
Grupa	Permeabilnost
L	$3,88 \pm 0,13$
LD10	$4,05 \pm 0,23$
LD25	$4,18 \pm 0,03$
LD50	$4,51 \pm 0,93$

4.2 Rezultati farmakokinetičkih ispitivanja *in vivo*

4.2.1 Farmakokinetika levofloksacina u plazmi i perifernim tkivima

4.2.1.1 Farmakokinetika levofloksacina u plazmi

Na **grafikonu 2.** je prikazana kriva koncentracija-vreme, sastavljena na osnovu koncentracija levofloksacina izmerenih u plazmi. Na grafikonu su prikazane izmerene srednje vrednosti i standardna greška srednje vrednosti (SEM) za svaku od 13 vremenskih tačaka. Na osnovu srednjih vrednosti za svaku od tačaka, najviša vrednost koncentracije se postizala pola sata nakon administracije, nakon čega je dolazilo do stabilnog pada koncentracija. Maksimalna koncentracija u plazmi na osnovu srednjih vrednosti izmerenih kod 6 životinja u svakoj od vremenskih tačaka iznosila je oko 0,9 $\mu\text{g/ml}$.



Grafikon 2. Koncentracije levofloksacina u plazmi pacova nakon oralne primene levofloksacina (48 mg/kg)

U **tabeli 6.** su prikazani farmakokinetički parametri levofloksacina dobijeni nekompartmentskom analizom uzoraka plazme nakon oralne primene. Vrednosti maksimalnih koncentracija iznosile su $1,227 \pm 0,325 \mu\text{g/ml}$. Činjenica da se vreme do postizanja maksimalnih koncentracija razlikovalo među životinjama, čini različitim C_{max} određen vizuelnom inspekcijom krive koncentracija-vreme i primenom nekompartmentske analize. Vreme do postizanja maksimalnih koncentracija iznosilo je kod najvećeg broja životinja oko 35 minuta. Poluvreme eliminacije iznosilo je oko 2,9 časova, a površina ispod krive koncentracija-vreme $173,827 \mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$, što odgovara vrednosti od $2,89 \mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$.

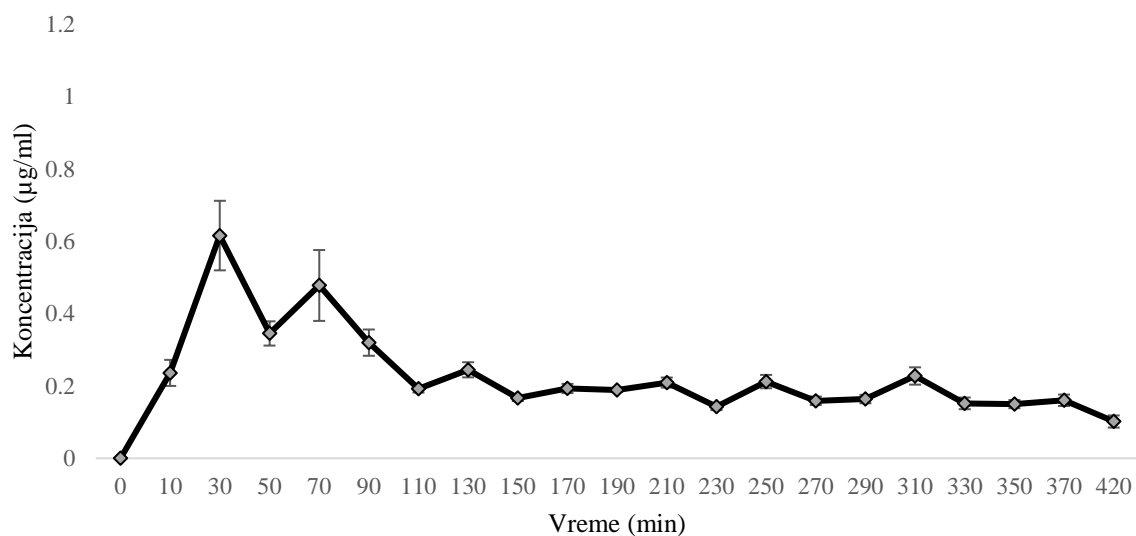
Tabela 6. Izračunati farmakokinetički parametri na osnovu koncentracija u plazmi pacova nakon oralne primene levofloksacina (48 mg/kg)

Farmakokinetički parametar	Jedinica mere	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
λ_z	1/min	$0,004 \pm 0,000$
$t_{1/2}$	min	$173,287 \pm 14,532$
t_{max}	min	$35,6 \pm 14,142$
C_{max}	$\mu\text{g/ml}$	$1,227 \pm 0,194$
AUC_{0-7}	$\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$	$237,386 \pm 24,924$
$\text{AUC}_{0-\text{inf_obs}}$	$\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$	$305,398 \pm 34,275$
$\text{AUC}_{0-7/0-\text{inf_obs}}$		$0,782 \pm 0,029$
$\text{MRT}_{0-\text{inf_obs}}$	min	$287,842 \pm 24,695$
V_z/F_{obs}	$(\text{mg/kg})/(\mu\text{g/ml})$	$42,793 \pm 6,957$
Cl/F_{obs}	$(\text{mg/kg})/(\mu\text{g/ml})/\text{min}$	$0,172 \pm 0,022$

Legenda: λ_z - konstanta eliminacije, $t_{1/2}$ - poluvreme eliminacije, t_{max} - vreme za postizanje maksimalne koncentracije, C_{max} - maksimalna koncentracija, AUC_{0-7} - površina ispod krive koncentracija-vreme (eng. *area under the curve* – AUC) od nula do 7 časova, $\text{AUC}_{0-\infty}$ - površina ispod krive koncentracija-vreme od nula do beskonačnosti, $\text{AUC}_{0-7/0-\infty}$ – količnik prethodne dve vrednosti, $\text{MRT}_{0-\infty}$ - prosečno vreme tokom kojeg se lek zadržava u telu (eng. *mean residence time*), V_d/F - prividni volumen distribucije u terminalnoj fazi posle neintravenske primene, Cl/F - totalni klirens nakon oralne primene.

4.2.1.2 Farmakokinetika levofloksacina u intersticijalnoj tečnosti poprečno-prugastog mišića

Na **grafikonu 3.** je prikazana kriva koncentracija-vreme, sastavljena na osnovu koncentracija levofloksacina izmerenih u intersticijalnoj tečnosti mišića buta. Na grafikonu su prikazane izmerene srednje vrednosti i standardna greška srednje vrednosti (SEM) za svaku od 21 vremenske tačke. Veliki broj vremenskih tačaka omogućava manje varijacije i bolju temporalnu rezoluciju u odnosu na uzorkovanje u plazmi. Na osnovu srednjih vrednosti za svaku od tačaka, najviša vrednost koncentracije se postizala pola sata nakon administracije, isto kao i u plazmi, što pokazuje da se levofloksacin rapidno distribuiše, nakon čega je dolazilo do pada koncentracija. Maksimalna koncentracija u mišiću na osnovu srednjih vrednosti izmerenih kod 6 životinja u svakoj od vremenskih tačaka iznosila je oko 0,6 µg/ml.



Grafikon 3. Koncentracije levofloksacina u intersticijalnoj tečnosti butnog mišića pacova nakon oralne primene levofloksacina (48 mg/kg)

U **tabeli 7.** su prikazani farmakokinetički parametri levofloksacina dobijeni nekompartmanskim analizom uzoraka dijalizata nakon oralne primene. Kako su uzorci dijalizata sakupljeni kontinuirano u intervalima uzorkovanja od 20 minuta, kao vremenske tačke, uzete su sredine svakog intervala, da bi se izbegla distorzija krive koncentracija-vreme. Vrednosti maksimalnih koncentracija iznosile su $0,659 \pm 0,224 \mu\text{g/ml}$. Zabeležena je visoka varijabilnost među životinjama u vrednostima C_{max} u mišiću. Vreme do postizanja maksimalnih koncentracija iznosilo je oko 35 minuta, slično kao u plazmi. Poluvreme eliminacije iznosilo je oko 2,5 časova, a površina ispod krive koncentracija-vreme iznosi $88,74 \mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$, što odgovara vrednosti od $1,47 \mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$.

Tabela 7. Izračunati farmakokinetički parametri na osnovu koncentracija u u intersticijalnoj tečnosti butnog mišića pacova nakon oralne primene levofloksacina (48 mg/kg)

Farmakokinetički parametar	Jedinica mere	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
λ_z	1/min	$0,006 \pm 0,001$
$t_{1/2}$	Min	$142,346 \pm 32,194$
t_{max}	Min	$34,000 \pm 9,797$
C_{max}	$\mu\text{g/ml}$	$0,659 \pm 0,224$
AUC_{0-7}	$\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$	$88,736 \pm 10,900$
$\text{AUC}_{0-\text{inf_obs}}$	$\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$	$111,965 \pm 9,917$
$\text{AUC}_{0-7/0-\text{inf_obs}}$		$0,794 \pm 0,060$
$\text{MRT}_{0-\text{inf_obs}}$	min	$259,137 \pm 42,235$
V_z/F_{obs}	$(\text{mg/kg})/(\mu\text{g/ml})$	/
Cl/F_{obs}	$(\text{mg/kg})/(\mu\text{g/ml})/\text{min}$	$0,445 \pm 0,045$

Legenda: λ_z - konstanta eliminacije, $t_{1/2}$ - poluvreme eliminacije, t_{max} - vreme za postizanje maksimalne koncentracije, C_{max} - maksimalna koncentracija, AUC_{0-7} - površina ispod krive koncentracija-vreme (eng. *area under the curve* – AUC) od nula do 7 časova, $\text{AUC}_{0-\infty}$ - površina ispod krive koncentracija-vreme od nula do beskonačnosti, $\text{AUC}_{0-7/0-\infty}$ – količnik prethodne dve vrednosti, $\text{MRT}_{0-\infty}$ - prosečno vreme tokom kojeg se lek zadržava u telu (eng. *mean residence time*), V_d/F - prividni volumen distribucije u terminalnoj fazi posle neintravenske primene, Cl/F - totalni klirens nakon oralne primene.

Odnos $\text{AUC}_{0-7\text{mišić}}/\text{AUC}_{0-7\text{plazma}}$ iznosi 0,35, uz napomenu da su u uzorcima mikrodijalize merene slobodne koncentracije levofloksacina, a u plazmi ukupne. Ako se vrednosti koncentracija u plazmi

koriguju na nivoe slobodnog levofloksacina, prema literaturnim podacima o vezivanju levofloksacina za proteine od 35%, dobija se odnos od 0,78 za vrednost $AUC_{0-7\text{mišić}}/AUC_{0-7\text{plazma}}$. Ovaj podatak još jednom potvrđuje odličan prodor levofloksacina u periferna tkiva. Kako je prividni volumen distribucije parametar koji opisuje prelazak leka iz plazme, i računa se na osnovu koncentracije u plazmi, ovaj parametar nije računat za mišićno tkivo.

4.2.1.3 Farmakokinetika levofloksacina u homogenatima tkiva, uzorcima fecesa i urina

U **tabeli 8.** prikazane su izmerene koncentracije levofloksacina u uzorcima homogenata tkiva, uzoraka fecesa i urina. Koncentracije su izražene u $\mu\text{g/g}$ uzorka osim za urin gde su izražene u $\mu\text{g/ml}$ urina. Najviše koncentracije su izmerene u urinu, indikujući da se levofloksacin nakupljao u urinu u procesu eliminacije. Uzorci urina su uzimani na kraju ogleada, 7 časova nakon primene, mikcija kod životinja nije zabeležena tokom ovog perioda, tako da koncentracije u urinu pokazuju celokupan izlučen levofloksacin tokom trajanja ogleada. Kada bi se preračunale koncentracije u urinu na osnovu ukupnog volumena urina prema telesnoj masi pacova, dolazimo do podatka da se za 7 časova oko 20% unete doze izlučilo urinom nepromenjeno. Koncentracije su bile značajne i u fecesu, indikujući da se deo unesenog levofloksacina nije resorbovao nakon *per os* primene ili se izlučio putem fecesa nepromenjen. Koncentracije u mozgu bile su niže nego u drugim tkivima, pokazujući ograničen prodor levofloksacina kroz krvno-moždanu barijeru zdravih pacova.

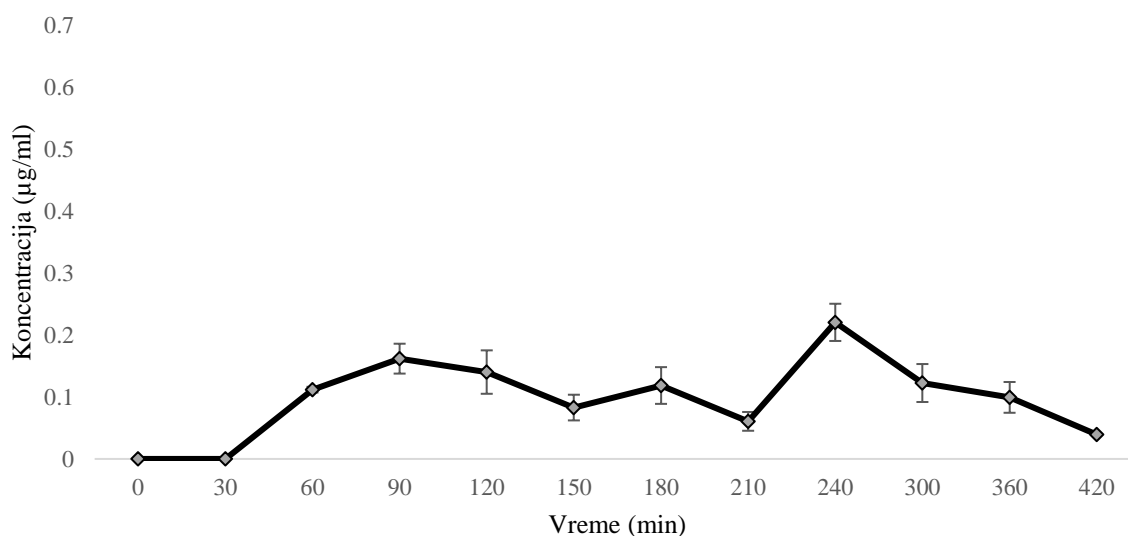
Tabela 8. Koncentracije levofloksacina u homogenatima tkiva, fecesa i urina pacova nakon 7 časova od oralne primene (48 mg/kg)

Uzorak	Jedinica mere	\bar{x}	SEM
Bubreg	$\mu\text{g/g}$	0,520	0,250
Feces	$\mu\text{g/g}$	4,355	1,721
Jetra	$\mu\text{g/g}$	1,732	0,423
Mišić	$\mu\text{g/g}$	2,089	0,363
Mozak	$\mu\text{g/g}$	0,071	0,016
Pluća	$\mu\text{g/g}$	1,411	0,282
Prostata	$\mu\text{g/g}$	2,583	0,895
Urin	$\mu\text{g/ml}$	574,646	170,107

4.2.2 Farmakokinetika daidzeina u plazmi i perifernim tkivima

4.2.2.1 Farmakokinetika daidzeina u plazmi

Na **grafikonu 4.** je prikazana kriva koncentracija-vreme, sastavljena na osnovu koncentracija daidzeina izmerenih u plazmi nakon primenjene najniže ispitivane doze (1,9 mg/kg). Na grafikonu su prikazane izmerene srednje vrednosti i standardna greška srednje vrednosti (SEM) za svaku od 13 vremenskih tačaka. Na osnovu srednjih vrednosti za svaku od tačaka, najviša vrednost koncentracije se postizala oko 4 sata nakon administracije, nakon čega dolazi do stabilnog pada koncentracija. Maksimalna koncentracija u plazmi na osnovu srednjih vrednosti izmerenih kod 6 životinja u svakoj od vremenskih tačaka iznosila je oko 0,2 $\mu\text{g/ml}$.



Grafikon 4. Koncentracije daidzeina u plazmi pacova nakon oralne primene (1,9 mg/kg)

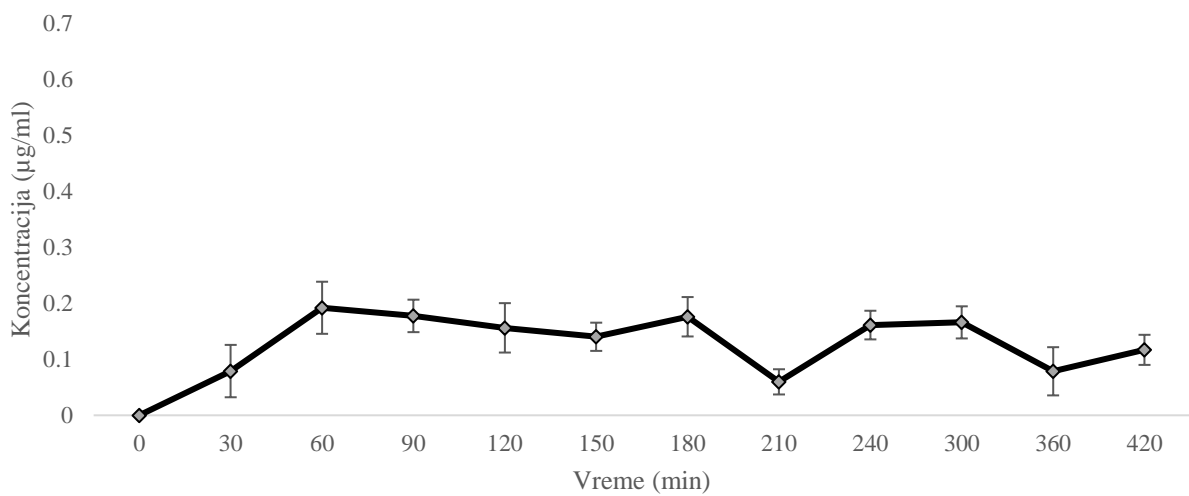
U **tabeli 9.** su prikazani farmakokinetički parametri daidzeina dobijeni nekompartmentskom analizom uzoraka plazme nakon oralne primene u najnižoj dozi (1,9 mg/kg). Vrednosti maksimalnih koncentracija iznosile su $0,247 \pm 0,061$ $\mu\text{g/ml}$. Vreme do postizanja maksimalnih koncentracija iznosilo je kod najvećeg broja životinja oko 180 minuta, a primećena je visoka varijabilnost u ovom parametru. Poluvreme eliminacije iznosilo je oko 0,7 časova, a površina ispod krive koncentracija-vreme iznosi $62,249$ $\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$, što odgovara vrednosti od $1,045$ $\mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$.

Tabela 9. Izračunati farmakokinetički parametri daidzeina na osnovu koncentracija u plazmi pacova nakon oralne primene (1,9 mg/kg)

Farmakokinetički parametar	Jedinica mere	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
λ_z	1/min	$0,015 \pm 0,000$
$t_{1/2}$	min	$46,796 \pm 14,948$
t_{max}	min	$180,000 \pm 65,145$
C_{max}	$\mu\text{g/ml}$	$0,247 \pm 0,061$
AUC_{0-7}	$\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$	$62,249 \pm 21,682$
$\text{AUC}_{0-\text{inf_obs}}$	$\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$	$76,904 \pm 24,549$
$\text{AUC}_{0-7/0-\text{inf_obs}}$		$0,964 \pm 0,272$
$\text{MRT}_{0-\text{inf_obs}}$	min	$231,124 \pm 73,801$
V_z/F_{obs}	$(\text{mg/kg})/(\mu\text{g/ml})$	$1,668 \pm 0,525$
Cl/F_{obs}	$(\text{mg/kg})/(\mu\text{g/ml})/\text{min}$	$0,015 \pm 0,000$

Legenda: λ_z - konstanta eliminacije, $t_{1/2}$ - poluvreme eliminacije, t_{max} - vreme za postizanje maksimalne koncentracije, C_{max} - maksimalna koncentracija, AUC_{0-7} - površina ispod krive koncentracija-vreme (eng. *area under the curve* – AUC) od nula do 7 časova, $\text{AUC}_{0-\infty}$ - površina ispod krive koncentracija-vreme od nula do beskonačnosti, $\text{AUC}_{0-7/0-\infty}$ – količnik prethodne dve vrednosti, $\text{MRT}_{0-\infty}$ - prosečno vreme tokom kojeg se lek zadržava u telu (eng. *mean residence time*), V_d/F - prividni volumen distribucije u terminalnoj fazi posle neintravenske primene, Cl/F - totalni klirens nakon oralne primene.

Na **grafikonu 5.** je prikazana kriva koncentracija-vreme sastavljena na osnovu koncentracija daidzeina izmerenih u plazmi nakon primenjene srednje ispitivane doze (3,8 mg/kg). Na grafikonu su prikazane izmerene srednje vrednosti i standardna greška srednje vrednosti (SEM) za svaku od 13 vremenskih tačaka. Na osnovu srednjih vrednosti za svaku od tačaka, najviša vrednost koncentracije se postizala oko jednog sata nakon administracije. Maksimalna koncentracija u plazmi na osnovu srednjih vrednosti izmerenih kod 6 životinja u svakoj od vremenskih tačaka iznosila je oko 0,1 $\mu\text{g/ml}$.



Grafikon 5. Koncentracije daidzeina u plazmi pacova nakon oralne primene (3,8 mg/kg)

U **tabeli 10.** su prikazani farmakokinetički parametri daidzeina dobijeni nekompartmentskom analizom uzoraka plazme nakon oralne primene u srednjoj ispitivanoj dozi (3,8 mg/kg). Vrednosti maksimalnih koncentracija iznosile su $0,106 \pm 0,012 \mu\text{g/ml}$. Vreme do postizanja maksimalnih koncentracija iznosilo je kod najvećeg broja životinja oko 60 minuta, a primećena je visoka varijabilnost u ovom parametru. Poluvreme eliminacije iznosilo je oko 9 časova, a površina ispod krive koncentracija-vreme iznosi $20,744 \mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$, što odgovara vrednosti od $0,34 \mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$. Koncentracije u plazmi nakon oralne primene daidzeina nisu zavisne od primenjene doze.

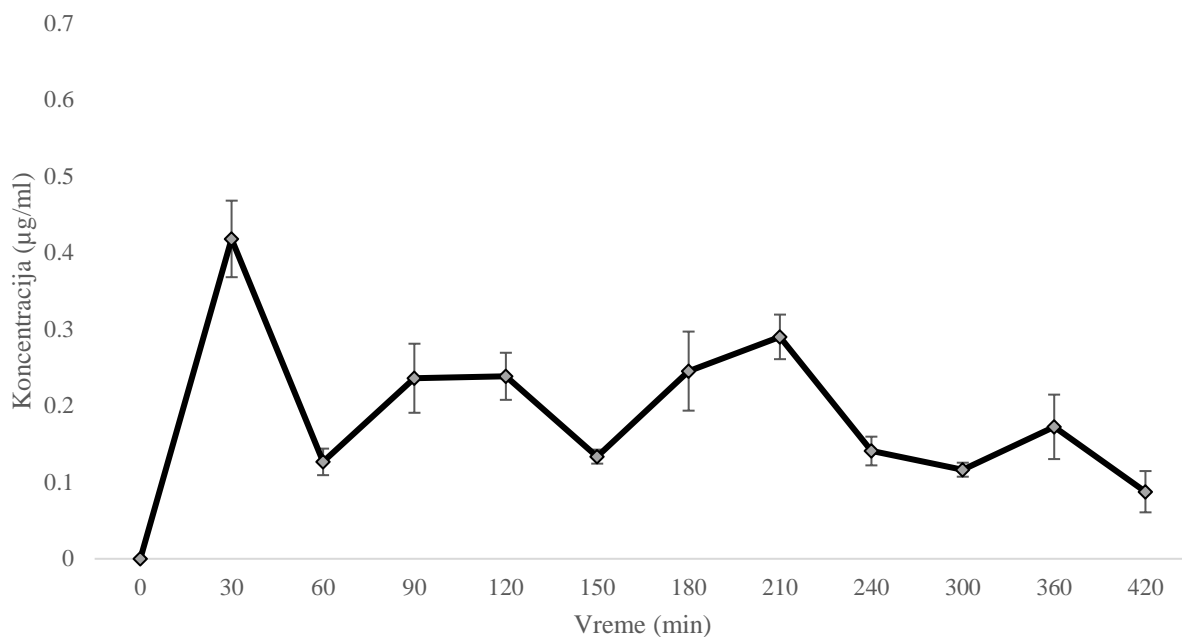
Tabela 10. Izračunati farmakokinetički parametri daidzeina na osnovu koncentracija u plazmi pacova nakon oralne primene (3,8 mg/kg)

Farmakokinetički parametar	Jedinica mere	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
λ_z	1/min	$0,0005 \pm 0,0002$
$t_{1/2}$	Min	$551,297 \pm 170,649$
t_{\max}	Min	$60,000 \pm 42,426$
C_{\max}	$\mu\text{g/ml}$	$0,106 \pm 0,012$
AUC_{0-7}	$\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$	$20,774 \pm 1,750$
$\text{AUC}_{0-\text{inf_obs}}$	$\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$	$101,460 \pm 16,488$
$\text{AUC}_{0-7/0-\text{inf_obs}}$		$0,205 \pm 0,030$
$\text{MRT}_{0-\text{inf_obs}}$	Min	$1564,578 \pm 225,720$
V_z/F_{obs}	$(\text{mg/kg})/(\mu\text{g/ml})$	$55,869 \pm 0,262$
Cl/F_{obs}	$(\text{mg/kg})/(\mu\text{g/ml})/\text{min}$	$0,037 \pm 0,011$

Legenda: λ_z - konstanta eliminacije, $t_{1/2}$ - poluvreme eliminacije, t_{\max} - vreme za postizanje maksimalne koncentracije, C_{\max} - maksimalna koncentracija, AUC_{0-7} - površina ispod krive koncentracija-vreme (eng. *area under the curve* – AUC) od nula do 7 časova, $\text{AUC}_{0-\infty}$ - površina ispod krive koncentracija-vreme od nula do beskonačnosti, $\text{AUC}_{0-7/0-\infty}$ – količnik prethodne dve vrednosti, $\text{MRT}_{0-\infty}$ - prosečno vreme tokom kojeg se lek zadržava u telu (eng. *mean residence time*), V_d/F - prividni volumen distribucije u terminalnoj fazi posle neintravenske primene, Cl/F - totalni klirens nakon oralne primene.

Na **grafikonu 6.** je prikazana kriva koncentracija-vreme, sastavljena na osnovu koncentracija daidzeina izmerenih u plazmi nakon primenjene najviše ispitivane doze (5,7 mg/kg). Na grafikonu su prikazane izmerene srednje vrednosti i standardna greška srednje vrednosti (SEM) za svaku od 13 vremenskih tačaka. Na osnovu srednjih vrednosti za svaku od tačaka, najviša vrednost koncentracije

se postizala oko 30 minuta nakon administracije. Maksimalna koncentracija u plazmi na osnovu srednjih vrednosti izmerenih kod 6 životinja u svakoj od vremenskih tačaka iznosila je oko 0,4 $\mu\text{g/ml}$.



Grafikon 6. Koncentracije daidzeina u plazmi pacova nakon oralne primene (5,7 mg/kg)

U **tabeli 11.** su prikazani farmakokinetički parametri daidzeina dobijeni nekompartmanskim analizom uzoraka plazme nakon oralne primene u najvišoj ispitivanoj dozi (5,7 mg/kg). Vrednosti maksimalnih koncentracija iznosile su $0,492 \pm 0,194 \mu\text{g/ml}$. Vreme do postizanja maksimalnih koncentracija iznosilo je kod najvećeg broja životinja oko 90 minuta, a primećena je visoka varijabilnost u ovom parametru. Poluvreme eliminacije iznosilo je oko 5 časova, a površina ispod krive koncentracija-vreme iznosi $72,69 \pm 29,54 \mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$, što odgovara vrednosti od $1,21 \mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$.

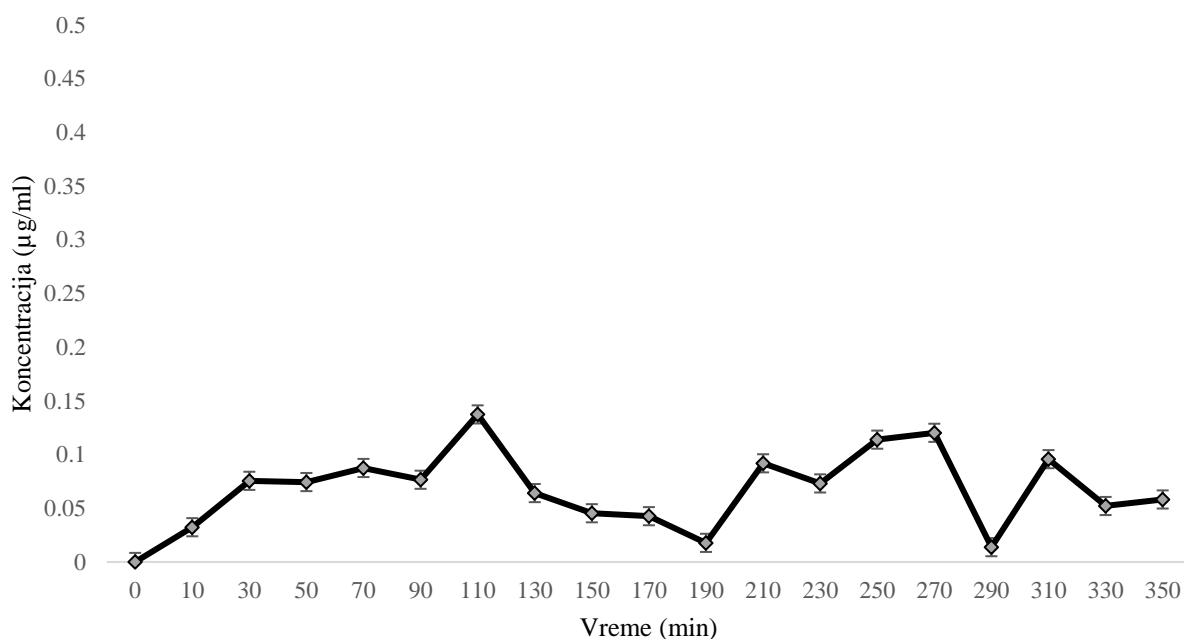
Tabela 11. Izračunati farmakokinetički parametri daidzeina na osnovu koncentracija u plazmi pacova nakon oralne primene (5,7 mg/kg)

Farmakokinetički parametar	Jedinica mere	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
λ_z	1/min	0,012±0,005
$t_{1/2}$	Min	316,291±225,025
t_{max}	Min	90,000±48,9898
C_{max}	µg/ml	0,492±0,194
AUC_{0-7}	µg/ml*min	72,689±29,537
$\text{AUC}_{0-\text{inf_obs}}$	µg/ml*min	279,306±197,659
$\text{AUC}_{0-7/0-\text{inf_obs}}$		0,719±0,216
$\text{MRT}_{0-\text{inf_obs}}$	Min	573,696±333,909
V_z/F_{obs}	(mg/kg)/(µg/ml)	9,153±0,365
Cl/F_{obs}	(mg/kg)/(µg/ml)/min	0,1054±0,000

Legenda: λ_z - konstanta eliminacije, $t_{1/2}$ - poluvreme eliminacije, t_{max} - vreme za postizanje maksimalne koncentracije, C_{max} - maksimalna koncentracija, AUC_{0-7} - površina ispod krive koncentracija-vreme (eng. *area under the curve* – AUC) od nula do 7 časova, $\text{AUC}_{0-\infty}$ - površina ispod krive koncentracija-vreme od nula do beskonačnosti, $\text{AUC}_{0-7/0-\infty}$ – količnik prethodne dve vrednosti, $\text{MRT}_{0-\infty}$ - prosečno vreme tokom kojeg se lek zadržava u telu (eng. *mean residence time*), V_d/F - prividni volumen distribucije u terminalnoj fazi posle neintravenske primene, Cl/F - totalni klirens nakon oralne primene.

4.2.2.2 Farmakokinetika daidzeina u intersticijalnoj tečnosti poprečno-prugastog mišića

Na **grafikonu 7.** je prikazana kriva koncentracija-vreme sastavljena na osnovu koncentracija daidzeina izmerenih u intersticijalnoj tečnosti mišića buta nakon oralne primene u najnižoj ispitivanoj dozi (1,9 mg/kg). Na grafikonu su prikazane izmerene srednje vrednosti i standardna greška srednje vrednosti (SEM) za svaku od 21 vremenske tačke. Na osnovu srednjih vrednosti za svaku od tačaka, najviša vrednost koncentracije se postizala oko 2 sata nakon administracije, nakon čega je dolazilo do pada koncentracija. Maksimalna koncentracija u mišiću na osnovu srednjih vrednosti izmerenih kod 6 životinja u svakoj od vremenskih tačaka iznosila je oko 0,15 µg/ml.



Grafikon 7. Koncentracije daidzeina u intersticijalnoj tečnosti butnog mišića pacova nakon oralne primene daidzeina (1,9 mg/kg)

U **tabeli 12.** su prikazani farmakokinetički parametri daidzeina dobijeni nekompartmentskom analizom uzoraka dijalizata nakon oralne primene u najnižoj ispitivanoj dozi (1,9 mg/kg). Vrednosti maksimalnih koncentracija iznosile su $0,127 \pm 0,054$ $\mu\text{g/ml}$. Vreme do postizanja maksimalnih koncentracija iznosilo je oko 110 minuta. Poluvreme eliminacije iznosilo je oko jednog sata, a površina ispod krive koncentracija-vreme iznosi $22,59$ $\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$, što odgovara vrednosti od $0,376$ $\mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$. Odnos $\text{AUC}_{0-7\text{mišić}}/\text{AUC}_{0-7\text{plazma}}$ iznosi $0,35$. Vrednost klirensa izračunata na osnovu koncentracija izmerenih u uzorcima mikrodijalize bila je značajno manja nego ona određena u plazmi, konzistentno, vreme zadržavanja u mišiću (MRT) bilo je duže nego u plazmi.

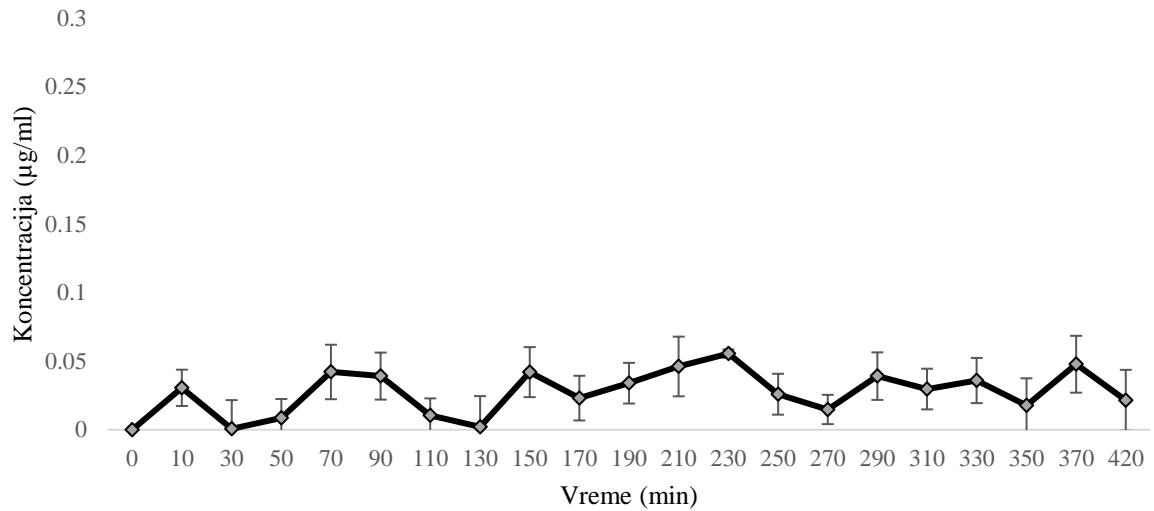
Tabela 12. Izračunati farmakokinetički parametri na osnovu koncentracija u u intersticijalnoj tečnosti butnog mišića pacova nakon oralne primene daidzeina (1,9 mg/kg)

Farmakokinetički parametar	Jedinica mere	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
λ_z	1/min	$0,012 \pm 0,0013$
$t_{1/2}$	min	$55,729 \pm 4,562$
t_{max}	min	$110,452 \pm 45,232$
C_{max}	$\mu\text{g/ml}$	$0,127 \pm 0,054$
AUC_{0-7}	$\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$	$22,598 \pm 2,341$
$\text{AUC}_{0-\text{inf_obs}}$	$\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$	$26,877 \pm 3,492$
$\text{AUC}_{0-7/0-\text{inf_obs}}$		$0,841 \pm 0,130$
$\text{MRT}_{0-\text{inf_obs}}$	min	$217,044 \pm 19,345$
V_z/F_{obs}	$(\text{mg/kg})/(\mu\text{g/ml})$	/
Cl/F_{obs}	$(\text{mg/kg})/(\mu\text{g/ml})/\text{min}$	$0,035 \pm 0,004$

Legenda: λ_z - konstanta eliminacije, $t_{1/2}$ - poluvreme eliminacije, t_{max} - vreme za postizanje maksimalne koncentracije, C_{max} - maksimalna koncentracija, AUC_{0-7} - površina ispod krive koncentracija-vreme (eng. *area under the curve* – AUC) od nula do 7 časova, $\text{AUC}_{0-\infty}$ - površina ispod krive koncentracija-vreme od nula do beskonačnosti, $\text{AUC}_{0-7/0-\infty}$ – količnik prethodne dve vrednosti, $\text{MRT}_{0-\infty}$ - prosečno vreme tokom kojeg se lek zadržava u telu (eng. *mean residence time*), V_d/F - prividni volumen distribucije u terminalnoj fazi posle neintravenske primene, Cl/F - totalni klirens nakon oralne primene.

Na **grafikonu 8.** je prikazana kriva koncentracija-vreme sastavljena na osnovu koncentracija daidzeina izmerenih u intersticijalnoj tečnosti mišića buta nakon oralne primene u srednjoj ispitivanoj dozi (3,8 mg/kg). Na grafikonu su prikazane izmerene srednje vrednosti i standardna greška srednje vrednosti (SEM) za svaku od 21 vremenske tačke. Na osnovu srednjih vrednosti za svaku od tačaka,

najviša vrednost koncentracije se postizala oko 4 sata nakon administracije, nakon čega je dolazilo do pada koncentracija. Maksimalna koncentracija u mišiću na osnovu srednjih vrednosti izmerenih kod 6 životinja u svakoj od vremenskih tačaka iznosila je oko 0,06 $\mu\text{g/ml}$.



Grafikon 8. Koncentracije daidzeina u intersticijalnoj tečnosti butnog mišića pacova nakon oralne primene daidzeina (3,8 mg/kg)

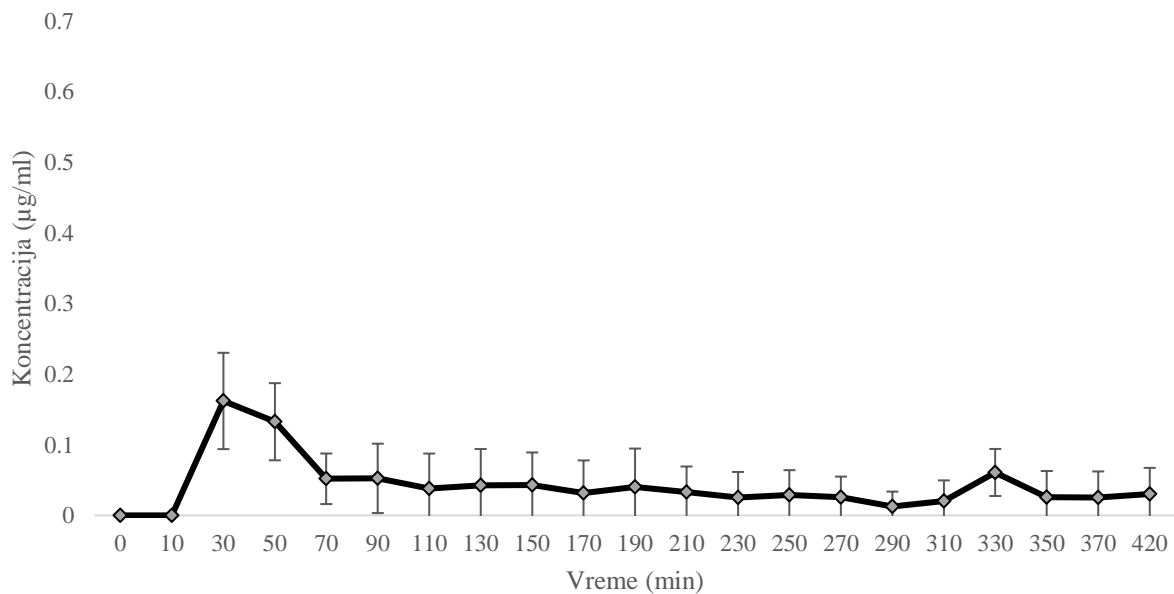
U **tabeli 13.** su prikazani farmakokinetički parametri daidzeina dobijeni nekompartmanskim analizom uzoraka dijalizata nakon oralne primene u srednjoj ispitivanoj dozi (3,8 mg/kg). Vrednosti maksimalnih koncentracija iznosile su $0,058 \pm 0,005$ $\mu\text{g/ml}$. Vreme do postizanja maksimalnih koncentracija iznosilo je oko 130 minuta. Poluvreme eliminacije iznosilo je oko jednog sata, a površina ispod krive koncentracija-vreme iznosi $15,98$ $\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$, što odgovara vrednosti od $0,25$ $\mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$. Odnos $\text{AUC}_{0-7\text{mišić}}/\text{AUC}_{0-7\text{plazma}}$ iznosi $0,80$. Vrednost klirensa izračunata na osnovu koncentracija izmerenih u uzorcima mikrodijalize bila je značajno veća nego ona određena u plazmi, konzistentno, vreme zadržavanja u mišiću (MRT) bilo je značajno kraće nego u plazmi.

Tabela 13. Izračunati farmakokinetički parametri na osnovu koncentracija u u intersticijalnoj tečnosti butnog mišića pacova nakon oralne primene daidzeina (3,8 mg/kg)

Farmakokinetički parametar	Jedinica mere	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
λ_z	1/min	$0,013 \pm 0,003$
$t_{1/2}$	min	$65,515 \pm 16,482$
t_{max}	min	$130,000 \pm 47,140$
C_{max}	$\mu\text{g/ml}$	$0,058 \pm 0,005$
AUC_{0-7}	$\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$	$15,983 \pm 0,574$
$\text{AUC}_{0-\text{inf_obs}}$	$\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$	$18,283 \pm 1,507$
$\text{AUC}_{0-7/0-\text{inf_obs}}$		$0,884 \pm 0,039$
$\text{MRT}_{0-\text{inf_obs}}$	min	$246,565 \pm 16,250$
V_z/F_{obs}	$(\text{mg/kg})/(\mu\text{g/ml})$	$9,434 \pm 1,592$
Cl/F_{obs}	$(\text{mg/kg})/(\mu\text{g/ml})/\text{min}$	$0,106 \pm 0,008$

Legenda: λ_z - konstanta eliminacije, $t_{1/2}$ - poluvreme eliminacije, t_{max} - vreme za postizanje maksimalne koncentracije, C_{max} - maksimalna koncentracija, AUC_{0-7} - površina ispod krive koncentracija-vreme (eng. *area under the curve* – AUC) od nula do 7 časova, $\text{AUC}_{0-\infty}$ - površina ispod krive koncentracija-vreme od nula do beskonačnosti, $\text{AUC}_{0-7/0-\infty}$ – količnik prethodne dve vrednosti, $\text{MRT}_{0-\infty}$ - prosečno vreme tokom kojeg se lek zadržava u telu (eng. *mean residence time*), V_d/F - prividni volumen distribucije u terminalnoj fazi posle neintravenske primene, Cl/F - totalni klirens nakon oralne primene.

Na **grafikonu 9.** je prikazana kriva koncentracija-vreme, sastavljena na osnovu koncentracija daidzeina izmerenih u intersticijalnoj tečnosti mišića buta nakon oralne primene u najvišoj ispitivanoj dozi (5,7 mg/kg). Na grafikonu su prikazane izmerene srednje vrednosti i standardna greška srednje vrednosti (SEM) za svaku od 21 vremenske tačke. Na osnovu srednjih vrednosti za svaku od tačaka, najviša vrednost koncentracije postizala se oko pola sata nakon administracije, nakon čega je dolazilo do pada koncentracija. U šestom satu se ponovo primećuje porast koncentracija u mišiću. Maksimalna koncentracija u mišiću na osnovu srednjih vrednosti izmerenih kod 6 životinja u svakoj od vremenskih tačaka iznosila je oko 0,15 µg/ml.



Grafikon 9. Koncentracije daidzeina u intersticijalnoj tečnosti butnog mišića pacova nakon oralne primene daidzeina (5,7 mg/kg)

U **tabeli 14.** su prikazani farmakokinetički parametri daidzeina dobijeni nekompartmentskom analizom uzoraka dijalizata nakon oralne primene u najvišoj ispitivanoj dozi (5,7 mg/kg). Vrednosti maksimalnih koncentracija iznosile su $0,11 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$. Vreme do postizanja maksimalnih koncentracija iznosilo je oko 2 sata. Poluvreme eliminacije iznosilo je oko 5 časova, a površina ispod krive koncentracija-vreme iznosi $16,50 \mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$, što odgovara vrednosti od $0,28 \mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$. Odnos $\text{AUC}_{0-7\text{mišić}}/\text{AUC}_{0-7\text{plazma}}$ iznosi 0,23. Vrednost klirensa izračunata na osnovu koncentracija izmerenih u uzorcima mikrodijalize nije se razlikovala značajno u odnosu na onu određenu u plazmi, konzistentno, vreme zadržavanja u mišiću (MRT) je takođe bilo slično.

Tabela 14. Izračunati farmakokinetički parametri na osnovu koncentracija u u intersticijalnoj tečnosti butnog mišića pacova nakon oralne primene daidzeina (5,7 mg/kg)

Farmakokinetički parametar	Jedinica mere	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
λ_z	1/min	$0,003 \pm 0,001$
$t_{1/2}$	min	$330,692 \pm 94,922$
t_{max}	min	$145,000 \pm 56,292$
C_{max}	$\mu\text{g/ml}$	$0,108 \pm 0,019$
AUC_{0-7}	$\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$	$16,502 \pm 3,936$
$\text{AUC}_{0-\text{inf_obs}}$	$\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$	$40,300 \pm 10,044$
$\text{AUC}_{0-7/0-\text{inf_obs}}$		$0,555 \pm 0,108$
$\text{MRT}_{0-\text{inf_obs}}$	Min	$551,406 \pm 145,286$
V_z/F_{obs}	$(\text{mg/kg})/(\mu\text{g/ml})$	/
Cl/F_{obs}	$(\text{mg/kg})/(\mu\text{g/ml})/\text{min}$	$0,079 \pm 0,030$

Legenda: λ_z - konstanta eliminacije, $t_{1/2}$ - poluvreme eliminacije, t_{max} - vreme za postizanje maksimalne koncentracije, C_{max} - maksimalna koncentracija, AUC_{0-7} - površina ispod krive koncentracija-vreme (eng. *area under the curve* – AUC) od nula do 7 časova, $\text{AUC}_{0-\infty}$ - površina ispod krive koncentracija-vreme od nula do beskonačnosti, $\text{AUC}_{0-7/0-\infty}$ – količnik prethodne dve vrednosti, $\text{MRT}_{0-\infty}$ - prosečno vreme tokom kojeg se lek zadržava u telu (eng. *mean residence time*), V_d/F - prividni volumen distribucije u terminalnoj fazi posle neintravenske primene, Cl/F - totalni klirens nakon oralne primene.

4.2.2.3 Koncentracije daidzeina u homogenatima tkiva, uzorcima fecesa i urina

U **tabeli 15.** prikazane su izmerene koncentracije daidzeina u uzorcima homogenata tkiva, uzoraka fecesa i urina. Koncentracije su izražene u $\mu\text{g/g}$ uzorka osim za urin gde su izražene u $\mu\text{g/ml}$ urina. Najviše koncentracije su izmerene u urinu, indikujući da se daidzein nakuplja u urinu u procesu eliminacije. Važno je napomenuti da kinetika eliminacije daidzeina putem urina nije bila dozno zavisna i linerana što je u skladu sa plazma profilima daidzeina nakon primenjene tri različite doze. Koncentracije su bile visoke i u fecesu, indikujući da se deo unesenog daidzeina nije resorbovao nakon *per os* primene ili se izlučio putem fecesa nepromenjen. Koncentracije u mozgu bile su značajno niže nego u drugim tkivima, ali ipak merljive, ukazujući na prodor daidzeina kroz krvno-moždanu barijeru zdravih pacova. U tkivu pluća daidzein nije detektovan.

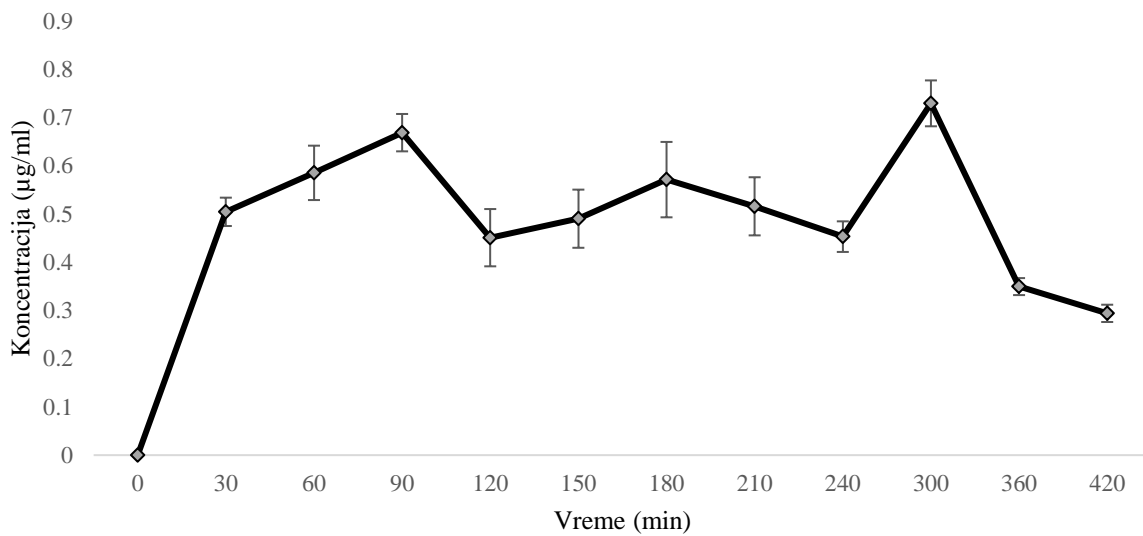
Tabela 15. Koncentracije daidzeina u homogenatima tkiva, fecesa i urina pacova nakon 7 časova od oralne primene u tri ispitivane doze D1 (1,9mg/kg), D2 (3,8 mg/kg) i D3 (5,7 mg/kg)

Uzorak	Jedinica mere	D1		D2		D3	
		\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM
Bubreg	$\mu\text{g/g}$	0,083	0,030	1,312	0,213	1,363	0,519
Feces	$\mu\text{g/g}$	16,656	0,690	14,706	5,147	8,595	4,009
Jetra	$\mu\text{g/g}$	1,323	0,447	2,587	0,497	1,949	0,763
Mišić	$\mu\text{g/g}$	0,695	0,401	0,971	0,189	0,399	0,179
Mozak	$\mu\text{g/g}$	0,062	0,017	0,079	0,029	0,056	0,026
Pluća	$\mu\text{g/g}$	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Prostata	$\mu\text{g/g}$	1,592	0,137	0,627	0,362	1,678	0,610
Urin	$\mu\text{g/ml}$	72,369	17,329	139,106	23,500	27,048	19,126

4.2.3 Farmakokinetika levofloksacina u plazmi i perifernim tkivima nakon konkomitantne primene sa daidzeinom

4.2.3.1 Farmakokinetika levofloksacina u plazmi nakon primene u kombinaciji sa daidzeinom

Na **grafikonu 10.** je prikazana kriva koncentracija-vreme, sastavljena na osnovu koncentracija levofloksacina izmerenih u plazmi nakon primene u kombinaciji sa daidzeinom u najnižoj ispitivanoj dozi od 1,9 mg/kg. Na grafikonu su prikazane izmerene srednje vrednosti i standardna greška srednje vrednosti (SEM) za svaku od 13 vremenskih tačaka. Na osnovu srednjih vrednosti za svaku od tačaka, najviša vrednost koncentracije postizala se tek oko 6 časova nakon administracije, nakon čega dolazi do naglog pada koncentracija. Maksimalna koncentracija u plazmi na osnovu srednjih vrednosti izmerenih kod 6 životinja u svakoj od vremenskih tačaka iznosila je oko 0,7 µg/ml.



Grafikon 10. Koncentracije levofloksacina u plazmi pacova nakon oralne primene levofloksacina (48 mg/kg) u kombinaciji sa daidzeinom (1,9mg/kg)

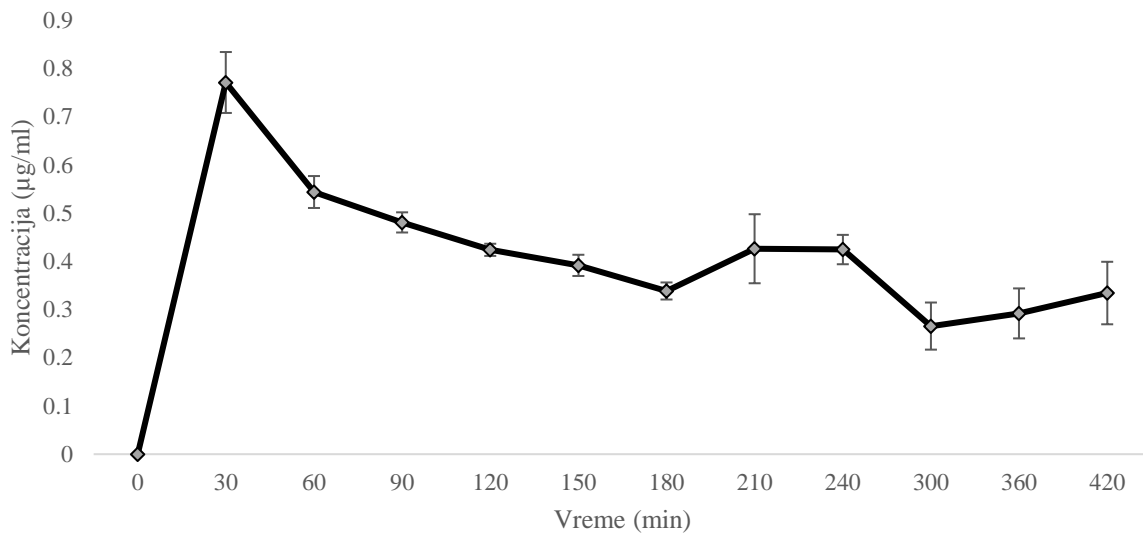
U **tabeli 16.** su prikazani farmakokinetički parametri levofloksacina dobijeni nekompartmansom analizom uzoraka plazme nakon oralne primene u kombinaciji sa daidzeinom u najnižoj ispitivanoj dozi (1,9 mg/kg). Vrednosti maksimalnih koncentracija iznosile su $0,803 \pm 0,073$ $\mu\text{g/ml}$. Činjenica da se vreme do postizanja maksimalnih koncentracija razlikovalo među životinjama, čini različitim C_{max} određen vizuelnom inspekcijom grafikona i primenom nekompartmanske analize. Vreme do postizanja maksimalnih koncentracija iznosilo je kod najvećeg broja životinja oko 3,5 časova. Poluvreme eliminacije iznosilo je oko 1,5 časova, a površina ispod krive koncentracija-vreme iznosila je $207,561$ $\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$, što odgovara vrednosti od $3,46$ $\mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$.

Tabela 16. Izračunati farmakokinetički parametri na osnovu koncentracija u plazmi pacova nakon oralne primene levofloksacina (48 mg/kg) u kombinaciji sa daidzeinom (1,9 mg/kg)

Farmakokinetički parametar	Jedinica mere	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
λ_z	1/min	$0,008 \pm 0,001$
$t_{1/2}$	min	$105,643 \pm 17,138$
t_{max}	min	$192,000 \pm 59,154$
C_{max}	$\mu\text{g/ml}$	$0,803 \pm 0,073$
AUC_{0-7}	$\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$	$207,561 \pm 32,031$
$\text{AUC}_{0-\text{inf_obs}}$	$\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$	$253,346 \pm 32,196$
$\text{AUC}_{0-7/0-\text{inf_obs}}$		$0,807 \pm 0,045$
$\text{MRT}_{0-\text{inf_obs}}$	min	$283,000 \pm 24,955$
V_z/F_{obs}	$(\text{mg/kg})/(\mu\text{g/ml})$	$33,026 \pm 8,333$
Cl/F_{obs}	$(\text{mg/kg})/(\mu\text{g/ml})/\text{min}$	$0,208 \pm 0,030$

Legenda: λ_z - konstanta eliminacije, $t_{1/2}$ - poluvreme eliminacije, t_{max} - vreme za postizanje maksimalne koncentracije, C_{max} - maksimalna koncentracija, AUC_{0-7} - površina ispod krive koncentracija-vreme (eng. *area under the curve* – AUC) od nula do 7 časova, $\text{AUC}_{0-\infty}$ - površina ispod krive koncentracija-vreme od nula do beskonačnosti, $\text{AUC}_{0-7/0-\infty}$ – količnik prethodne dve vrednosti, $\text{MRT}_{0-\infty}$ - prosečno vreme tokom kojeg se lek zadržava u telu (eng. *mean residence time*), V_d/F - prividni volumen distribucije u terminalnoj fazi posle neintravenske primene, Cl/F - totalni klirens nakon oralne primene.

Na **grafikonu 11.** je prikazana kriva koncentracija-vreme sastavljena na osnovu koncentracija levofloksacina izmerenih u plazmi nakon primene u kombinaciji sa daidzeinom u srednjoj ispitivanoj dozi od 3,8 mg/kg. Na grafikonu su prikazane izmerene srednje vrednosti i standardna greška srednje vrednosti (SEM) za svaku od 13 vremenskih tačaka. Na osnovu srednjih vrednosti za svaku od tačaka, najviša vrednost koncentracije postizala se već 30 minuta nakon administracije, nakon čega dolazi do naglog pada koncentracija. Maksimalna koncentracija u plazmi na osnovu srednjih vrednosti izmerenih kod 6 životinja u svakoj od vremenskih tačaka iznosila je oko 0,7 µg/ml.



Grafikon 11. Koncentracije levofloksacina u plazmi pacova nakon oralne primene levofloksacina (48 mg/kg) u kombinaciji sa daidzeinom (3,8 mg/kg)

U **tabeli 17.** su prikazani farmakokinetički parametri levofloksacina dobijeni nekompartmanskim analizom uzoraka plazme nakon oralne primene u kombinaciji sa daidzeinom u srednjoj ispitivanoj dozi (3,8 mg/kg). Vrednosti maksimalnih koncentracija iznosile su $0,673 \pm 0,151$ $\mu\text{g/ml}$. Vreme do postizanja maksimalnih koncentracija iznosilo je kod najvećeg broja životinja oko 30 minuta. Poluvreme eliminacije iznosilo je oko 6 časova, a površina ispod krive koncentracija-vreme iznosila je $143,038 \pm 33,743$ $\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$, što odgovara vrednosti od $2,83$ $\mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$.

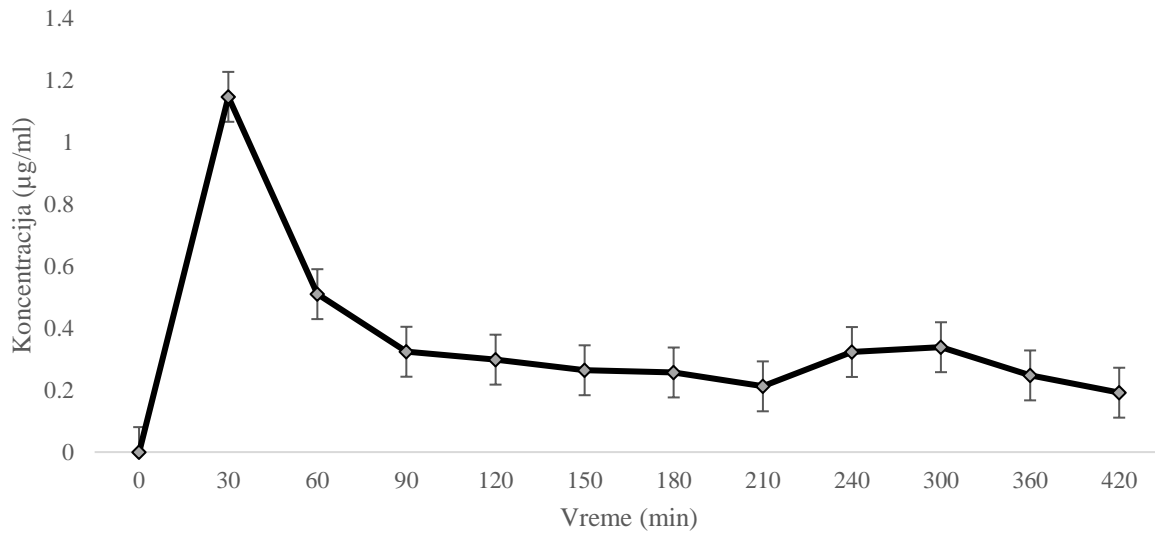
Tabela 17. Izračunati farmakokinetički parametri na osnovu koncentracija u plazmi pacova nakon oralne primene levofloksacina (48 mg/kg) u kombinaciji sa daidzeinom (3,8 mg/kg)

Farmakokinetički parametar	Jedinica mere	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
λ_z	1/min	$0,003 \pm 0,001$
$t_{1/2}$	min	$359,221 \pm 90,307$
t_{max}	min	$30,000 \pm 0,000$
C_{max}	$\mu\text{g/ml}$	$0,673 \pm 0,151$
AUC_{0-7}	$\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$	$143,038 \pm 33,743$
$\text{AUC}_{0-\text{inf_obs}}$	$\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$	$327,574 \pm 102,271$
$\text{AUC}_{0-7/0-\text{inf_obs}}$		$0,539 \pm 0,121$
$\text{MRT}_{0-\text{inf_obs}}$	min	$568,697 \pm 140,258$
V_z/F_{obs}	$(\text{mg/kg})/(\mu\text{g/ml})$	$100,239 \pm 48,94$
Cl/F_{obs}	$(\text{mg/kg})/(\mu\text{g/ml})/\text{min}$	$0,330 \pm 0,421$

Legenda: λ_z - konstanta eliminacije, $t_{1/2}$ - poluvreme eliminacije, t_{max} - vreme za postizanje maksimalne koncentracije, C_{max} - maksimalna koncentracija, AUC_{0-7} - površina ispod krive koncentracija-vreme (eng. *area under the curve* – AUC) od nula do 7 časova, $\text{AUC}_{0-\infty}$ - površina ispod krive koncentracija-vreme od nula do beskonačnosti, $\text{AUC}_{0-7/0-\infty}$ – količnik prethodne dve vrednosti, $\text{MRT}_{0-\infty}$ - prosečno vreme tokom kojeg se lek zadržava u telu (eng. *mean residence time*), V_d/F - prividni volumen distribucije u terminalnoj fazi posle neintravenske primene, Cl/F - totalni klirens nakon oralne primene.

Na **grafikonu 12.** je prikazana kriva koncentracija-vreme, sastavljena na osnovu koncentracija levofloksacina izmerenih u plazmi nakon primene u kombinaciji sa daidzeinom u najvišoj ispitivanoj dozi od 5,7 mg/kg. Na grafikonu su prikazane izmerene srednje vrednosti i standardna greška srednje vrednosti (SEM) za svaku od 13 vremenskih tačaka. Na osnovu srednjih vrednosti za svaku od tačaka, najviša vrednost koncentracije postizala se već 30 minuta nakon administracije, nakon čega je dolazilo

do naglog pada koncentracija. Maksimalna koncentracija u plazmi na osnovu srednjih vrednosti izmerenih kod 6 životinja u svakoj od vremenskih tačaka iznosila je oko 1,05 $\mu\text{g/ml}$.



Grafikon 12. Koncentracije levofloksacina u plazmi pacova nakon oralne primene levofloksacina (48 mg/kg) u kombinaciji sa daidzeinom (5,7 mg/kg)

U **tabeli 18.** su prikazani farmakokinetički parametri levofloksacina dobijeni nekompartmanskim analizom uzoraka plazme nakon oralne primene u kombinaciji sa daidzeinom u najvišoj ispitivanoj dozi (5,7 mg/kg). Vrednosti maksimalnih koncentracija iznosile su $1,177 \pm 0,391 \mu\text{g/ml}$. Zabeležena je visoka varijabilnost u vrednostima maksimalnih koncentracija nakon primene levofloksacina u kombinaciji sa daidzeinom u najvišoj dozi. Vreme do postizanja maksimalnih koncentracija iznosilo je kod najvećeg broja životinja oko 30 minuta. Poluvreme eliminacije iznosilo je oko 2,5 časova, a površina ispod krive koncentracija-vreme iznosila je $145,706 \pm 30,434 \mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$, što odgovara vrednosti od $2,43 \mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$.

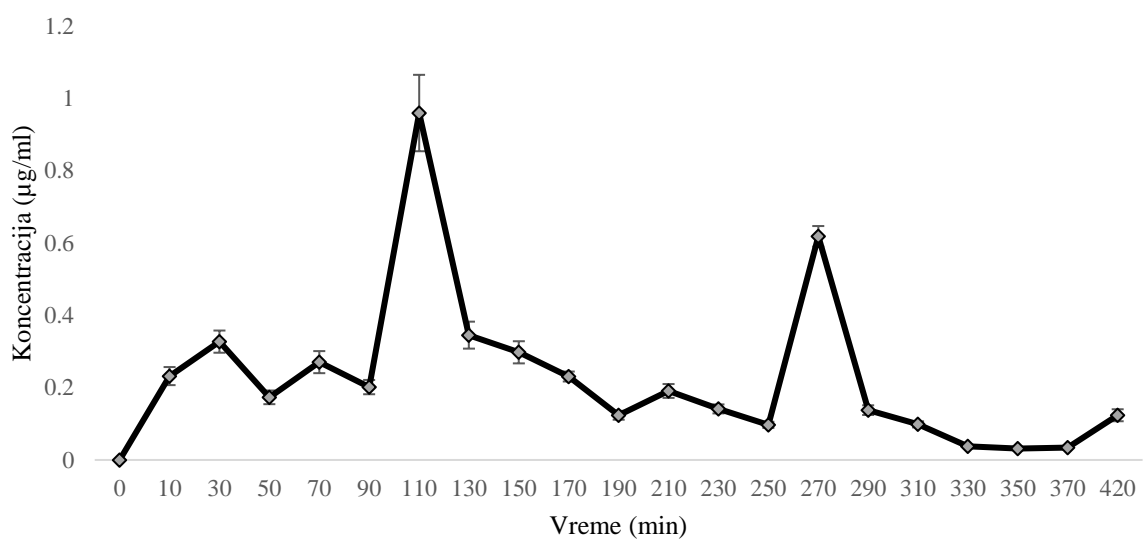
Tabela 18. Izračunati farmakokinetički parametri na osnovu koncentracija u plazmi pacova nakon oralne primene levofloksacina (48 mg/kg) u kombinaciji sa daidzeinom (5,7 mg/kg)

Farmakokinetički parameter	Jedinica mere	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
λ_z	1/min	$0,005 \pm 0,000$
$t_{1/2}$	min	$148,081 \pm 3,934$
t_{max}	min	$35,000 \pm 4,564$
C_{max}	$\mu\text{g/ml}$	$1,177 \pm 0,391$
AUC_{0-7}	$\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$	$145,706 \pm 30,434$
$\text{AUC}_{0-\text{inf_obs}}$	$\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$	$185,712 \pm 35,556$
$\text{AUC}_{0-7/0-\text{inf_obs}}$		$0,770 \pm 0,016$
$\text{MRT}_{0-\text{inf_obs}}$	min	$286,563 \pm 16,055$
V_z/F_{obs}	$(\text{mg/kg})/(\mu\text{g/ml})$	$73,132 \pm 17,730$
Cl/F_{obs}	$(\text{mg/kg})/(\mu\text{g/ml})/\text{min}$	$0,331 \pm 0,071$

Legenda: λ_z - konstanta eliminacije, $t_{1/2}$ - poluvreme eliminacije, t_{max} - vreme za postizanje maksimalne koncentracije, C_{max} - maksimalna koncentracija, AUC_{0-7} - površina ispod krive koncentracija-vreme (eng. *area under the curve* – AUC) od nula do 7 časova, $\text{AUC}_{0-\infty}$ - površina ispod krive koncentracija-vreme od nula do beskonačnosti, $\text{AUC}_{0-7/0-\infty}$ – količnik prethodne dve vrednosti, $\text{MRT}_{0-\infty}$ - prosečno vreme tokom kojeg se lek zadržava u telu (eng. *mean residence time*), V_d/F - prividni volumen distribucije u terminalnoj fazi posle neintravenske primene, Cl/F - totalni klirens nakon oralne primene.

4.2.3.2 Farmakokinetika levofloksacina u intersticijalnoj tečnosti poprečno-prugastog mišića nakon primene sa daidzeinom

Na **grafikonu 13.** je prikazana kriva koncentracija-vreme, sastavljena na osnovu koncentracija levofloksacina izmerenih u intersticijalnoj tečnosti mišića buta nakon primene levofloksacina zajedno sa daidzeinom u najnižoj ispitivanoj dozi (1,9mg/kg). Na grafikonu su prikazane izmerene srednje vrednosti i standardna greška srednje vrednosti (SEM) za svaku od 21 vremenske tačke. Na osnovu srednjih vrednosti za svaku od tačaka, najviša vrednost koncentracije postizala se oko 3 sata nakon administracije, indikujući odloženu distribuciju u mišićnu tkivo nakon primene sa daidzeinom. Oko 4,5 sata nakon administracije, primećen je ponovni porast koncentracija. Maksimalna koncentracija u mišiću na osnovu srednjih vrednosti izmerenih kod 6 životinja u svakoj od vremenskih tačaka iznosila je oko 0,95 µg/ml.



Grafikon 13. Koncentracije levofloksacina u intersticijalnoj tečnosti butnog mišića pacova pacova nakon oralne primene levofloksacina (48 mg/kg) u kombinaciji sa daidzeinom (1,9 mg/kg)

U **tabeli 19.** su prikazani farmakokinetički parametri levofloksacina dobijeni nekompartmanskim analizom uzoraka dijalizata nakon primene zajedno sa daidzeinom u ispitivanoj dozi (1,9 mg/kg). Kako su uzorci dijalizata sakupljeni kontinuirano u intervalima uzorkovanja od 20 minuta, kao vremenske tačke, uzete su sredine svakog intervala, da bi se izbegla distorzija krive koncentracija-vreme. Vrednosti maksimalnih koncentracija iznosile su $1,100 \pm 0,124$ $\mu\text{g/ml}$. Zabeležena je visoka varijabilnost među životinjama u vrednostima C_{max} u mišiću.

Tabela 19. Izračunati farmakokinetički parametri na osnovu koncentracija u intersticijalnoj tečnosti butnog mišića pacova nakon oralne primene levofloksacina (48 mg/kg) u kombinaciji sa daidzeinom (1,9 mg/kg)

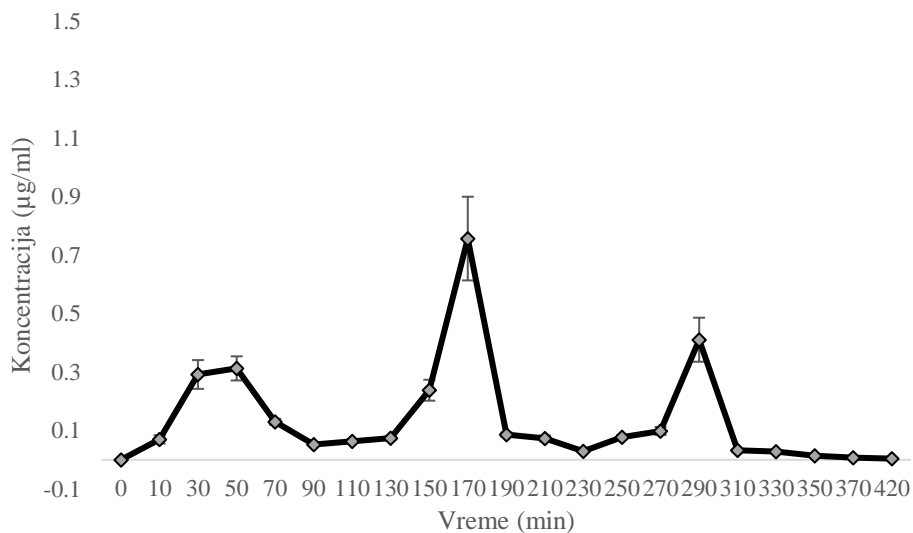
Farmakokinetički parametar	Jedinica mere	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
λ_z	1/min	$0,012 \pm 0,004$
$t_{1/2}$	min	$302,548 \pm 200,634$
t_{max}	min	$163,333 \pm 28,508$
C_{max}	$\mu\text{g/ml}$	$1,100 \pm 0,124$
AUC_{0-7}	$\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$	$93,384 \pm 12,079$
$\text{AUC}_{0-\text{inf_obs}}$	$\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$	$198,389 \pm 70,360$
$\text{AUC}_{0-7/0-\text{inf_obs}}$		$0,763 \pm 0,121$
$\text{MRT}_{0-\text{inf_obs}}$	min	$566,796 \pm 315,451$
V_z/F_{obs}	$(\text{mg/kg})/(\mu\text{g/ml})$	/
Cl/F_{obs}	$(\text{mg/kg})/(\mu\text{g/ml})/\text{min}$	$0,370 \pm 0,056$

Legenda: λ_z - konstanta eliminacije, $t_{1/2}$ - poluvreme eliminacije, t_{max} - vreme za postizanje maksimalne koncentracije, C_{max} - maksimalna koncentracija, AUC_{0-7} - površina ispod krive koncentracija-vreme (eng. *area under the curve* – AUC) od nula do 7 časova, $\text{AUC}_{0-\infty}$ - površina ispod krive koncentracija-vreme od nula do beskonačnosti, $\text{AUC}_{0-7/0-\infty}$ – količnik prethodne dve vrednosti, $\text{MRT}_{0-\infty}$ - prosečno vreme tokom kojeg se lek zadržava u telu (eng. *mean residence time*), V_d/F - prividni volumen distribucije u terminalnoj fazi posle neintravenske primene, Cl/F - totalni klirens nakon oralne primene.

Vreme do postizanja maksimalnih koncentracija iznosilo je oko 2,5 sata. Poluvreme eliminacije iznosilo je oko 5 časova. Površina ispod krive koncentracija-vreme iznosi $94 \mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$, što odgovara vrednosti od $1,56 \mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$. Odnos $\text{AUC}_{0-7\text{mišić}}/\text{AUC}_{0-7\text{plazma}}$ iznosi 0,45, uz napomenu da su u uzorcima mikrodijalize merene slobodne koncentracije levofloksacina, a u plazmi ukupne. Ako se vrednosti koncentracija u plazmi koriguju na nivoe slobodnog levofloksacina, prema literturnim podacima o

vezivanju levofloksacina za proteine od 35%, dobija se odnos od 0,70 za vrednost $AUC_{0-7\text{mišić}}/AUC_{0-7\text{plazma}}$. Vreme zadržavanja u mišiću (MRT) je značajno duže nego određeno u plazmi.

Na **grafikonu 14** je prikazana kriva koncentracija-vreme, sastavljena na osnovu koncentracija levofloksacina izmerenih u intersticijalnoj tečnosti mišića buta nakon primene levofloksacina zajedno sa daidzeinom u srednjoj ispitivanoj dozi (3,8 mg/kg). Na grafikonu su prikazane izmerene srednje vrednosti i standardna greška srednje vrednosti (SEM) za svaku od 21 vremenske tačke. Na osnovu srednjih vrednosti za svaku od tačaka, najviša vrednost koncentracije postizala se oko 3 sata nakon administracije, indikujući odloženo distribuciju u mišićnu tkivo nakon primene sa daidzeinom. Oko 4,5 sata nakon administracije, primećuje se ponovni porast koncentracija. Maksimalna koncentracija u mišiću na osnovu srednjih vrednosti izmerenih kod 6 životinja u svakoj od vremenskih tačaka iznosila je oko 0,7 µg/ml.



Grafikon 14. Koncentracije levofloksacina u intersticijalnoj tečnosti butnog mišića pacova pacova nakon oralne primene levofloksacina (48 mg/kg) u kombinaciji sa daidzeinom (3,8 mg/kg)

U **tabeli 20.** su prikazani farmakokinetički parametri levofloksacina dobijeni nekompartmanskim analizom uzoraka dijalizata nakon primene zajedno sa daidzeinom u srednjoj ispitivanoj dozi (3,8 mg/kg). Kako su uzorci dijalizata sakupljeni kontinuirano u intervalima uzorkovanja od 20 minuta, kao vremenske tačke, uzete su sredine svakog intervala, da bi se izbegla distorzija krive koncentracija-vreme. Vrednosti maksimalnih koncentracija iznosile su $1,030 \pm 0,200$ $\mu\text{g/ml}$. Zabeležena je visoka varijabilnost među životinjama u vrednostima C_{max} u mišiću.

Tabela 20. Izračunati farmakokinetički parametri na osnovu koncentracija u u intersticijalnoj tečnosti butnog mišića pacova nakon oralne primene levofloksacina (48 mg/kg) u kombinaciji sa daidzeinom (3,8 mg/kg)

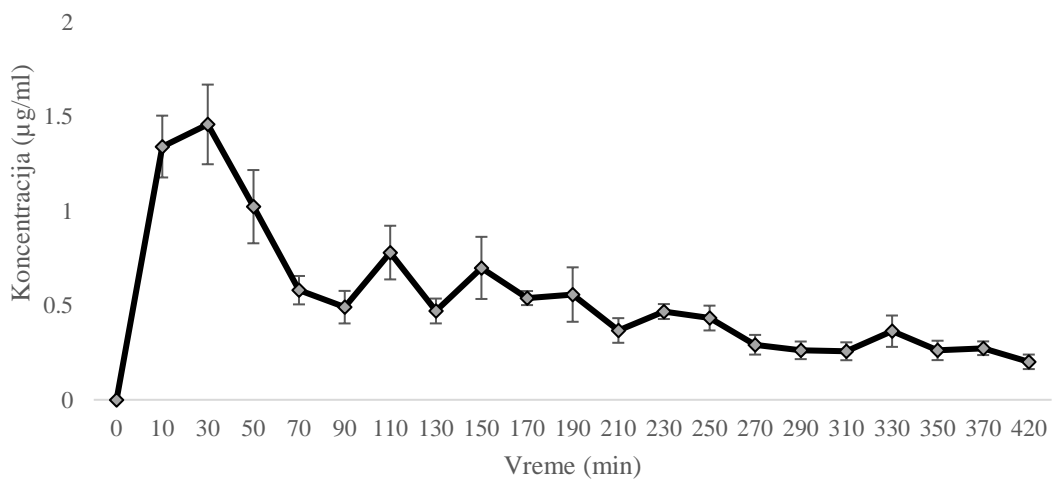
Farmakokinetički parametar	Jedinica mere	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
λ_z	1/min	$0,027 \pm 0,004$
$t_{1/2}$	min	$31,122 \pm 5,149$
t_{max}	min	$242,000 \pm 22,220$
C_{max}	$\mu\text{g/ml}$	$1,030 \pm 0,200$
AUC_{0-7}	min	$56,272 \pm 8,268$
$\text{AUC}_{0-\text{inf_obs}}$	$\mu\text{g/ml} * \text{min}$	$56,974 \pm 8,281$
$\text{AUC}_{0-7/0-\text{inf_obs}}$	$\mu\text{g/ml} * \text{min}$	$0,987 \pm 0,004$
$\text{MRT}_{0-\text{inf_obs}}$		$161,544 \pm 2,079$
V_z/F_{obs}	min	/
Cl/F_{obs}	$(\text{mg/kg})/(\mu\text{g/ml})$	$1,064 \pm 0,235$
λ_z	$(\text{mg/kg})/(\mu\text{g/ml})/\text{min}$	$0,027 \pm 0,004$

Legenda: λ_z - konstanta eliminacije, $t_{1/2}$ - poluvreme eliminacije, t_{max} - vreme za postizanje maksimalne koncentracije, C_{max} - maksimalna koncentracija, AUC_{0-7} - površina ispod krive koncentracija-vreme (eng. *area under the curve* – AUC) od nula do 7 časova, $\text{AUC}_{0-\text{inf}}$ - površina ispod krive koncentracija-vreme od nula do beskonačnosti, $\text{AUC}_{0-7/0-\text{inf}}$ – količnik prethodne dve vrednosti, $\text{MRT}_{0-\text{inf}}$ - prosečno vreme tokom kojeg se lek zadržava u telu (eng. *mean residence time*), V_d/F - prividni volumen distribucije u terminalnoj fazi posle neintravenske primene, Cl/F - totalni klirens nakon oralne primene.

Vreme do postizanja maksimalnih koncentracija iznosilo je oko 2,5 sata. Poluvreme eliminacije iznosilo je svega 30 minuta. Površina ispod krive koncentracija-vreme iznosila je $56,3$ $\mu\text{g/ml} * \text{min}$, što odgovara vrednosti od $0,93$ $\mu\text{g/ml} * \text{h}$. Odnos $\text{AUC}_{0-7\text{mišić}}/\text{AUC}_{0-7\text{plazma}}$ iznosio je $0,39$, uz napomenu da su u uzorcima mikrodijalize merene slobodne koncentracije levofloksacina, a u plazmi ukupne. Ako se vrednosti koncentracija u plazmi koriguju na nivoe slobodnog levofloksacina, prema literturnim

podacima o vezivanju levofloksacina za proteine od 35%, dobija se odnos od 0,56 za vrednost $AUC_{0-7\text{mišić}}/AUC_{0-7\text{plazma}}$. Vreme zadžavanja u mišiću (MRT) bilo je značajno kraće nego ono određeno u plazmi.

Na **grafikonu 15.** je prikazana kriva koncentracija-vreme, sastavljena na osnovu koncentracija levofloksacina izmerenih u intersticijalnoj tečnosti mišića buta nakon primene levofloksacina zajedno sa daidzeinom u najvišoj ispitivanoj dozi (5,7 mg/kg). Na grafikonu su prikazane izmerene srednje vrednosti i standardna greška srednje vrednosti (SEM) za svaku od 21 vremenske tačke. Na osnovu srednjih vrednosti za svaku od tačaka, najviša vrednost koncentracije postizala se oko pola sata nakon administracije nakon čega je dolazilo do naglog pada koncentracija. Maksimalna koncentracija u mišiću na osnovu srednjih vrednosti izmerenih kod 6 životinja u svakoj od vremenskih tačaka iznosila je oko 1,5 µg/ml.



Grafikon 15. Koncentracije levofloksacina u intersticijalnoj tečnosti butnog mišića pacova pacova nakon oralne primene levofloksacina (48 mg/kg) u kombinaciji sa daidzeinom (5,7 mg/kg)

U **tabeli 21.** su prikazani farmakokinetički parametri levofloksacina dobijeni nekompartmansom analizom uzoraka dijalizata nakon primene zajedno sa daidzeinom u najvišoj ispitivanoj dozi (5,7 mg/kg). Kako su uzorci dijalizata sakupljeni kontinuirano u intervalima uzorkovanja od 20 minuta, kao vremenske tačke, uzete su sredine svakog intervala, da bi se izbegla distorzija krive koncentracija-vreme. Vrednosti maksimalnih koncentracija iznosile su $1,832 \pm 0,316$ $\mu\text{g/ml}$. Zabeležena je visoka varijabilnost među životinjama u vrednostima C_{max} u mišiću.

Tabela 21. Izračunati farmakokinetički parametri na osnovu koncentracija u u intersticijalnoj tečnosti butnog mišića pacova nakon oralne primene levofloksacina (48 mg/kg) u kombinaciji sa daidzeinom (5,7 mg/kg)

Farmakokinetički parametar	Jedinica mere	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
λ_z	1/min	$0,004 \pm 0,001$
$t_{1/2}$	min	$197,751 \pm 40,440$
t_{max}	min	$16,667 \pm 6,086$
C_{max}	$\mu\text{g/ml}$	$1,832 \pm 0,316$
AUC_{0-7}	$\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$	$220,883 \pm 60,774$
$\text{AUC}_{0-\text{inf_obs}}$	$\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$	$281,121 \pm 82,226$
$\text{AUC}_{0-7/0-\text{inf_obs}}$		$0,830 \pm 0,030$
$\text{MRT}_{0-\text{inf_obs}}$	min	$246,964 \pm 27,292$
Vd/F_{obs}	$(\text{mg/kg})/(\mu\text{g/ml})$	/
Cl/F_{obs}	$(\text{mg/kg})/(\mu\text{g/ml})/\text{min}$	$0,301 \pm 0,080$

Legenda: λ_z - konstanta eliminacije, $t_{1/2}$ - poluvreme eliminacije, t_{max} - vreme za postizanje maksimalne koncentracije, C_{max} - maksimalna koncentracija, AUC_{0-7} - površina ispod krive koncentracija-vreme (eng. *area under the curve* – AUC) od nula do 7 časova, $\text{AUC}_{0-\infty}$ - površina ispod krive koncentracija-vreme od nula do beskonačnosti, $\text{AUC}_{0-7/0-\infty}$ – količnik prethodne dve vrednosti, $\text{MRT}_{0-\infty}$ - prosečno vreme tokom kojeg se lek zadržava u telu (eng. *mean residence time*), Vd/F - prividni volumen distribucije u terminalnoj fazi posle neintravenske primene, Cl/F - totalni klirens nakon oralne primene.

Vreme do postizanja maksimalnih koncentracija iznosilo je oko 2,5 sata. Poluvreme eliminacije iznosilo je svega 30 minuta. Površina ispod krive koncentracija-vreme iznosila je $221 \mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$, što odgovara vrednosti od $3,68 \mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$. Odnos $\text{AUC}_{0-7\text{mišić}}/\text{AUC}_{0-7\text{plazma}}$ iznosio je 1,51, uz napomenu da su u uzorcima mikrodijalize merene slobodne koncentracije levofloksacina, a u plazmi ukupne. Ako se vrednosti koncentracija u plazmi koriguju na nivoe slobodnog levofloksacina, prema literaturnim podacima o vezivanju levofloksacina za proteine od 35%, dobija se odnos od 1,89 za vrednost AUC_{0-7} .

$t_{7\text{mišić}}/AUC_{0-7\text{plazma}}$. Vreme zadžavanja u mišiću (MRT) i klirens bili su slični onima određenim u plazmi.

4.2.3.3 Farmakokinetika levofloksacina u organima pacova nakon konkomitantne primene sa daidzeinom

U **tabeli 22.** prikazane su izmerene koncentracije levofloksacina u uzorcima homogenata tkiva, uzoraka fecesa i urina nakon primene levofloksacina u kombinaciji sa daidzeinom u najnižoj ispitivanoj dozi (1,9 mg/kg). Koncentracije su izražene u $\mu\text{g/g}$ uzorka osim za urin gde su izražene u $\mu\text{g/ml}$ urina. Najviše koncentracije su izmerene u urinu, indikujući da se levofloksacin nakuplja u urinu u procesu eliminacije. Koncentracije su bile visoke i u fecesu, indikujući da se deo unesenog daidzeina nije resorbovao nakon *per os* primene ili se izlučio putem fecesa nepromenjen. Koncentracije levofloksacina u mozgu, nakon primene u kombinaciji sa daidzeinom u najnižoj dozi, bile su značajno niže nego u drugim tkivima, pokazujući ograničen prodor levofloksacina kroz krvno-moždanu barijeru zdravih pacova.

Tabela 22. Koncentracije levofloksacina u homogenatima tkiva, fecesa i urina pacova nakon 7 časova od oralne primene oralne primene levofloksacina (48 mg/kg) u kombinaciji sa daidzeinom (1,9 mg/kg)

Uzorak	Jedinica mere	\bar{x}	SEM
Bubreg	$\mu\text{g/g}$	0,455	0,058
Feces	$\mu\text{g/g}$	10,934	5,985
Jetra	$\mu\text{g/g}$	1,457	0,467
Mišić	$\mu\text{g/g}$	2,065	0,331
Mozak	$\mu\text{g/g}$	0,318	0,045
Pluća	$\mu\text{g/g}$	1,016	0,418
Prostata	$\mu\text{g/g}$	1,629	0,140
Urin	$\mu\text{g/ml}$	124,291	58,619

U **tabeli 23.** prikazane su izmerene koncentracije levofloksacina u uzorcima homogenata tkiva, uzoraka fecesa i urina nakon primene levofloksacina u kombinaciji sa daidzeinom u srednjoj ispitivanoj dozi (3,8 mg/kg). Koncentracije su izražene u $\mu\text{g/g}$ uzorka osim za urin gde su izražene u $\mu\text{g/ml}$ urina. Najviše koncentracije su izmerene u urinu, indikujući da se levofloksacin nakupljao

u urinu u procesu eliminacije. Koncentracije su bile visoke i u fecesu, indikujući da se deo unesenog levofloksacina nije resorbovao nakon *per os* primene ili se izlučio putem fecesa nepromenjen. Nakon konkomitantne primene sa daidzeinom u srednjoj dozi, levofloksacin dobro prodire i u tkivo bubrega i prostate.

Tabela 23. Koncentracije levofloksacina u homogenatima tkiva, fecesa i urina pacova nakon 7 časova od oralne primene oralne primene levofloksacina (48 mg/kg) u kombinaciji sa daidzeinom (3,8 mg/kg)

Uzorak	Jedinica mere	\bar{x}	SEM
Bubreg	$\mu\text{g/g}$	2,091	0,066
Feces	$\mu\text{g/g}$	12,582	5,522
Jetra	$\mu\text{g/g}$	2,912	0,496
Mišić	$\mu\text{g/g}$	1,270	0,257
Mozak	$\mu\text{g/g}$	0,337	0,051
Pluća	$\mu\text{g/g}$	0,778	0,039
Prostata	$\mu\text{g/g}$	1,251	0,206
Urin	$\mu\text{g/ml}$	13,913	1,534

U **tabeli 24.** prikazane su izmerene koncentracije levofloksacina u uzorcima homogenata tkiva, uzoraka fecesa i urina nakon primene levofloksacina u kombinaciji sa daidzeinom u najvišoj ispitivanoj dozi (5,7 mg/kg). Koncentracije su izražene u $\mu\text{g/g}$ uzorka osim za urin gde su izražene u $\mu\text{g/ml}$ urina. Najviše koncentracije su izmerene u urinu, indikujući da se levofloksacin nakupljao u urinu u procesu eliminacije. Koncentracije su bile visoke i u fecesu, indikujući da se deo unesenog levofloksacina nije resorbovao nakon *per os* primene ili se izlučio putem fecesa nepromenjen. Nakon konkomitantne primene sa daidzeinom u najvišoj dozi, levofloksacin dobro prodire i u tkivo prostate, pluća i jetre.

Tabela 24. Koncentracije levofloksacina u homogenatima tkiva, fecesa i urina pacova nakon 7 časova od oralne primene oralne primene levofloksacina (48 mg/kg) u kombinaciji sa daidzeinom (5,7 mg/kg)

Uzorak	Jedinica mere	\bar{x}	SEM
Bubreg	$\mu\text{g/g}$	1,142	0,429
Feces	$\mu\text{g/g}$	1,682	0,907
Jetra	$\mu\text{g/g}$	3,238	0,395
Mišić	$\mu\text{g/g}$	0,589	0,227
Mozak	$\mu\text{g/g}$	0,174	0,054
Pluća	$\mu\text{g/g}$	1,303	0,120
Prostata	$\mu\text{g/g}$	1,892	0,412
Urin	$\mu\text{g/ml}$	115,734	63,281

4.2.3.4 Uticaj daidzeina na farmakokinetiku levofloksacina

U **tabeli 25.** prikazani su farmakokinetički parametri levofloksacina u plazmi određeni nekompartmanskim analizom samostalno i u kombinaciji sa rastućim dozama daidzeina, kao i rezultati statističke analize. Postojala je statistički značajna razlika u konstanti eliminacije među ispitivanim grupama životinja. Vrednosti konstante eliminacije kod grupe koja je primila levofloksacin u kombinaciji sa daidzeinom u najnižoj dozi (D1LVX) bile su statistički značajno veće u odnosu na grupe koje su primile samo levofloksacin (LVX, $p=0,007$) i levofloksacin i daidzein u srednjoj dozi (D2LVX $p=0,05$). Razlike su primećene i u poluvremenu eliminacije. Vrednosti poluvremena eliminacije kod grupe koja je primila daidzein u najnižoj dozi (D1LVX) bile su statistički značajno niže u odnosu na grupu koja je primila samo levofloksacin (LVX, $p=0,0027$). Vrednosti vremena do postizanja maksimalnih koncentracija u plazmi takođe su se razlikovale među ispitanim grupama. Vrednosti t_{max} kod grupe koja je primila samo levofloksacin bile su statistički značajno niže u odnosu na grupu koja je primila levofloksacin u kombinaciji sa daidzeinom u najnižoj ($p=0,036$) i srednjoj dozi ($p=0,011$).

U **tabeli 26.** prikazani su farmakokinetički parametri levofloksacina u tkivu mišića određeni nekompartmanskim analizom samostalno i u kombinaciji sa rastućim dozama daidzeina, kao i rezultati statističke analize. Postojala je statistički značajna razlika u konstanti eliminacije između ispitivanih grupa. Vrednosti konstante eliminacije kod grupe koja je primila samo levofloksacin u kombinaciji sa daidzeinom u srednjoj dozi (D2LVX) bile su statistički značajno više u odnosu na grupe koje su primile samo levofloksacin (LVX, $p=0,008$) i kombinaciju levofloksacina i daidzeina u najvišoj (D3LVX, $p=0,002$) dozi. Razlike su primećene i u poluvremenu eliminacije. Vrednosti poluvremena eliminacije kod grupe koja je primila samo levofloksacin (LVX) bile su statistički značajno niže u odnosu na grupu koja je primila levofloksacin u kombinaciji sa

daidzeinom u srednjoj dozi (D2LVX, $p < 0,001$) i statistički značajno više u odnosu na grupu koja je primila kombinaciju levofloksacina i daidzeina u najnižoj dozi (D1LVX, $p = 0,006$). Vrednosti vremena do postizanja maksimalnih koncentracija u mišiću takođe su se razlikovale među ispitanim grupama. Vrednosti t_{max} kod grupe koja je primila samo levofloksacin bile su statistički značajno niže u odnosu na grupu koja je primila levofloksacin u kombinaciji sa daidzeinom u najnižoj ($p = 0,036$) i srednjoj dozi ($p = 0,011$). Primećene su i statistički značajne razlike u maksimalnim koncentracijama postignutim u intersticijalnoj tečnosti mišića. Grupa koja je primila levofloksacin u kombinaciji sa daidzeinom u najvišoj dozi (D3LVX) imala je statistički značajno više vrednosti C_{max} u odnosu na grupu životinja koja je primila sam levofloksacin (LVX, $p = 0,021$). Isto je primećeno i za vrednosti površine ispod krive koncentracija-vreme (AUC_{0-7}), gde su vrednosti AUC_{0-7} bile statistički značajno više u grupi D3LVX u odnosu na grupu koja je primila čist levofloksacin ($p = 0,032$). Vrednosti klirensa su bile statistički značajno više u grupi koja je primila levofloksacin u kombinaciji sa daidzeinom u srednjoj dozi (D2LVX) u odnosu na grupu koja je primila levofloksacin u kombinaciji sa daidzeinom u najvišoj dozi (D3LVX, $p = 0,012$).

Tabela 25. Poređenje farmakokinetičkih parametara levofloksacina na osnovu koncentracija u plazmi samostalno i u kombinaciji sa daidzeinom u rastućim dozama

Farmakokinetički parametar	Jedinica mere	Eksperimentalna grupa				
		LVX ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	LVX D1 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	LVX D2 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	LVX D3 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	p
λ_z	1/min	0,004±0,000	0,008±0,001	0,027±0,005	0,005±0,001	0,004
$t_{1/2}$	min	173,287±14,532	105,643±17,138	31,122±6,18	148,081±54,178	0,015
t_{\max}	min	35,6±14,142	192,000±59,154	242,000±29,39	35,000±8,000	0,007
C_{\max}	µg/ml	1,227±0,194	0,803±0,073	1,030±0,264	1,177±0,371	0,390
AUC_{0-7}	µg/ml*min	237,386±24,924	207,561±32,031	56,272±10,937	145,706±51,937	0,087
$AUC_{0-\text{inf_obs}}$	µg/ml*min	305,398±34,275	253,346±32,196	56,974±10,955	185,712±72,631	0,132
$AUC_{0-7/0-\text{inf_obs}}$		0,782±0,029	0,807±0,045	0,987±0,005	0,770±0,038	0,106
$MRT_{0-\text{inf_obs}}$	min	287,842±24,695	283,000±24,955	161,544±2,750	286,563±35,407	0,098
V_z/F_{obs}	(mg/kg)/(µg/ml)	42,793±6,957	33,026±8,333	45,426±11,479	73,132±13,478	0,099
Cl/F_{obs}	(mg/kg)/(µg/ml)/min	0,172±0,022	0,208±0,030	1,064±0,310	0,331±0,092	0,426

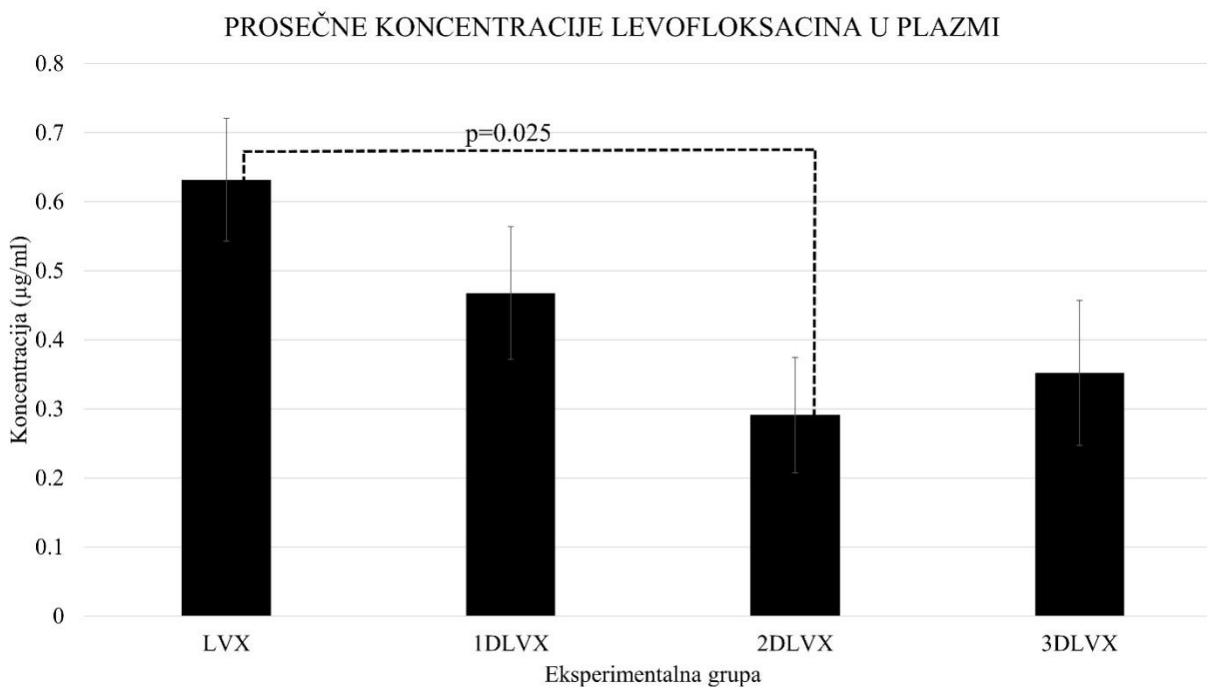
Legenda: λ_z - konstanta eliminacije, $t_{1/2}$ - poluvreme eliminacije, t_{\max} - vreme za postizanje maksimalne koncentracije, C_{\max} - maksimalna koncentracija, AUC_{0-7} - površina ispod krive koncentracija-vreme (eng. *area under the curve* – AUC) od nula do 7 časova, $AUC_{0-\infty}$ - površina ispod krive koncentracija-vreme od nula do beskonačnosti, $AUC_{0-7/0-\infty}$ – količnik prethodne dve vrednosti, $MRT_{0-\infty}$ - prosečno vreme tokom kojeg se lek zadržava u telu (eng. *mean residence time*), V_d/F - prividni volumen distribucije u terminalnoj fazi posle neintravenske primene, Cl/F - totalni klirens nakon oralne primene.

Tabela 26. Poređenje farmakokinetičkih parametara levofloksacina određenih na osnovu koncentracija u intersticijalnoj tečnosti mišića buta samostalno i u kombinaciji sa daidzeinom u rastućim dozama

Farmakokinetički parametar	Jedinica mere	Eksperimentalna grupa				
		LVX ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	LVX D1 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	LVX D2 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	LVX D3 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	p
λ_z	1/min	0,006±0,001	0,012±0,004	0,027±0,004	0,004±0,001	0,002
$t_{1/2}$	Min	142,346±32,194	302,548±200,634	31,122±5,149	197,751±40,440	0,559
t_{\max}	Min	34,000±9,797	163,333±28,508	242,000±22,220	16,667±6,086	0,000
C_{\max}	µg/ml	0,659±0,224	1,100±0,124	1,030±0,200	1,832±0,316	0,032
AUC_{0-7}	µg/ml*min	88,736±10,900	93,384±12,079	56,272±8,268	220,883±60,774	0,029
$AUC_{0-\text{inf_obs}}$	µg/ml*min	111,965±9,917	198,389±70,360	56,974±8,281	281,121±82,226	0,136
$AUC_{0-7/0-\text{inf_obs}}$		0,794±0,060	0,763±0,121	0,987±0,004	0,830±0,030	0,307
$MRT_{0-\text{inf_obs}}$	Min	259,137±42,235	566,796±315,451	161,544±2,079	246,964±27,292	0,528
V_z/F_{obs}	(mg/kg)/(µg/ml)	/	/	/	/	/
Cl/F_{obs}	(mg/kg)/(µg/ml)/min	0,006±0,001	0,370±0,056	1,064±0,235	0,301±0,080	0,011

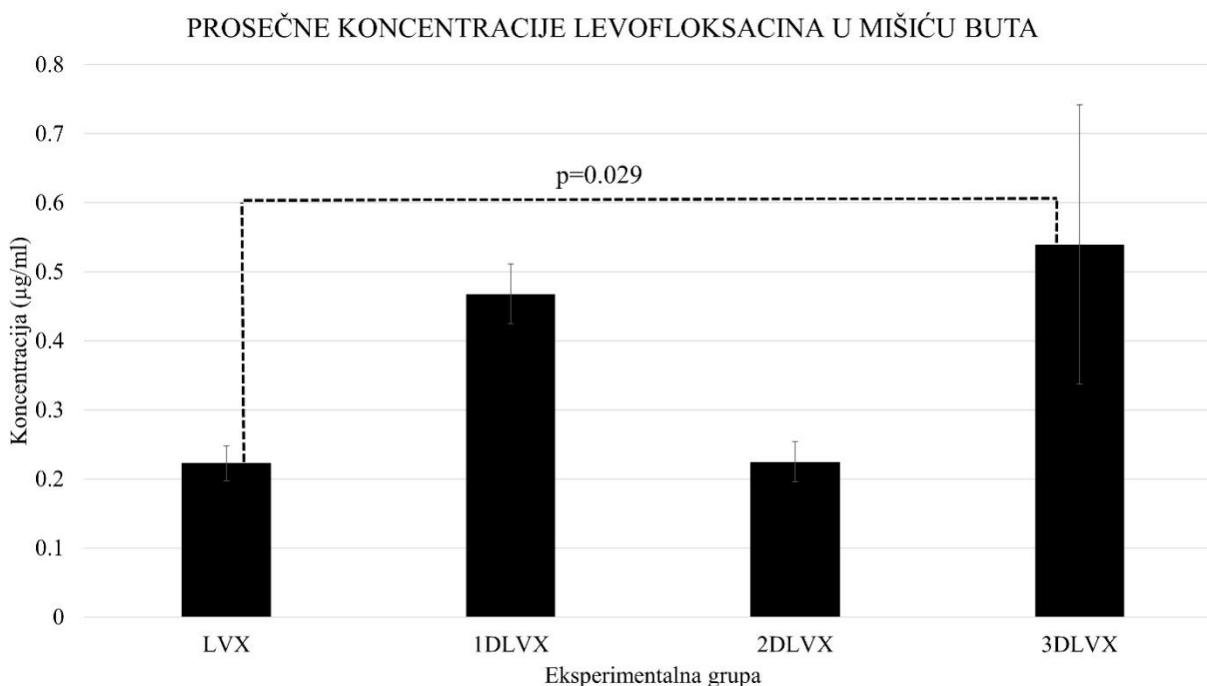
Legenda: λ_z - konstanta eliminacije, $t_{1/2}$ - poluvreme eliminacije, t_{\max} - vreme za postizanje maksimalne koncentracije, C_{\max} - maksimalna koncentracija, AUC_{0-7} - površina ispod krive koncentracija-vreme (eng. *area under the curve* – AUC) od nula do 7 časova, $AUC_{0-\infty}$ - površina ispod krive koncentracija-vreme od nula do beskonačnosti, $AUC_{0-7/0-\infty}$ – količnik prethodne dve vrednosti, $MRT_{0-\infty}$ - prosečno vreme tokom kojeg se lek zadržava u telu (eng. *mean residence time*), V_d/F - prividni volumen distribucije u terminalnoj fazi posle neintravenske primene, Cl/F - totalni klirens nakon oralne primene.

Na **grafikonu 16.** prikazan je uticaj daidzeina na vrednosti prosečnih izmerenih koncentracija levofloksacina u plazmi. Postojale su statistički značajne razlike ($F=3,828$ $p=0,027$) između posmatranih grupa. Grupa životinja koja je primila kombinaciju levofloksacina sa daidzeinom u srednjoj ispitivanoj dozi (2DLVX, 3,8 mg/kg) imala je statistički značajno niže vrednosti prosečnih koncentracija u plazmi u odnosu na grupu koja je primila čist levofloksacin (LVX, $p=0,025$). Vrednosti prosečnih izmerenih koncentracija u plazmi kod drugih grupa koje su primile levofloksacin u kombinaciji sa daidzeinom u najnižoj dozi (1D1LVX, $p=0,488$) i najvišoj dozi (D3LVX, $p=0,078$) nisu bile statistički značajne.



Grafikon 16. Poređenje prosečnih koncentracija levofloksacina u plazmi samostalno i u kombinaciji sa daidzeinom u rastućim dozama

Na grafikonu 17. prikazan je uticaj daidzeina na vrednosti prosečnih izmerenih koncentracija levofloksacina u intersticijalnoj tečnosti mišića. Postojale su statistički značajne razlike ($F=3,88$ $p=0,25$) grupa životinja koja je primila kombinaciju levofloksacina sa daidzeinom u najvišoj ispitivanoj dozi (D3LVX, 5,7 mg/kg) imala je statistički značajno više vrednosti prosečnih koncentracija u mišiću u odnosu na grupu koja je primila čist levofloksacin (LVX, $p=0,029$). Vrednosti kod drugih grupa koje su primile levofloksacin u kombinaciji sa daidzeinom u najnižoj dozi (D1LVX, $p=0,085$) i srednjoj dozi (D2LVX, $p=0,913$) nisu bile statistički značajne.



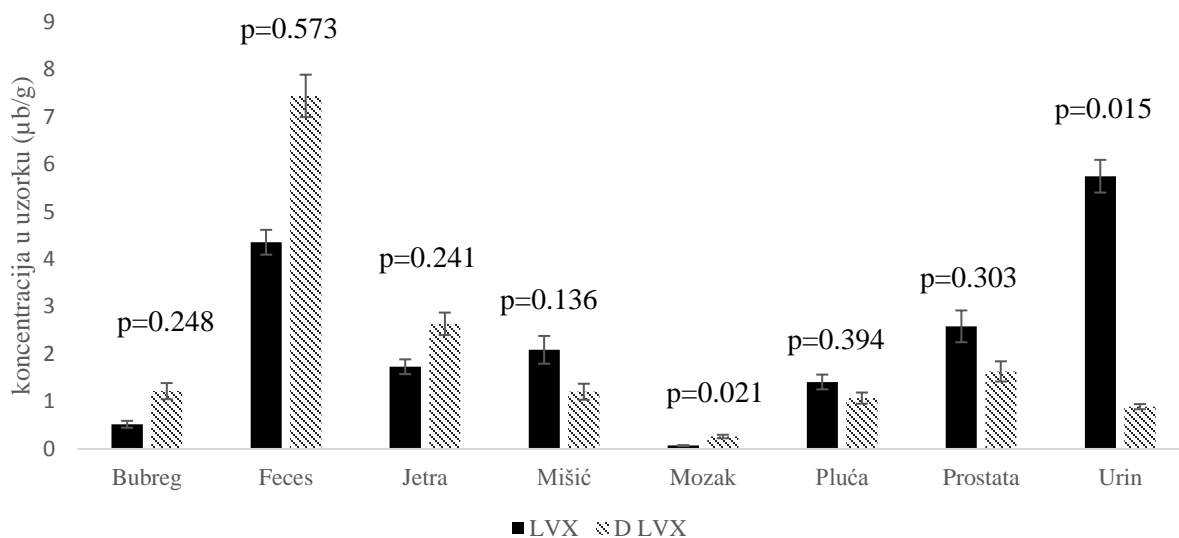
Grafikon 17. Poređenje prosečnih koncentracija levofloksacina u mišiću buta samostalno i u kombinaciji sa daidzeinom u rastućim dozama

U **tabeli 27.** prikazan je uticaj daidzeina na vrednosti prosečnih izmerenih koncentracija levofloksacina u homogenatima tkiva, uzorcima fecesa i urina. Nakon 7 časova od početka ogleda, postojale su statistički značajne razlike u koncentraciji levofloksacina u homogenatu mišića kod grupe životinja koja je primila kombinaciju levofloksacina sa daidzeinom u najvišoj ispitivanoj dozi (D3LVX, 5,7 mg/kg) u odnosu na grupu koja je primila čist levofloksacin (LVX, p=0,028). Za druge organe, statistički značajne razlike nisu zabeležene.

Tabela 27. Poređenje koncentracija levofloksacina u homogenatima tkiva samostalno i u kombinaciji sa daidzeinom nakon 7 časova od administracije

Tkivo (uzorak)	Jedinica mere	Eksperimentalna grupa				Statistička značajnost
		LVX ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	LVX D1 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	LVX D2 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	LVX D3 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	
Bubreg	µg/g	0,52±0,25	0,46±0,06	2,09±0,07	1,14±0,43	0,234
Feces	µg/g	4,36±1,72	10,93±5,99	12,58±5,52	1,68±0,91	0,202
Jetra	µg/g	1,73±0,42	1,46±0,47	2,91±0,50	3,24±0,40	0,129
Mišić	µg/g	2,09±0,36	2,07±0,33	1,27±0,26	0,59±0,23	0,034
Mozak	µg/g	0,07±0,02	0,32±0,05	0,34±0,05	0,17±0,05	0,767
Pluća	µg/g	1,41±0,28	1,02±0,42	0,78±0,04	1,30±0,12	0,661
Prostata	µg/ml	2,58±0,90	1,63±0,14	1,25±0,21	1,89±0,41	0,150
Urin	µg/g	574,65±170,11	124,29±58,62	13,91±1,53	115,73±63,28	0,440

Na **grafikonu 18.** prikazano je poređenje prosečnih koncentracija u homogenatima tkiva, uzorcima fecesa i urina za grupu tretiranu čistim levofloksacinom i kombinaciju sa daidzeinom, neovisno od doze. Koncentracije su bile statistički značajno niže u urinu ($p=0,015$) kod grupa životinja tretiranih kombinacijom levofloksacina i daidzeina. Daidzein je povećao prodor levofloksacina u mozak zdravih pacova, koncentracije izmerene u homogenatima mozga bile su statistički značajno više kod grupa životinja tretiranih kombinacijom daidzeina i levofloksacina (DLVX) u odnosu na grupu koja je tretirana levofloksacinom samostalno (LVX, $p=0,021$).



*na grafikonu prikazane koncentracije urina su u mikrogramima na 100 mikrolitara

Grafikon 18. Poređenje prosečnih koncentracija levofloksacina u homogenatima tkiva, uzorcima fecesa i urina samostalno (LVX) i u kombinaciji sa daidzeinom (DLVX), neovisno od primenjene doze daidzeina, 7 časova nakon administracije

4.3 Rezultati ispitivanja parametara toksičnosti

4.3.1 Uticaj na biohemijske parametre funkcije jetre i bubrega

U **tabeli 28.** prikazan je uticaj daidzeina i levofloksacina na vrednosti ukupnog bilirubina u serumu pacova. Primećene su statistički značajne razlike u vrednostima ukupnog bilirubina ($F=3,792$, $p=0,002$), primenom *post hoc* testova pokazano je da je grupa koja je primila daidzein u najnižoj dozi imala značajno više vrednosti ukupnog bilirubina u odnosu na grupu koja je primila daidzein u najvišoj dozi ($p=0,034$). Između grupe koja je primila čist levofloksacin i kombinaciju levofloksacina i daidzeina nisu zabeležene statistički značajne razlike (LVX vs D1LVX $p=0,970$, LVX vs D2LVX $p=0,761$, LVX vs D3LVX $p=0,990$). Vrednosti direktnog bilirubina su kod svih ispitivanih grupa bile ispod donjeg limita detekcije ($1,7 \mu\text{mol/l}$).

Tabela 28. Uticaj daidzeina i levofloksacina na vrednosti ukunog bilirubina u serumu pacova

Marker	Grupa	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
Bilirubin ukupni ($\mu\text{mol/l}$)	LVX	$2,10 \pm 0,07$
	D1	$2,30 \pm 0,07$
	D2	$1,85 \pm 0,09$
	D3	$1,77 \pm 0,05$
	D1LVX	$2,25 \pm 0,14$
	D2LVX	$1,85 \pm 0,07$
	D3LVX	$2,20 \pm 0,07$

U **tabeli 29.** prikazan je uticaj daidzeina i levofloksacina na vrednosti AST u serumu pacova. Između grupe koja je primila čist levofloksacin i grupa koje su primile kombinaciju levofloksacina i daidzeina nisu zabeležene statistički značajne razlike ($F=3,083$, $p=0,051$), te *post hoc* analize nisu sprovedene.

Tabela 29. Uticaj daidzeina i levofloksacina na vrednosti AST u serumu pacova

Marker	Grupa	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
AST (U/l)	LVX	288,00±13,79
	D1	166,00±9,06
	D2	248,50±65,51
	D3	189,33±22,33
	D1-LVX	180,00±54,26
	D2-LVX	268,00±1,73
	D3-LVX	336,00±28,85

U **tabeli 30.** prikazan je uticaj daidzeina i levofloksacina na vrednosti ALT u serumu pacova. Između grupe koja je primila čist levofloksacin i kombinaciju levofloksacina i daidzeina nisu zabeležene statistički značajne razlike ($F=1,418$, $p=0,285$).

Tabela 30. Uticaj daidzeina i levofloksacina na vrednosti ALT u serumu pacova

Marker	Grupa	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
ALT (U/l))	LVX	5,33±0,24
	D1	8,25±0,39
	D2	5,50±0,28
	D3	7,33±0,32
	D1-LVX	5,50±0,29
	D2-LVX	5,50±0,29
	D3-LVX	5,67±0,469

U **tabeli 31.** prikazan je uticaj daidzeina i levofloksacina na vrednosti ureje u serumu pacova. Primećene su statistički značajne razlike u vrednostima ureje ($F=4,280$, $p=0,015$), primenom

post hoc testova pokazano je da je grupa koja je primila daidzein u najnižoj dozi imala značajno više vrednosti ureje u odnosu na grupu koja je primila daidzein u najvišoj dozi ($p=0,009$). Između grupe koja je primila čist levofloksacin i kombinaciju levofloksacina i daidzeina nisu zabeležene statistički značajne razlike (LVX vs D1LVX $p=0,874$, LVX vs D2LVX $p=0,422$, LVX vs D3LVX $p=0,986$).

Tabela 31. Uticaj daidzeina i levofloksacina na vrednosti ureje u serumu pacova

Marker	Grupa	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
Ureja ($\mu\text{mol/l}$)	LVX	15,40 \pm 1,07
	D1	22,55 \pm 1,05
	D2	19,15 \pm 0,43
	D3	10,20 \pm 2,20
	D1-LVX	19,35 \pm 1,06
	D2-LVX	22,00 \pm 0,17
	D3-LVX	17,57 \pm 2,06

U **tabeli 32.** prikazan je uticaj daidzeina i levofloksacina na vrednosti kreatinina u serumu pacova. Između grupe koja je primila čist levofloksacin i grupa koje su primile kombinaciju levofloksacina i daidzeina nisu zabeležene statistički značajne razlike ($F=2,860$, $p=0,057$), te *post hoc* analize nisu sprovedene.

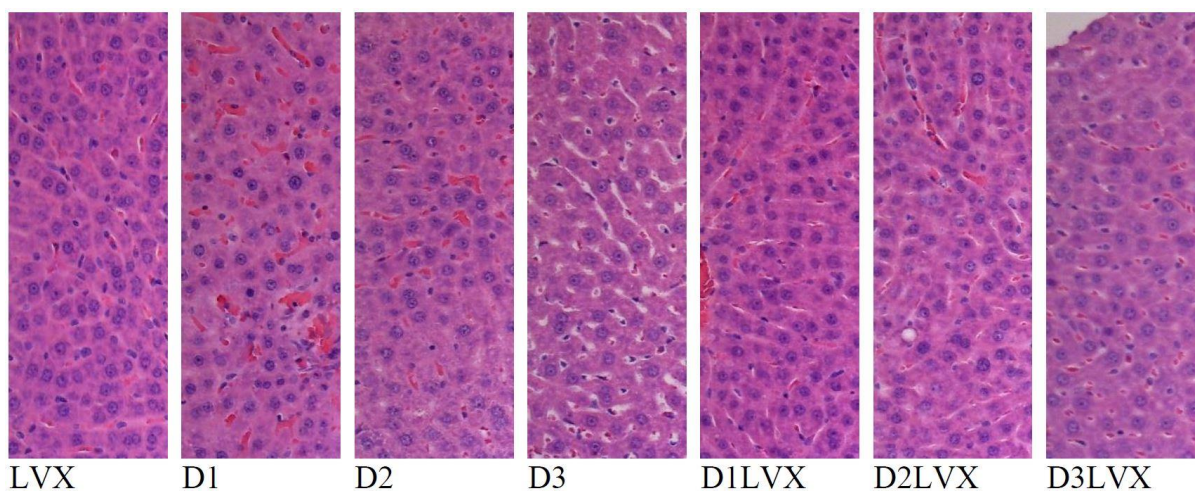
Tabela 32. Uticaj daidzeina i levofloksacina na vrednosti kreatinina u serumu pacova

Marker	Grupa	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	LVX	53,27 \pm 1,20
	D1	98,00 \pm 0,87
	D2	58,35 \pm 0,78
	D3	46,93 \pm 2,65
	D1-LVX	90,10 \pm 26,21
	D2-LVX	69,45 \pm 1,07
	D3-LVX	56,50 \pm 7,84

4.3.1 Uticaj daidzeina i levofloksacina na morfologiju jetre i bubrega pacova

Kod svih grupa životinja nađena je uobičajena histološka struktura jetre i bubrega bez histopatoloških promena.

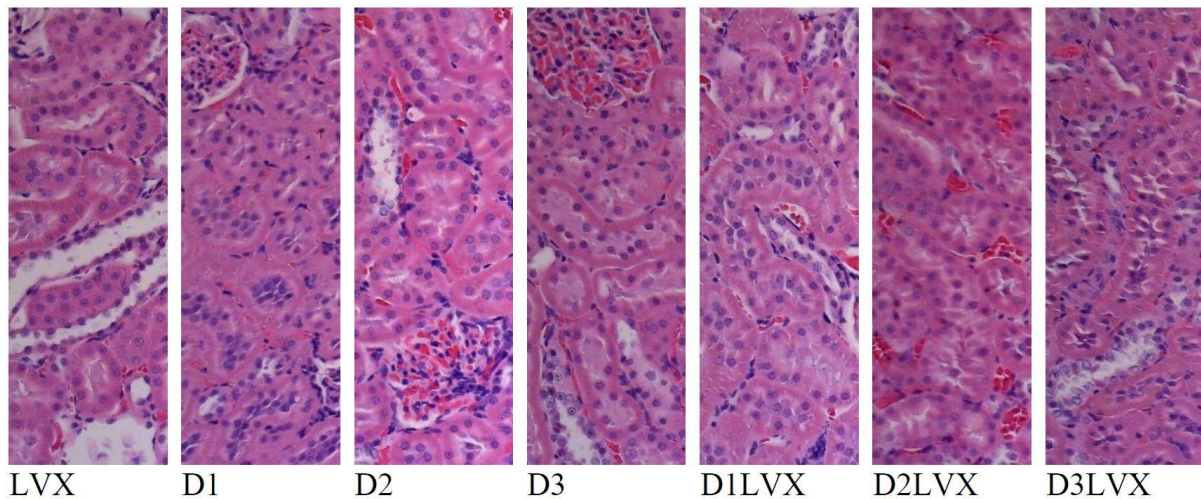
Na **slici 5**. Prikazani su rezultati hematoksilin-eozin bojenja parenhima jetre životinja iz svih ispitivanih grupa. Parenhim jetre čine hepatociti koji se zrakasto pružaju od centralne venule u vidu hepatičnih gredica i na taj način obrazuju poligonalne jetrine lobuluse. Prostor između hepatičnih gredica ispunjavaju sinusoidni kapilari koji su uobičajenog dijametra. Između lobulusa nađu se uski portni prostori ispunjeni oskudnim vezivnim tkivom kroz koje prolaze krvni sudovi i manji žučni kanalići.



Slika 5. Jetra pacova tretiranih levofloksacinom (LVX, 48 mg/kg), daidzeinom (D1 1,9 mg/kg, D2 3,8 mg/kg, D3 5,7 mg/kg) i kombinacijom daidzeina i levofloksacina (D1LVX 1,9 mg/kg + 48 mg/kg, D2LVX 3,8 mg/kg + 48 mg/kg, D3LVX 5,7 mg/kg+48 mg/kg), H&E, 100x

Na **slici 6**. prikazani su rezultati hematoksilin-eozin bojenja parenhima bubrega životinja iz svih ispitivanih grupa. Kortikalni bubrežni parenhim je uobičajene histološke građe kod svih ispitivanih grupa. Bubrežna telašca su sačinjena od kapilarne mreže organizovane u vidu klupka bez vidljivih histopatoloških promena. Tubulski sistem bubrežnog tkiva je obložen ćelijama kockastog epitela – nefrocitima. Proksimalni tubuli su sačinjeni od nefrocita izrazito

eozinofilne citoplazme i centralno postavljenog jedra koji ograničavaju veoma uzak lumen. Distalni tubuli imaju blago proširene lumene koje obložu nefrociti blede eozinofilne citoplazme i apikalno postavljenog jedra. Bubrežni intersticijum je ispunjen oskudnim vezivim tkivom i većim brojem sitnih krvnih sudova.



Slika 6. Bubrežni pacova tretiranih levofloksacinom (LVX, 48 mg/kg), daidzeinom (D1 1,9 mg/kg, D2 3,8 mg/kg, D3 5,7 mg/kg) i kombinacijom daidzeina i levofloksacina (D1LVX 1,9 mg/kg + 48 mg/kg, D2LVX 3,8 mg/kg + 48 mg/kg, D3LVX 5,7 mg/kg + 48 mg/kg), H&E, 100x

4.4 Uticaj daidzeina na osetljivost bakterija na levofloksacin

4.4.1 Određivanje vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija

U **tabeli 33.** prikazane su vrednosti određenih minimalnih inhibitornih koncentracija za levofloksacin primenom mikrodilucione metode. Prema EUCAST preporukama, granica osetljivosti na levofloksacin iznosi 2 µg/ml. Minimalne inhibitorne koncentracije daidzeina su za sve bakterije bile iznad maksimalne ispitane koncentracije (1000 µg/ml).

Tabela 33. Vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija za levofloksacin određenih mikrodilucionom metodom

Bakterija	MIK (µg/ml)	S, R, I status
<i>E. coli</i> 1	2	R
<i>E. coli</i> 2	0,0625	S
<i>E. coli</i> 3	0,25	S
<i>P. aeruginosa</i> 1	0,25	S
<i>P. aeruginosa</i> 2	16	R
<i>P. aeruginosa</i> 3	4	R
<i>S. aureus</i>	8	R
MRSA	4	R

4.4.2 Ispitivanje interakcije levofloksacina i daidzeina - metoda šahovske ploče

U nastavku su prikazane sheme ispitivanja interakcije između levofloksacina i daidzeina metodom šahovske table (eng. *checkerboard assay*). Zatamnjenim linijama odvojena su polja gde su levofloksacin i daidzein primenjeni samostalno, zasenčena polja predstavljaju kombinacije pri kojima je zabeležen rast bakterija. Poslednji red na mikrotitarskoj ploči korišćen je za kontrolu rastvarača (etanol 70% v/v), a poslednja kolona za kontrolu rasta i kontrolu sterilnosti, pa na šemi nisu prikazivani. Vrednosti frakcionih inhibitornih koncentracija za svaku kombinaciju koja je dovela do prestanka rasta prikazane su na mestu na shemi koje odgovara odgovarajućoj kombinaciji različitih koncentracija levofloksacina i daidzeina.

U **shemi 2.** prikazane su vrednosti frakcionih inhibitornih koncentracija različitih kombinacija levofloksacina (od 1 µg/ml do 0,002 µg/ml) i daidzeina (512 µg/ml do 16 µg/ml) za bakteriju *E.coli* 3, prema rezultatima antibiograma i određivanju MIK, senzitivne na levofloksacin. Vrednosti FIK bile su u rasponu od 0,266 do 0,628, najizraženiji sinergizam zabeležen je pri kombinaciji levofloksacina u koncentraciji od 0,0625 µg/ml i daidzeina u koncentraciji od 16 do 64 µg/ml. Sinergizam je takođe primećen pri kombinaciji od 0,0312µg/ml levofloksacina i 512 µg/ml daidzeina. Daidzein je doveo do smanjenja vrednosti MIK levofloksacina za 4 do 8 puta.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	DAIDZEIN (µg/ml)	
A						0,381					512		
B				0,628							256		
C				0,564							128		
D					0,314						64		
E					0,282						32		
F					0,266						16		
G	1	0,5	0,25	0,125	0,062 5	0,031 2	0,015 6	0,008	0,004	0,002			
LEVOFLOKSACIN (µg/ml)													

Shema 2. Shematski prikaz frakcionih inhibitornih koncentracija za bakteriju *E. coli* 3, senzitivnu na levofloksacin

U **shemi 3.** prikazane su vrednosti frakcionih inhibitornih koncentracija različitih kombinacija levofloksacina (od 16 µg/ml do 0,00312 µg/ml) i daidzeina (512 µg/ml do 16 µg/ml) za bakteriju *E. coli* 1, prema rezultatima antibiograma i određivanju MIK, senzitivne na levofloksacin. Vrednosti FIK bile su u rasponu od 0,532 do 1,256. Sinergizam nije zabeležen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	DAIDZEIN (µg/ml)	
A					1,012								512
B				1,256									256
C					0,628								128
D					0,564								64
E					0,532								32
F													16
G	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062 5	0,031 2			
LEVOFLOKSACIN (µg/ml)													

Shema 3. Shematski prikaz frakcionih inhibitornih koncentracija za bakteriju *E. coli* 1, rezistentnu na levofloksacin

U **shemi 4.** prikazane su vrednosti frakcionih inhibitornih koncentracija različitih kombinacija levofloksacina (od 0,125 µg/ml do 0,002 µg/ml) i daidzeina (od 512 µg/ml do 16 µg/ml) za bakteriju *E. coli* 2, prema rezultatima antibiograma i određivanju MIK, senzitivne na levofloksacin. Vrednosti FIK bile su u rasponu od 0,252 do 0,637, najizraženiji sinergizam zabeležen je pri kombinaciji levofloksacina u koncentraciji od 0,0156 µg/ml levofloksacina i daidzeina u koncentraciji od 16 do 128 µg/ml. Daidzein je doveo do smanjenja vrednosti MIK levofloksacina za 4 do 8 puta.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	DAIDZEIN (µg/ml)	
A					0,637								512
B					0,381								256
C					0,253								128
D				0,314									64
E				0,282									32
F				0,266									16
G	0,125	0,062 5	0,031	0,015 6	0,007 8	0,003 9	0,001 9	0,001	0,000 5	0,000 2			
LEVOFLOKSACIN (µg/ml)													

Shema 4. Shematski prikaz frakcionih inhibitornih koncentracija za bakteriju *E. coli* 2, senzitivnu na levofloksacin

U **shemi 5.** prikazane su vrednosti frakcionih inhibitornih koncentracija različitih kombinacija levofloksacina (od 1 µg/ml do 0,002 µg/ml) i daidzeina (512 µg/ml do 16 µg/ml) za bakteriju *P. aeruginosa 1*, prema rezultatima antibiograma i određivanju MIK, senzitivne na levofloksacin. Vrednosti FIK bile su u rasponu od 0,266 do 1,512, najizraženiji sinergizam zabeležen je pri kombinaciji levofloksacina u koncentraciji od 0,0625 µg/ml i daidzeina u koncentraciji od 16 µg/ml. Sinergizam je takođe primećen pri kombinaciji od 0,0625 µg/ml levofloksacina i 128 µg/ml daidzeina. Daidzein je doveo do smanjenja vrednosti MIK levofloksacina za 4 puta.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	DAIDZEIN (µg/ml)	
A			1,512										512
B			1,256										256
C					0,378								128
D			1,064										64
E			1,032										32
F					0,266								16
G	1	0,5	0,25	0,125	0,062 5	0,031 3	0,015 6	0,007 8	0,003 9	0,001 9			
LEVOFLOKSACIN (µg/ml)													

Shema 5. Shematski prikaz frakcionih inhibitornih koncentracija za bakteriju *P. aeruginosa 1*, senzitivnu na levofloksacin

U **shemi 6.** prikazane su vrednosti frakcionih inhibitornih koncentracija različitih kombinacija levofloksacina (od 64 µg/ml do 0,125 µg/ml) i daidzeina (512 µg/ml do 16 µg/ml) za bakteriju *P. aeruginosa 2*, prema rezultatima antibiograma i određivanju MIK, rezistentne na levofloksacin. Vrednosti FIK bile su u rasponu od 0,282 do 2,256, najizraženiji sinergizam zabeležen je pri kombinaciji levofloksacina u koncentraciji od 8 µg/ml i daidzeina u koncentraciji od 32 do 128 µg/ml. Daidzein je doveo do smanjenja vrednosti MIK levofloksacina za 2 puta.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	DAIDZEIN (µg/ml)	
A		2,512											512
B		2,256											256
C				0,378									128
D				0,314									64
E				0,282									32
F			1,016										16
G	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125			
LEVOFLOKSACIN (µg/ml)													

Shema 6. Shematski prikaz frakcionih inhibitornih koncentracija za bakteriju *P. aeruginosa 2*, rezistentnu na levofloksacin

U **shemi 7.** prikazane su vrednosti frakcionih inhibitornih koncentracija različitih kombinacija levofloksacina (od 16 µg/ml do 0,031 µg/ml) i daidzeina (512 µg/ml do 16 µg/ml) za bakteriju *P. aeruginosa* 3, prema rezultatima antibiograma i određivanju MIK, senzitivne na levofloksacin. Vrednosti FIK bile su u rasponu od 0,532 do 1,512. Sinergizam nije zabeležen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	DAIDZEIN (µg/ml)	
A			1,512										512
B				0,756									256
C			1,128										128
D			1,064										64
E				0,532									32
F			1,016										16
G	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,625	0,031			
LEVOFLOKSACIN (µg/ml)													

Shema 7. Shematski prikaz frakcionih inhibitornih koncentracija za bakteriju *P. aeruginosa* 3, rezistentne na levofloksacin

U **shemi 8.** prikazane su vrednosti frakcionih inhibitornih koncentracija različitih kombinacija levofloksacina (od 31 µg/ml do 0,0625 µg/ml) i daidzeina (512 µg/ml do 16 µg/ml) za bakteriju *S. aureus*, prema rezultatima antibiograma i određivanju MIK, rezistentne na levofloksacin. Vrednosti FIK bile su u rasponu od 0,282 do 1,012, najizraženiji sinergizam zabeležen je pri kombinaciji levofloksacina u koncentraciji od 2 µg/ml i daidzeina u koncentraciji od 32 µg/ml. Daidzein je doveo do smanjenja vrednosti MIK levofloksacina za 4 puta.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	DAIDZEIN (µg/ml)	
A				1,012							512		
B				0,756							256		
C					0,378						128		
D					0,314						64		
E					0,282						32		
F				0,516							16		
G	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625			
LEVOFLOKSACIN (µg/ml)													

Shema 8. Shematski prikaz frakcionih inhibitornih koncentracija za bakteriju *S. aureus*, rezistentnu na levofloksacin

U **shemi 9.** prikazane su vrednosti frakcionih inhibitornih koncentracija različitih kombinacija levofloksacina (od 16 µg/ml do 0,0031 µg/ml) i daidzeina (512 µg/ml do 16 µg/ml) za bakteriju *MRSA*, prema rezultatima antibiograma i određivanju MIK, rezistentne na levofloksacin. Vrednosti FIK bile su u rasponu od 0,282 do 1,012, najizraženiji sinergizam zabeležen je pri kombinaciji levofloksacina u koncentraciji od 1 µg/ml i daidzeina u koncentraciji od 32 µg/ml. Daidzein je doveo do smanjenja vrednosti MIK levofloksacina za 4 puta.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	DAIDZEIN (µg/ml)	
A				1,012									512
B				0,756									256
C				0,628									128
D				0,564									64
E					0,282								32
F				0,516									16
G	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062 5	0,031 3			
LEVOFLOKSACIN (µg/ml)													

Shema 9. Shematski prikaz frakcionih inhibitornih koncentracija za bakteriju *MRSA*, rezistentne na levofloksacin

4.5 *In silico* analiza

4.5.1 *In silico* ispitivanje vezivanja za transportne proteine

U **tabeli 34.** prikazani su rezultati *in silico* ispitivanja vezivanja daidzeina i levofloksacina na transportne proteine. Prema rezultatima, levofloksacin je supstrat za BCRP transporter a inhibitor MRP4 transportnog proteina. Daidzein je supstrat za BSEP i MRP3 transportere a supstrat i inhibitor za BCRP transporter.

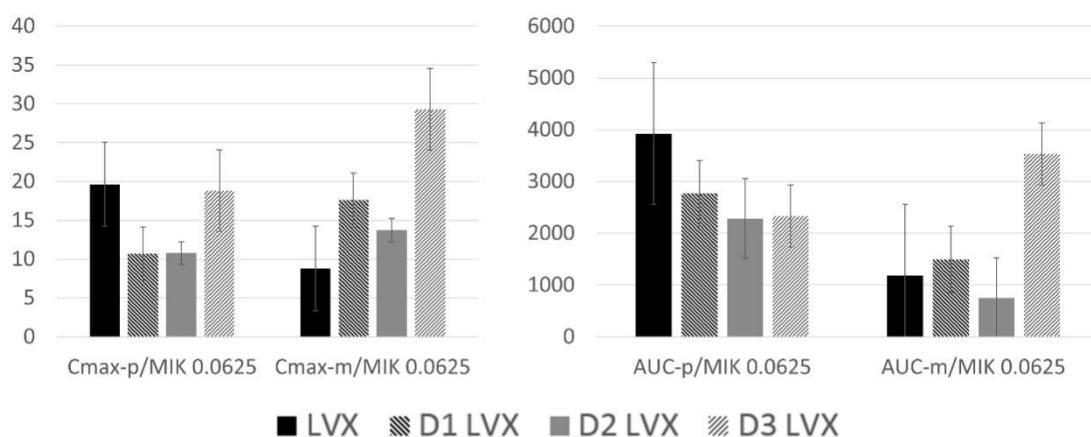
Tabela 34. Rezultati *in silico* ispitivanja vezivanja levofloksacina i daidzeina na transportne proteine

Model	Levofloksacin	Daidzein
BSEP Inhibicija	-	-
BSEP Transport	-	+
P-glikoprotein Inhibicija	-	-
P-glikoprotein Transport	-	-
MRP4 Inhibicija	+	-
MRP2 Transport	-	-
MRP3 Inhibicija	-	-
MRP3 Transport	-	+
BCRP Inhibicija	-	+
BCRP Transport	+	+
OATP1B1 Inhibicija	-	-
OATP1B3 Inhibicija	-	-

Legenda: BSEP - *Bile Salt Export Pump*, MRP - *Multi-Drug Resistance Proteins*, BCRP - *Breast Cancer Resistance Protein*, OATP - *organic-anion-transporting polypeptides*

4.5.2 FK/FD indeksi levofloksacina

Na **grafikonu 19.** je prikazan uticaj daidzeina na promenu vrednosti FK/FD indeksa posredovanih izmenom farmakokinetickih parametara levofloksacina. Prikazana je vrednost indeksa za bakteriju sa vrednošću MIK od 0,625 µg/ml. Iako daidzein dovodi do smanjenja vrednosti C_{max} i AUC u plazmi, posledično smanjujući vrednosti FK/FD indeksa, kada se posmatraju vrednosti C_{max} i AUC u mišiću, koje su za efikasnost relevantnije u odnosu na one određene u plazmi, vidi se povoljan uticaj daidzeina na tkivnu farmakokinetiku levofloksacina. Ipak, ovi efekti daidzeina na FK/FD parametre nisu dozno zavisni. Daidzein u najmanjoj i najvišoj primenjenoj dozi doveo je do povećanja vrednosti C_{max}/MIK i AUC/MIK u mišiću, dok je srednja primenjena doza imala suprotan efekat.



Grafikon 19. Uticaj daidzeina na vrednosti FK/FD indeksa povezanih sa terapijskom efikasnošću levofloksacina (C_{max-p} – maksimalna koncentracija u plazmi; C_{max-m} – maksimalna koncentracija u mišiću; $AUC-p$ – AUC u plazmi; $AUC-m$ – AUC u mišiću)

U **tabeli 35.** prikazane su vrednosti FK/FD indeksa povezanih sa efikasnošću fluorohinolona za levofloksacin samostalno i u kombinaciji sa rastućim dozama daidzeina u odnosu na uticaj daidzeina na farmakokinetičke parametre levofloksacina, kao i kroz uticaj na vrednosti MIK.

Tabela 35. Uticaj daidzeina na vrednosti FK/FD indeksa za levofloksacin izračunatih na osnovu farmakokinetičkih podataka i MIK levofloksacina samostalno i u kombinaciji sa daidzeinom (C_{max-p} – maksimalna koncentracija u plazmi; C_{max-m} – maksimalna koncentracija u mišiću; $AUC-p$ – AUC u plazmi; $AUC-m$ – AUC u mišiću). Prikazane su srednje vrednosti i standardna greška srednje vrednosti (SEM).

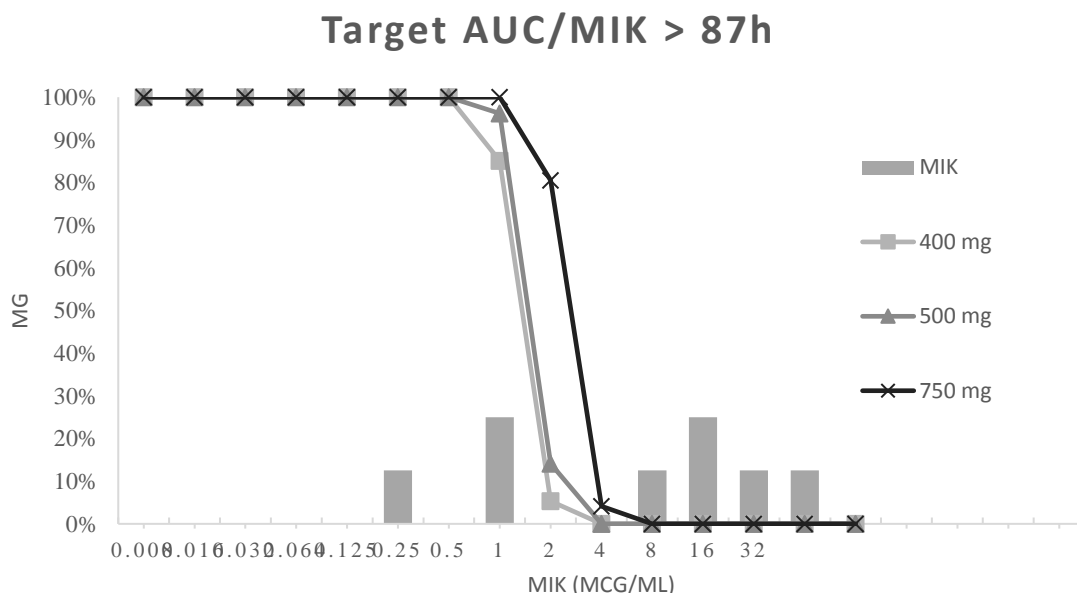
Indek	MIK	LVX	D1LVX	D2LVX	D3LVX
C_{max-p}/MIK	0,0625	34.39±19.63	42.89±9.58	43.13±7.19	75.42±27.46
	0,25	8.60±4.91	10.70±2.39	10.76±1.79	18.82±6.85
	2	1.07±0.61	0.67±0.15	0.67±0.11	1.18±0.43
	4	0.54±0.31	0.17±0.04	0.34±0.06	0.59±0.21
	8	0.27±0.15	0.17±0.04	0.17±0.03	0.29±0.11
	16	0.13±0.08	0.08±0.02	0.08±0.01	0.15±0.05
$AUC-p/MIK$	0,0625	5111.60±3922	11087.67±2903	9169.13±1621	9340.12±2137.
	0, 25	1277.90±980.	2767.48±724.7	2288.61±404.	2331.29±533.4
	2	159.74±122.5	172.97±45.30	143.04±25.29	145.71±33.34
	4	79.87±61.30	86.48±22.65	71.52±12.65	72.85±16.67
	8	39.93±30.65	43.24±11.32	35.76±6.32	36.43±8.33
	16	19.97±15.32	21.62±5.66	17.88±3.16	18.21±4.17
C_{max-m}/MIK	0,0625	24.54±8.79	70.52±9.40	55.03±17.70	117.44±22.18
	0,25	6.13±2.20	17.60±2.35	13.74±4.42	29.31±5.54
	2	0.77±0.27	1.10±0.15	0.86±0.28	1.83±0.35
	4	0.38±0.14	0.28±0.04	0.43±0.14	0.92±0.17
	8	0.19±0.07	0.28±0.04	0.21±0.07	0.46±0.09
	16	0.10±0.03	0.14±0.02	0.11±0.03	0.23±0.04
$AUC-m/MIK$	0,0625	2050.15±1183	5986.19±916.1	3005.99±830.	14159.16±4267
	0, 25	512.54±295.7	1494.15±228.6	750.30±207.2	3534.13±1065.
	2	64.07±36.97	93.38±14.29	46.89±12.95	220.88±66.57
	4	32.03±18.49	46.69±7.15	11.72±3.24	55.22±16.64
	8	16.02±9.24	23.35±3.57	11.72±3.24	55.22±16.64
	16	8.01±4.62	11.67±1.79	5.86±1.62	27.61±8.32

Za vrednost MIK kombinacije levofloksacina i daidzeine uzeta je najniža koncentracija levofloksacina koja u kombinaciji sa daidzeinom dovodi do izostanka rasta. Potom su izračunate srednje vrednosti FK/FD indeksa za osam ispitanih bakterija na osnovu

farmakokinetičkih parametara levofloksacina u mišiću i plazmi. Daidzein dovodi do višestrukog povećanja vrednosti FK/FD indeksa, kroz uticaj na smanjenje MIK levofloksacina, a i kroz kao što je ranije spomenuto, modifikaciju vrednosti C_{max} i AUC. Za bakterije rezistentne na levofloksacin, sa vrednostima MIK do 4 mcg/ml, kroz uticaj na AUC u mišiću, i smanjenje vrednosti MIK, daidzein u najvećoj dozi postiže vrednosti AUC/MIK iznad neophodnih za terapijsku efikasnost levofloksacina.

4.5.3 Predikcija efikasnosti različitih doznih režima levofloksacina kod kritično obolelih pacijenata

Na **grafikonu 20.** prikazana je verovatnoća postizanja ciljanih vrednosti (PTA, eng. *probability of target attainment*) FK/FD indeksa povezanih sa terapijskom efikasnošću levofloksacina ($AUC/MIK > 87h$) kod kritično obolelih pacijenata za simulirana tri različita dozna režima intravenski primenjenog levofloksacina. Na apscisi je prikazana distribucija vrednosti MIK za kliničke izolate bakterija u trenutnom ispitivanju. Iako prema EUCAST smernicama, standardne disk difuzione metode klasifikuju sve bakterija sa $MIK < 2 \mu g/ml$ kao osetljive na levofloksacin, primećuje se da kod kritično obolelih pacijenata, nijedan od simuliranih doznih režima ne postiže ciljane vrednosti AUC/MIK za bakterije na granici osetljivosti. Već za bakterije sa $MIK > 0,5 \mu g/ml$, samo levofloksacin u najvišoj primenjenoj dozi dovodi do ekspozicije kojom se postižu vrednosti $AUC/MIK > 87h$ kod više od 80% simulirane kohorte od 2000 pacijenata.



Grafikon 20. Simulacija farmakokinetike levofloksacina kod kritično obolelih pacijenata i verovatnoća postizanja ciljanih vrednosti FK/FD indeksa povezanih sa terapijskom efikasnošću levofloksacina

5. DISKUSIJA

U sprovedenim eksperimentima, određene su koncentracije levofloksacina samostalno i u kombinaciji sa daidzeinom u plazmi i intersticijalnoj tečnosti poprečno-prugastog mišića pacova. U tu svrhu, uspešno je implementirana metoda mikrodijalize, savremene i pogodne metode za uzorkovanje intersticijalne tečnosti i posledično određivanje koncentracije lekova. Razvijena je visokosenzitivna HPLC metoda za detekciju obe supstance u plazmi i uzorcima dijalizata. Ispitan je uticaj daidzeina na farmakokinetiku levofloksacina u plazmi, mišiću, bubregu, jetri, plućima, mozgu, urinu i fecesu. Takođe je ispitan uticaj daidzeina na osetljivost bakterija na levofloksacin, u cilju ispitivanja mogućnosti njegove primenjivosti kao inhibitora efluks pumpi.

Farmakokinetika levofloksacina u plazmi pokazala je da se nakon peroralne primene levofloksacin brzo apsorbuje, što je u skladu sa literaturnim podacima. Prema biofarmaceutskom sistemu klasifikacije, levofloksacin spada u prvu klasu jedinjenja, koja se odlikuju visokom permeabilnošću i visokom rastvorljivošću u vodi. Na apsorpciju levofloksacina nakon peroralne primene utiču pre svega motilitet želuca, prokrvljenost creva i intestinalni metabolizam [211]. Nakon peroralne primene u pojedinačnoj dozi od 48 mg/kg, vrednosti maksimalnih koncentracija u plazmi i mišiću iznosile su 1,27 µg/ml odnosno 0,66 µg/ml, uz napomenu da su u plazmi merene ukupne koncentracije a u mišiću samo slobodna frakcija. Ako se vrednost maksimalne koncentracije u mišiću koriguje na osnovu literaturnih podataka o vezivanju levofloksacina za proteine plazme od 35%, odnos maksimalnih koncentracija u plazmi i intersticijalnoj tečnosti mišića iznosio je oko 0,8. Slično je i kada se posmatra vrednost AUC, što potvrđuje prodor levofloksacina u tkiva. Ipak, koncentracije u mišiću su oko 20% niže nego u plazmi čak i nakon korekcije za vezivanje za proteine, što pokazuje da su u prodor levofloksacina u tkivo uključeni i efluks transporteri, jer bi u slučaju

prolaska isključivo difuzijom, postojao kompletan ekvilibrijum između slobodnih koncentracija u plazmi i tkivu. Vrednost klirensa levofloksacina izračunata na osnovu koncentracija izmerenih u uzorcima mikrodijalize značajno je veća nego ona određena u plazmi, što je povezano sa činjenicom da su u mišiću određivane samo slobodne koncentracije levofloksacina, a u plazmi ukupne. Kako prilikom eliminacije leka dolazi do eliminacije samo slobodne frakcije, očekivano je da su parametri eliminacije različiti kada se posmatraju ukupna i slobodna frakcija levofloksacina. Konzistentno, vreme zadržavanja u mišiću (MRT) je kraće nego u plazmi.

Prvi podaci o distribuciji levofloksacina u mišić dolaze iz istraživanja na pacijentima sa sepsom [127], gde su upoređene ukupne koncentracije u plazmi, korigovane na nivo slobodnih sa pretpostavkom vezivanja za proteine od 35%, sa slobodnim koncentracijama u intersticijalnom tkivu mišića. Odnos $AUC_{\text{mišić}0-8}/AUC_{\text{plazma}0-8}$ iznosio je 0,85, što je u skladu sa rezultatima našeg ispitivanja. U prostati pacova, nakon intravenske primene, odnos $AUC_{\text{tkivo}}/AUC_{\text{plazma}}$ iznosi 78% [91], dok u tkivu pankreasa dolazi do kompletnog ekvilibrijuma sa faktorom distribucije u tkiva od 97% [107]. Vrednosti dobijene za prosečno vreme koje lek provede u plazmi i mišiću su iznosile između 4,5 i 5 časova, što je uporedivo sa rezultatima iz literature. Nakon intravenske primene levofloksacina u dozi od 7 mg/kg, vreme zadržavanja u plazmi iznosilo je 6,1 [91], odnosno $5,9h \pm 0,8 h$ [212]. Analizom koncentracija levofloksacina u homogenatima tkiva i uzorcima fecesa i urina, pokazano je da se u toku 7 časova, oko 20% unete doze izlučilo urinom nepromenjeno, a deo unesenog levofloksacina se nije resorbovao nakon peroralne primene, postižući visoke koncentracije u fecesu. Koncentracije u mozgu bile su niže nego u drugim tkivima, pokazujući ograničen prodor levofloksacina kroz krvno-moždanu barijeru zdravih pacova. Za fluorohinolone fleroksacin, norfloksacin i ofloksacin pokazano je da su koncentracije u mozgu značajno niže nego u plazmi, što ukazuje na postojanje efluks mehanizama. Levofloksacin je prema *in vitro* podacima iz literature, supstrat

za P-GP, jedan od transportera važnih za prodor ksenobiotika kroz krvnomoždanu barijeru [213]. Nakon intravenske primene levofloksacina u dozama ekvivalentnim humanim dozama od 500, 750 i 100 mg, koncentracije levofloksacina u mozgu odgovarale su oko polovini koncentracije koja se postiže u plazmi [214], na modelu streptokoknog meningitisa kod zečeva. Inflamacija dovodi do povećane propustljivosti krvnomoždane barijere, tako da je kod zdravih životinja očekivano da koncentracije izmerene u mozgu budu niže. P-GP je dobro poznati ABC-transporter koji transportuje široki opseg supstrata kroz ekstra- i intracelularne membrane. Prodiranje fluorohinolona u tkiva posredovano je aktivnim transportom, a brojne studije su dokazale da je ograničenost prodora fluorohinolona u različita tkiva posledica ekspresije različitih efluks transportera, uključujući P-GP. Sposobnost P-GP da ograniči tkivne i intracelularne koncentracije lekova najbolje je opisana kod malignih bolesti, gde njegova pojačana ekspresija na površini tumorskih ćelija dovodi do izbacivanja antitumorskih lekova [113]. Dostupni podaci u literaturi o konkomitantnoj primeni inhibitora P-GP i fluorohinolona daju uvid u ulogu P-GP u transportu fluorohinolona. Administracija ciklosporina zajedno sa grepafloksacinom i levofloksacinom, dovodi do sprečavanja sekrecije ovih lekova u gastrointestinalni trakt putem P-GP [20]. Takođe, kako bakterije poseduju širok spektar različitih efluks transportera, od kojih pojedini pokazuju strukturne sličnosti sa ABC transporterima na eukariotskim ćelijama, Lajtner i saradnici su ispitivali aktivnost tarikvidara, visokoselektivnog P-GP inhibitora, u kombinaciji sa ciprofloksacinom kod sojeva *S. aureus*. Dodavanje tarikvidara dovelo je do desetostrukog smanjenja vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija ciprofloksacina [215]. Važno je napomenuti da uticaj P-GP na prodor levofloksacina *in vivo* nije u potpuno razjašnjen, uprkos brojnim *in vitro* studijama koje ukazuju na uključenost P-GP u distribuciju levofloksacina.

Nakon primene daidzeina u vidu suspenzije *per os* putem, izmerene su koncentracije u plazmi i mišiću, kao i homogenatima tkiva, a rezultati jasno ukazuju da nakon peroralne primene

farmakokinetika daidzeina nije linearna. Nakon primene daidzeina u 3 rastuće doze, ne dolazi do proporcionalnog povećanja vrednosti AUC, što je u skladu sa podacima iz literature [216].

Nakon primene daidzeina u vidu suspenzije intravenski (20 mg/kg) i intraperitonealno (50 mg/kg) kod pacova, pokazano je da povećanje intravenske doze za 34 puta, dolazi do povećanja AUC za svega 5 puta. Umesto očekivanog dvostrukog porasta vrednosti AUC sa dvostrukim porastom doze, primećuje se nelinearna veza. Podaci iz kliničke primene daidzeina, kod zdravih premenopauzalnih žena, ukazuju da je bioraspoloživost daidzeina niska, a farmakokinetika nelinearna, nakon primene u pojedinačnoj [198], a i u ponovljenim dozama [217]. Maksimalne koncentracije koje daidzein postiže u plazmi (0,2 µg/ml do 0,4 µg/ml), nakon primene u dozama od 1,9 do 5,7 µg/ml, uporedive su sa rezultatima prethodnih ispitivanja. Nakon primene daidzeina kod pacova peroralno u dozi od 10 mg/kg, vrednost C_{max} iznosila je 1,35 µg/ml [218]. Zabeležene su velike interindividualne razlike u koncentraciji daidzeina u homogenatima tkiva, uzorcima urina i fecesa. Koncentracije u fecesu su takođe bile visoke, ukazujući da se najverovatnije daidzein nepotpuno resorbovao iz gastrointestinalnog trakta ili se izlučio nepromenjen putem žuči. Poznato je da je zasićenje transportera ograničavajući faktor za bioraspoloživost daidzeina [198], a takođe, glavni put eliminacije daidzeina je upravo ekskrecija neizmenjenog leka putem fecesa [219]. Koncentracije u urinu ukazuju da i kinetika renalne eliminacije nije linearna. Važno je napomenuti, da se manji deo daidzeina izlučuje urinom neizmenjen, a veći u vidu glukuronid i sulfat konjugata, [219], čije koncentracije nisu određivane. Takođe, činjenica da su koncentracije daidzeina u urinu nakon primene u najvišoj ispitivanoj dozi (5,7 mg/kg) bile niže nego nakon primene u nižim dozama može se objasniti značajno dužim poluvremenom eliminacije određenim za tu grupu životinja, samim tim i manjim količinama izlučene supstance. U plućima nisu uočene merljive koncentracije daidzeina, što je i ranije pokazano. Prema podacima iz literature, daidzein nakon primene u suspenziji najviše izmerene

koncentracije postiže u masnom tkivu i u bubregu [216], a koncentracije u plućima nisu merljive. Mikrodijaliza, prema dostupnim podacima, nije do sad primenjena za uzorkovanje i posledično određivanje slobodnih koncentracija daidzeina u mišiću, ali je primenjena za određivanje prodora daidzeina u centralni nervni sistem pacova, potvrđujući mogućnost primene ove metode za ispitivanja tkivne farmakokinetike jedinjenja prirodnog porekla. Nakon intravenske primene tradicionalnog leka od korena biljke *Pueraria lobata*, bogatog izoflavonima, određena je farmakokinetika u cerebrospinalnoj tečnosti i plazmi pacova, nakon implantacije mikrodijaliznih katetra u jugularnu venu i laterarnu moždanu komoru [220]. Prosečne koncentracije daidzeina u plazmi su iznosile 1,54 µg/mL, a C_{max} u mozgu iznosio je od 74,34 ng/mL i postiže se nakon 0.5-0.8 h, ukazujući na brz prodor daidzeina u centralni nervni sistem.

U cilju ispitivanja uticaja daidzeina na farmakokinetiku levofloksacina u plazmi i tkivima, primenjen je daidzein u rastućim dozama konkomitantno sa levofloksacinom, paralelno su određivane koncentracije levofloksacina u plazmi i uzorcima mikrodijalizata a na kraju odgleda u homogenatima tkiva, urinu i fecesu.

Uticaj daidzeina na prodor levofloksacina kroz membrane uočen je i u *in vitro* PAMPA testu, čiji rezultati pružaju jedno od mogućih objašnjenja primećene farmakokinetičke interakcije. PAMPA je metoda koja služi kao model pasivne difuzije, u gastrointestinalnom traktu, preko krvno-moždane barijere ili kroz samu ćelijsku membranu. Drugi faktori poput paracelularnog transporta, aktivnog transporta i efluksa ne mogu biti određeni primenom PAMPA metode. Rezultati PAMPA ispitivanja klasifikuju supstance kao nisko i visoko permeabilne, gde P_{app} indeks < 1,5 x 10⁻⁶cm/s označava nisko, a P_{app} > 1,5 x 10⁻⁶cm/s visoko permeabilne supstance. Prema ovoj granici, levofloksacin spada u visoko permeabilne supstance, a daidzein dodatno povećava prodor levofloksacina kroz membranu. Ipak, važno je napomenuti da kao što je već spomenuto, PAMPA model daje uvid u prolazak kroz membrane pasivnom difuzijom

i ne uključuje ulogu transportera, koji su u *in vivo* sistemima jedan od ključnih faktora za prolazak levofloksacina kroz membrane [221]. Važno je napomenuti da je PAMPA metodom isključena interakcija između daidzeina i levofloksacina koja bi potencijalno dovela do smanjene apsorpcije levofloksacina iz gastrointestinalnog trakta. Daidzein je ubrzao prolaz levofloksacina kroz membrane, ali ta razlika nije bila statistički značajna.

Na osnovu određivanja koncentracija levofloksacina u plazmi nakon primene samostalno i u kombinaciji sa daidzeinom, izračunate vrednosti konstante eliminacije kod grupe koja je primila levofloksacin u kombinaciji sa daidzeinom u najnižoj dozi (D1LVX) bile su statistički značajno veće u odnosu na grupe koje su primile samo levofloksacin (LVX, $p=0,007$) i levofloksacin i daidzein u srednjoj dozi (D2LVX $p=0,05$). Vrednosti poluvremena eliminacije kod grupe koja je primila daidzein u najnižoj dozi (D1LVX) bile su statistički značajno niže u odnosu na grupu koja je primila samo levofloksacin (LVX, $p=0,0027$). Vrednosti t_{max} kod grupe koja je primila samo levofloksacin bile su statistički značajno niže u odnosu na grupu koja je primila levofloksacin u kombinaciji sa daidzeinom u najnižoj ($p=0,036$) i srednjoj dozi ($p=0,011$). Daidzein je produžio vreme do postizanja maksimalnih koncentracija i ubrzao eliminaciju levofloksacina iz plazme, što je primećeno po većoj vrednosti t_{max} , konstante eliminacije i manjeg vremena polueliminacije kod životinja tretiranih kombinacijom levofloksacina i daidzeina. Važno je napomenuti da ovaj efekat nije bio dozno zavistan. Prosečne koncentracije u plazmi bile su niže kod grupa životinja tretiranih kombinacijom daidzeina i levofloksacina u odnosu na levofloksacin samostalno.

Na osnovu određivanja slobodnih koncentracija levofloksacina u intersticijalnoj tečnosti poprečno-prugastog mišića samostalno i nakon primene sa rastućim dozama daidzeina, pokazano je da daidzein utiče na tkivnu farmakokinetiku levofloksacina. Vrednosti konstante eliminacije kod grupe koja je primila samo levofloksacin u kombinaciji sa daidzeinom u

srednjoj dozi (D2LVX) bile su statistički značajno više u odnosu na grupe koje su primile samo levofloksacin (LVX, $p=0,008$) i kombinaciju levofloksacina i daidzeina u najvišoj (D3LVX, $p=0,002$) dozi. Vrednosti poluvremena eliminacije kod grupe koja je primila samo levofloksacin (LVX) bile su statistički značajno niže u odnosu na grupu koja je primila levofloksacin u kombinaciji sa daidzeinom u srednjoj dozi (D2LVX, $p<0,001$) i statistički značajno više u odnosu na grupu koja je primila kombinaciju levofloksacina i daidzeina u najnižoj dozi (D1LVX, $p=0,006$). Vrednosti vremena do postizanja maksimalnih koncentracija u plazmi takođe su se razlikovale među ispitanim grupama. Vrednosti t_{max} kod grupe koja je primila samo levofloksacin bile su statistički značajno niže u odnosu na grupu koja je primila levofloksacin u kombinaciji sa daidzeinom u najnižoj ($p=0,036$) i srednjoj dozi ($p=0,011$). Primećene su i statistički značajne razlike u maksimalnim koncentracijama postignutim u intersticijalnoj tečnosti mišića. Grupa koja je primila levofloksacin u kombinaciji sa daidzeinom u najvišoj dozi (D3LVX) imala je statistički značajno više vrednosti C_{max} u odnosu na grupu životinja koja je primila sam levofloksacin (LVX, $p=0,021$). Isto je primećeno i za vrednosti površine ispod krive koncentracija-vreme (AUC_{0-7}), gde su vrednosti AUC_{0-7} bile statistički značajno više u grupi D3LVX u odnosu na grupu koja je primila čist levofloksacin ($p=0,032$). Vrednosti klirensa su bile statistički značajno više u grupi koja je primila levofloksacin u kombinaciji sa daidzeinom u srednjoj dozi (D2LVX) u odnosu na grupu koja je primila levofloksacin u kombinaciji sa daidzeinom u najvišoj dozi (D3LVX, $p=0,012$). Dakle, u mišiću, za kombinaciju daidzeina u najnižoj i srednjoj dozi, uticaj na eliminaciju bio je identičan plazma profilu, a kod grupe koja je primila daidzein u najvišoj dozi zajedno sa levofloksacinom, primećena je usporena eliminacija. Vreme do postizanja maksimalnih koncentracija bilo je produženo primenom levofloksacina u kombinaciji sa daidzeinom, a daidzein primenjen u najvišoj dozi doveo je do značajnog povećanja vrednosti C_{max} i površine ispod krive koncentracija-vreme. U najvišoj primenjenoj dozi, daidzein je doveo po povećanog

prodora levofloksacina u mišićno tkivo pacova. Prosečne slobodne koncentracije izmerene u mišiću su takođe bile više kod grupe koja je primila kombinaciju daidzeina u najvišoj dozi i levofloksacina nego kod grupe koja je primila samo levofloksacin, što dodatno potvrđuje uticaj daidzeina na prodor u tkivo mišića. Ipak, ukupne koncentracije u mišiću se nisu statistički značajno razlikovale, što ponovo potvrđuje značaj primene mikrodijalize, koja nam dozvoljava uvid u farmakološki aktivne, slobodne nivoe leka, dok analiza koncentracija leka tkivnih homogenata pruža informacije o nivoima leka u svim kompartmanima tkiva koje je podvrgnuto analizi. Kako su koncentracije levofloksacina u plazmi bile niže nakon konkomitante primene sa daidzeinom, a slobodne koncentracije u mišiću više, ova pojava se može objasniti povećanom difuzijom levofloksacina iz vaskularnog korita u intersticijalno tkivo, što odgovara rezultatima *in vitro* PAMPA ispitivanja. Jedino slobodna frakcija leka je podložna prolasku kroz membrane pasivnom difuzijom, tako da uticaj daidzeina koji je pokazan na PAMPA modelu potencijalno može da objasni veće slobodne koncentracije u mišiću, uprkos činjenici da nije bilo razlika u ukupnim koncentracijama leka u homogenatima tkiva.

Koncentracije levofloksacina u fecesu su bile značajno više kod životinja koje su primile kombinaciju daidzeina i levofloksacina. Koncentracije u urinu su bile statistički značajno niže kod životinja tretiranih kombinacijom daidzeina i levofloksacina, što pokazuje da je daidzein produžio zadržavanje levofloksacina u organizmu pacova. Kako je u PAMPA ispitivanju pokazano da daidzein ubrzava pasivnu difuziju levofloksacina kroz membrane, primećena interakcija najverovatnije je posredovana uticajem daidzeina na transportere. Transporteri koji utiču na apsorpciju levofloksacina iz intestinalnog lumena i ekskreciju putem bubrega uključuju transportere iz porodice OATP. OATP transporteri koji su najbolje istraženi pripadaju porodici 1, koji kod ljudi sadrže transportere OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3 i OATP1C1. Humani OATP transporteri kod glodara imaju više analoga – transporteru OATP1A2 odgovaraju Oatp1a1, Oatp1a3 (samo kod pacova), Oatp1a4, Oatp1a5 i Oatp1a6.

Humani transporteri OATP1B1 i OATP1B3 odgovaraju transporteru Oatp1b2 kod glodara [222]. OATP1A2 igra ključnu ulogu u apsorpciji, distribuciji i ekskreciji ksenobiotika. Prema literaturnim podacima, levofloksacin je supstrat za OATP1A2 transporter [223, 224]. OATP1A2 je lokalizovan na membrani enterocita u duodenumu gde posreduje apsorpciju ksenobiotika [225]. U jetri, OATP1A2 je lokalizovan u holangiocitima, gde dovodi do reapsorpcije lekova iz žuči. U bubrezima, ovaj transporter je eksprimovan na apikalnoj membrani distalnog nefrona, gde dovodi do sekrecije ksenobiotika u urin [226]. Sastavni je deo i luminalne membrane endotelnih ćelija kapilara mozga. Farmakokinetička interakcija između daidzeina i levofloksacina ide u prilog inhibitornom uticaju daidzeina na OATP transportere. Prema literaturnim podacima, flavonoidi iz hrane i biljnih lekova mogu da utiču na aktivnost enzima odgovornih za metabolizam lekova i transportera, stupajući u farmakokinetičke interakcije sa konvencionalnim lekovima [181, 227]. Izoflavoni mogu inhibisati transportere iz ABC, OAT, OTC i OATP porodice. Više izoflavona i metabolita izolovanih iz soje pokazuje snažno inhibitorno dejstvo na OATP2B1 transporter [228], a slične efekte pokazuje i ekstrakt soje [229]. Rezultati *in silico* ispitivanja potencijala levofloksacina i daidzeina da se ponašaju kao supstrati i inhibitori za različite transportere, pokazali su da je levofloksacin supstrat, a daidzein inhibitor za BCRP protein. BCRP je protein koji učestvuje u intestinalnoj apsorpciji fluorohinolona. Takođe je uključen u aktivan transport ciprofloksacina iz krvi u bilijarni trakt [230] i mleko, što je potvrđeno eksperimentima na Bcrp1_/_ miševima, gde su primećene značajno niže koncentracije u žuči i mleku u odnosu na kontrolnu grupu životinja sa fiziološkom ekspresijom ovog transportera [117, 231]. Inhibicija BCRP proteina je još jedan od mogućih mehanizama odgovornih za povećanje koncentracija levofloksacina u fecesu životinja tretiranih daidzeinom. Podaci iz literature pokazuju da su izoflavoni iz soje, genistein i daidzein supstrati za BCRP [232]. Ispitivanja na ćelijskim kulturama pokazala su

da i genistein i daidzein inhibišu aktivnost BCRP, smanjujući sekreciju danofloksacina na MDKC ćelijskoj liniji [233].

Primena lekova i supstanci prirodnog porekla u kombinaciji može dovesti do lekovima izazvanog oštećenja jetre i bubrega, koje ima veliki klinički značaj, usled ozbiljnih posledica po zdravlje i poteškoća pri otkrivanju i dijagnostikovanju. Stoga, pored ispitivanja farmakokinetike levofloksacina i daidzeina, takođe je ispitan i uticaj primene ovih supstanci na funkciju jetre i bubrega. Od biohemijskih pokazatelja funkcije jetre u serumu određivane su enzimske aktivnosti aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT) i gama-glutamil transferaze (GGT), kao i koncentracije ukupnog i konjugovanog bilirubina. Aminotransferaze su nespecifični pokazatelji oštećenja jetre. AST-a ima najviše u jetri, srčanom mišiću, a manje u mozgu, bubrezima, pankreasu, plućima i drugim organima. Enzim je u ćelijama prisutan u dva izoenzimska oblika, lokalizovana u citoplazmi (AST1) i mitohondrijama (AST2) [234]. Aktivnosti enzima u tkivima su višestruko veće nego u serumu, stoga u procesima gde dolazi do lezija na tkivima bogatih AST-om dolazi do izlaska enzima iz tkiva u serum i posledičnog povećanja serumskih vrednosti. ALT je enzim čije povišene vrednosti ukazuju na akutno oštećenje jetre. ALT, kao i AST, igra ulogu u metabolizmu, a najzastupljeniji je u jetri, skeletnim mišićima, bubrezima, pankreasu i dr. Osetljiviji je marker za akutno oštećenje jetre u odnosu na AST, jer je to citoplazmatski enzim za koji i pri manjim oštećenjima ćelija jetre praćenim povećanom propustljivošću ćelijske membrane primetan porast aktivnosti ovog enzima u serumu. Zajednička primena daidzeina i levofloksacina nije imala negativan uticaj na biohemijske parametre toksičnosti. Grupe životinja koje su primile daidzein u tri rastuće doze zajedno sa levofloksacinom, nisu imale statistički značajno više vrednosti biohemijskih parametara funkcije jetre i bubrega. Od parametara funkcije bubrega određene su koncentracije ureje i kreatinina u serumu pacova. Kreatinin je mali molekul koji nastaje kao posledica razgradnje kreatinin fosfata u mišićima koji može da posluži kao

funkcionalni marker akutnog oštećenja bubrega, ali brojni faktori utiču na njegove vrednosti pored same bubrežne funkcije. Urea je organsko jedinjenje koje igra vitalnu ulogu u metabolizmu jedinjenja koja sadrže azot, čije povišene vrednosti u serumu mogu ukazati na oštećenje bubrežne funkcije. Ipak, nijedan od ovih markera nije dovoljno precizan da bi se usled neizmenjenih vrednosti sa visokom sigurnošću mogla isključiti mogućnost oštećenja bubrega posredovanog lekovima, stoga su urađena i histološka ispitivanja uzoraka tkiva bubrega. Histološki pregled uzoraka tkiva može ukazati na histološke, odnosno mikromorfološke promene na hepatocitima, koje se posledično odražavaju na remećenje brojnih funkcija jetre, uključujući i ulogu u metaboličkim i detoksikacionim procesima. Oštećenje jetre posredovano primenom lekova najčešće se ispoljava u vidu degenerativnih i reaktivnih zapaljenjskih promena, koje uključuju portalnu inflamaciju, periportalnu nekrozu, fibrozu, promene na žučnim kanalićima, infiltrat i dilataciju sinusoida, apoptotična telašca, intravaskularna trombozu, stazu, kao i izmene na jedrima poput anizocitoze, anizonukleoze, vakuolizacije nukleusa i drugo [235, 236]. Na bubrezima, neke od promena koje su indikativne za oštećenje posredovano lekovima su kongestija, inflamacija, tubularna apoptoza, dilatacija tubula, fibroza i oštećenje glomerula [237]. Nijedna od navedenih promena nije zabeležena u trenutnom istraživanju. Histološkim pregledom nije primećena izmena tkivne arhitektonike jetre i bubrega kod životinja tretiranih daidzeinom u rastućim dozama i levofloksacinom samostalno, niti u kombinaciji. Ovi rezultati su očekivani, jer je bezbednost kratkotrajne primene daidzeina i ranije potvrđena, sa NOAEL (eng. *No Observed Adverse Effect Level*) preko 5000 mg/kg, izostajanjem negativnog uticaja na hematološke, biohemijske i histopatološke parametre toksičnosti, i *in silico* predikcijama rizika od akutne toksičnosti koje klasifikuju daidzein kao jedinjenje sa niskim ili potpunim izostankom rizika akutne toksičnosti [238, 239].

Daidzein je uticao na osetljivost bakterija na levofloksacin, dovodeći do smanjenja vrednosti MIK i sinergističkog dejstva prema rezultatima eksperimenata sprovedenim metodom modifikovane šahovske ploče. Metoda šahovske ploče je jedna od *in vitro* metoda ispitivanja sinergizma kombinacija antibiotika ili antibiotika i drugih supstanci sa potencijalnim antimikrobnim dejstvom. Cilj ispitivanja sinergizma je da se odredi da li je efekat dve supstance u kombinaciji veći od prostog kumulativnog pojedinačnog efekta ispitivanih supstanci. Kombinacija može da se ponaša aditivno, gde je efekat jednak prostoj sumi pojedinačnih efekata supstanci, ili sinergistički, gde je efekat kombinacije veći od prostog zbira pojedinačnih efekata. Metoda šahovske ploče takođe može identifikovati i kombinacije koje se ponašaju antagonistički [240]. Daidzein je doveo do smanjenja vrednosti MIK levofloksacina za 4 do 8 puta kod sojeva *E. coli*. Takođe je uticao na MIK za MRSA, dovodeći do četverostrukog smanjenja vrednosti. Kod osetljivog soja *P. aeruginosa*, levofloksacin je doveo do dvostrukog smanjenja vrednosti MIK.

Efekat primećen na smanjenje vrednosti MIK levofloksacina u dodatku daidzeina u skladu je sa podacima iz literature. Daidzein (16 mg/l) je ispoljio sinergističko dejstvo sa karbenicilinom i levofloksacinom, na soju *P. aeruginosa* sa FIK indeksom od 0,27 i bakterijom *E. coli* sa FIK indeksom od 0,13 [179]. Nakon identifikacije sinergizma, primenom testa sa etidijum bromidom pokazano je da je modifikacija osetljivosti bakterija na levofloksacin posledica inhibicije EP. Daidzein je povećao intracelularnu akumulaciju EP supstrata, etidijum bromida, u bakterijskim ćelijama. U ispitivanju interakcije izoflavona soje, sa simbiotskom bakterijom *Bradyrhizobium japonicum* koja naseljava korenje ratličitih biljaka, pokazano je da daidzein utiče na ekspresiju gena za MDR efluks pumpe [242]. Daidzein (60 µg/ml) doveo je četverostrukog smanjenja vrednosti MIK za *S. aureus* sa pojačanom ekspresijom NorA efluks pumpe [243]. Nasuprot tome, u ispitivanju uticaja epigalokatehin galata, berberina, daidzeina, kurkumina i geraniola na antibiotski efekat 4-metoksibenzaldehida na *P. aeruginosa*, pokazano

je da daidzein ne utiče na vrednosti MIK za 4-metoksibenzaldehida [244]. Poznato je da su rezultati ispitivanja antibakterijskih efekata fenola često neusaglašeni, najverovatnije usled razlika u metodologiji rada kao i usled genetskih razlika u ispitivanim sojevima. Metoda šahovske ploče ima svoje nedostatke u poređenju sa vremenskim serijama ubijanja bakterija (eng. time-kill assays, TKA), koje dozvoljavaju kvantitativno poređenja broja kolonija u funkciji vremena [241]. Metoda šahovske ploče izlaže bakterije različitim, ali fiksnim koncentracijama antibiotika, što ne odgovara fiziološkim uslovima gde koncentracije antibiotika fluktuiraju. S obzirom na rezultate dobijene određivanjem frakcionih inhibitornih koncentracija, sledeći korak bi bilo ispitivanje primenom TKA, posebno za sojeve gde je primećen najizraženiji sinergizam.

Daidzein u najvišoj dozi doveo je do povećanja AUC i C_{max} u mišiću, i posledično do povećanja vrednosti FK/FD parametara povezanih sa efikasnošću levofloksacina. Kada se u računicu uključi i efekat na smanjenje vrednosti MIK, primećena pojava je još izraženija. Kroz uticaj na smanjenje vrednosti MIK za levofloksacin, daidzein dovodi do povećanja vrednosti FK/FD indeksa povezanih sa terapijskom efikasnošću fluorohinolona. Kao što je već spomenuto, visoke koncentracije na mestu infekcije su od kritičnog značaja za fluorohinolone [32]. Vrednost $C_{max} / MIK > 10$ [32] i $tAUC / MIK$ od 125h koju su utvrdili Forest i saradnici [42] opšte su prihvaćene kao one koje koreliraju sa terapijskom efikasnošću. U kombinaciji sa daidzeinom, vrednosti FK/FD indeksa su veće nego samostalno određene za levofloksacin, a u najvišoj primenjenoj dozi, daidzein povećava vrednosti AUC/MIK u mišiću iznad granice efikasnosti i za sojeve gde su određene vrednosti FK/FD indeksa nakon primene levofloksacina samostalno bile neadekvatne. Rezultat je posledica uticaja daidzeina na farmakokinetiku levofloksacina, kroz povećanje slobodnih koncentracija levofloksacina u intersticijumu tkiva, ali i uticaja na smanjenje vrednosti MIK za levofloksacin u dodatku daidzeina. Povećanje slobodne, farmakološki aktivne frakcije levofloksacina u tkivima nakon primene u

kombinaciji sa daidzeinom, zajedno sa primećenim uticajem daidzeina na MIK, pokazuje da je daidzein supstanca koja zaslužuje dalja ispitivanja u pravcu razvoja dopunskih terapijskih opcija za infekcije izazvane rezistentnim bakterijama. Važno je napomenuti da je ograničavajući faktor za mogućnost kliničke primene daidzeina kao efluks inhibitora visoka interindividualna varijabilnost u farmakokinetici. Iako je daidzein postigao merljive koncentracije u mišiću, zabeležene su razlike među životinjama, a farmakokinetika nije linearna, odnosno koncentracije u mišiću se nisu proporcionalno povećavale nakon peroralne primene. Stoga, da bi se omogućilo da se efekti daidzeina kao efluks inhibitora mogu iskoristiti za kliničku primenu, potrebno je razviti nove formulacije koje dozvoljavaju postizanje visokih koncentracija daidzeina na mestu infekcije uz zaobilazanje crevne mikroflore i posledičnog metabolisanja. Jedna od mogućnosti bi bila parenteralna primena, ali problem je što intravenski način primene lekova nije pogodan za vanbolničke uslove, ima višu cenu i po pravilu je rezervisan za teške infekcije koje zahtevaju hospitalizaciju. Transdermalni putevi primene lekova mogu predstavljati alternativu *per os* primeni, uz postizanje visokih sistemskih koncentracija sa istovremenim zaobilazanjem gastrointestinalnog trakta [245]. Lekovi za transdermalnu primenu se lako nanose, pogodni su za primenu i kod osoba koje imaju poteškoće sa unošenjem klasičnih čvrstih *per os* formulacija, a za razliku od parenteralne primene lekova, ne zahtevaju obučeno zdravstveno osoblje, i konformniji su za pacijente. Takođe, kako se transdermalnim oblikom leka postižu stabilne koncentracije leka u sistemske cirkulaciji, bez potrebe za učestalim doziranjem kao kod *per os* primene, stepen komplijanse bi trebalo da bude viši nego kod standardnih formulacija [246]. Takođe, kako su metaboliti daidzeina strukturno slični, takođe mogu posedovati potencijal za modifikaciju aktivnosti efluks pumpi, što zahteva dodatna ispitivanja.

Monte Karlo simulacija primenjena je da se odredi procenat simulirane kohorte pacijenata koja postiže ciljanu vrednost određenog FK/FD indeksa pri različitim doznim režimima

levofloksacina (PTA, eng. *probability of target attainment*). Rezultati Monte Karlo simulacije, gde je simulirana kohorta kritično obolelih pacijenata, pokazali su da čak i u maksimalnoj primenjenoj dozi, levofloksacin ne postiže ciljane vrednosti AUC/MIK za sve bakterije koje bi prema antibiogramu bile klasifikovane kao osetljive na levofloksacin (MIK < 2 µg/ml). Ovaj rezultat je najverovatnije posledica povećanog klirensa leka kod kritično obolelih pacijenata, usled povećane potrebe za primenom rastvora za nadoknadu tečnosti i hiperdinamskog stanja organizma. Iako prema EUCAST smernicama, standardne disk difuzione metode klasifikuju sve bakterije sa MIK < 2 µg/ml kao osetljive na levofloksacin, primećuje se da kod kritično obolelih pacijenata, nijedan od simuliranih doznih režima ne postiže ciljane vrednosti AUC/MIK za bakterije na granici osetljivosti. Već za bakterije sa MIK > 0,5 µg/ml, samo levofloksacin u najvišoj primenjenoj dozi dovodi do ekspozicije kojom se postižu vrednosti AUC/MIK > 87h kod više od 80% simulirane kohorte od 2000 pacijenata. Pojava izostanka efikasnosti pri primeni uobičajenih doza i doznih režima levofloksacina kod kritično obolelih pacijenata i ranije je pokazana. U istraživanju gde je ispitana verovatnoća postizanja ciljane vrednosti AUC₂₄/MIK kod kritično obolelih pacijenata na hemodijalizi, nijedan od standardnih doznih režima levofloksacina ne postiže vrednosti veće od ~90 % PTA za infekcije izazvane *P. aeruginosa* sa vrednostima MIK iznad 1 i 2 µg/ml [247]. Doze potrebne da se postigne terapijski odgovor kod najvećeg broja kritično obolelih pacijenata, visoko su iznad maksimalnih dozovljenih. Istraživanje koje je simulacijom farmakokinetike levofloksacina, ceftarolina i ceftriaksona na kohorti pacijenata obolelih od vanbolničke pneumonije određivalo verovatnoću postizanja ciljanih vrednosti FK/FD indeksa, utvrdilo je da su vrednosti PTA za levofloksacin ispod 90% i za bakterije ispod granice osetljivosti po EUCAST/CLSI standardima [248]. S obzirom na distribuciju MIK u ispitanim sojevima u našem istraživanju, jasno je da je moguće da čak i kod bakterija kod kojih rezultati antibiograma idu u prilog primeni levofloksacina, usled izmena u farmakokinetici i izraženom klirensu leka, može doći

do izostanka terapijskog odgovora kod kritično obolelih pacijenata. Primena metoda simulacije bi mogla identifikovati pacijente kod kojih je usled potencijalno izmenjene farmakokinetike levofloksacina, pored određivanja antibiograma potrebno odrediti i vrednosti MIK, a koji su takođe i kandidati za terapijsko određivanje nivoa leka, u slučaju postojanja tehničkih mogućnosti. Za adekvatan terapijski odgovor kod pacijenata gde postoji visoka varijabilnost u farmakokinetici antibiotika neophodan je personalizovan terapijski pristup, baziran na poznavanju i razumevanju principa farmakokinetike i farmakodinamike antibiotika i načina na koji kompleksna interakcija između izazivača infekcije, domaćina i izabranog leka utiče na ishod lečenja antibioticima.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da je mikrodijaliza metoda koja se uspešno može koristiti za uzorkovanje intersticijalne tečnosti poprečno-prugastog mišića, kako za antibiotike, tako i za jedinjenja prirodnog porekla, konkretno daidzein, što je po prvi put pokazano u ovom istraživanju.

Nakon peroralne primene, uzorkovanja plazme i primene mikrodijalize, pokazano je da se daidzein distribuiše u mišićno tkivo, sa indeksom distribucije u tkiva od 0,35. Koncentracije daidzeina u tkivu mišića nakon peroralne primene nisu dovoljno visoke da bi se garantovano postigla modifikacija osetljivosti bakterija na levofloksacin, stoga su potrebna dalja istraživanja u pravcu razvoja naprednih formulacija kojima bi se obezbedile visoke koncentracije daidzeina na mestu infekcije.

Daidzein je uticao na farmakokinetiku levofloksacina u plazmi, intersticijalnom tkivu mišića kao i u homogenatima tkiva. Daidzein je doveo do povećanja slobodnih koncentracija levofloksacina u mišiću, mozgu, smanjio izlučivanje levofloksacina u urin i doveo do povećanja koncentracija levofloksacina u fecesu. Primećena interakcija najverovatnije je posledica uticaja daidzeina na transportne proteine uključene u apsorpciju, distribuciju i ekskreciju levofloksacina, jer je primenom PAMPA metode, isključena mogućnost interakcije daidzeina i levofloksacina na nivou pasivne difuzije. Takođe, činjenica da ne dolazi do potpunog ekvilibrijuma između slobodnih koncentracija levofloksacina u plazmi i mišiću, potvrđuje uključenost drugih mehanizama sem pasivne difuzije u proces distribucije levofloksacina.

Zajednička primena daidzeina i levofloksacina nije imala negativan uticaj na biohemijske i histološke parametre toksičnosti. Nije zabeležen porast vrednosti biohemijskih parametara funkcije jetre i bubrega niti narušavanje tkivne arhitektonike ovih organa.

Daidzein je povećao osetljivost ispitivanih bakterija i vrednosti farmakokinetičko/farmakodinamičkih indeksa efikasnosti za levofloksacin što ide u prilog daljim ispitivanjima daidzeina u pravcu razvoja efluks inhibitora sa visokim translacionim potencijalom.

7. LITERATURA

1. Martínez JL. Mechanisms of Action and of Resistance to Quinolones. *Antibiotic Drug Resistance*. 2019;39-55.
2. Oliphant CM, Green GM. Quinolones: a comprehensive review. *American family physician*. 2002;65(3):455-64.
3. Zhao X, Xu C, Domagala J, Drlica K. DNA topoisomerase targets of the fluoroquinolones: a strategy for avoiding bacterial resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94(25):13991-6.
4. Dorman CJ. DNA supercoiling and transcription in bacteria: a two-way street. *BMC molecular and cell biology*. 2019;20(1):26.
5. Luan G, Drlica K. Fluoroquinolone-gyrase-DNA cleaved complexes. *DNA Topoisomerases*: Springer; 2018. p. 269-81.
6. Leveque D, Jehl F. Molecular determinants of fluoroquinolone antibacterial agents pharmacokinetics. *Current clinical pharmacology*. 2009;4(3):191-7.
7. Zhanel GG, Fontaine S, Adam H, Schurek K, Mayer M, Noreddin AM, et al. A Review of New Fluoroquinolones. *Treatments in Respiratory Medicine*. 2006;5(6):437-65.
8. Lemke T, Williams D. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. The Sixth Edition ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
9. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic acids research*. 2018;46(D1):D1074-d82.
10. Fish DN, Chow AT. The clinical pharmacokinetics of levofloxacin. *Clinical pharmacokinetics*. 1997;32(2):101-19.
11. Vance-Bryan K, Guay DR, Rotschafer JC. Clinical pharmacokinetics of ciprofloxacin. *Clinical pharmacokinetics*. 1990;19(6):434-61.
12. Liu HH. Safety profile of the fluoroquinolones. *Drug Safety*. 2010;33(5):353-69.
13. Bisaccia DR, Aicale R, Tarantino D, Peretti GM, Maffulli N. Biological and chemical changes in fluoroquinolone-associated tendinopathies: a systematic review. *British medical bulletin*. 2019.
14. Lee C-C, Lee M-tG, Chen Y-S, Lee S-H, Chen Y-S, Chen S-C, et al. Risk of aortic dissection and aortic aneurysm in patients taking oral fluoroquinolone. *JAMA internal medicine*. 2015;175(11):1839-47.
15. World Health Organization. *WHO model list of essential medicines: 21st ed*. Geneva, 2019.
16. Anderson VR, Perry CM. Levofloxacin. *Drugs*. 2008;68(4):535-65.
17. Johnson J, Hadad D, Boom W, Daley C, Peloquin C, Eisenach K, et al. Early and extended early bactericidal activity of levofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin in pulmonary tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2006;10(6):605-12.
18. Maeda T, Takahashi K, Ohtsu N, Oguma T, Ohnishi T, Atsumi R, et al. Identification of influx transporter for the quinolone antibacterial agent levofloxacin. *Molecular pharmaceutics*. 2007;4(1):85-94.
19. Yamaguchi H, Yano I, Hashimoto Y, Inui K-I. Secretory Mechanisms of Grepafloxacin and Levofloxacin in the Human Intestinal Cell Line Caco-2. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2000;295(1):360-6.
20. Naruhashi K, Tamai I, Inoue N, Muraoka H, Sai Y, Suzuki N, et al. Active intestinal secretion of new quinolone antimicrobials and the partial contribution of P-glycoprotein. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2001;53(5):699-709.
21. Turnidge J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Drugs*. 1999;58 Suppl 2:29-36.

22. Winter ME, Katcher BS, Koda-Kimble MA. Basic clinical pharmacokinetics. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. 196 p.
23. Ambrose PG, Bhavnani SM, Rubino CM, Louie A, Gumbo T, Forrest A, et al. Pharmacokinetics-pharmacodynamics of antimicrobial therapy: it's not just for mice anymore. *Clinical Infectious Diseases*. 2007;44(1):79-86.
24. Asin-Prieto E, Rodriguez-Gascon A, Isla A. Applications of the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) analysis of antimicrobial agents. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2015;21(5):319-29.
25. Craig WA. Does the dose matter? *Clinical infectious diseases*. 2001;33(Supplement 3):S233-S7.
26. Mouton J, Brown D, Apfalter P, Cantón R, Giske C, Ivanova M, et al. The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18(3):E37-E45.
27. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2009;49(11):1749-55.
28. Brooks BD, Brooks AE. Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. *Advanced drug delivery reviews*. 2014;78:14-27.
29. Sabo A, Tomas A, Tomic N, Mikov M, Horvat O, Popovic R, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic based dosing of ciprofloxacin in complicated urinary tract infections. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 2015;10(3):621-6.
30. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2001;48 Suppl 1:5-16.
31. Jacobs M. Optimisation of antimicrobial therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. *Clinical microbiology and Infection*. 2001;7(11):589-96.
32. Drusano GL, Preston SL, Fowler C, Corrado M, Weisinger B, Kahn J. Relationship between fluoroquinolone area under the curve: minimum inhibitory concentration ratio and the probability of eradication of the infecting pathogen, in patients with nosocomial pneumonia. *Journal of Infectious Diseases*. 2004;189(9):1590-7.
33. Odenholt-Tornqvist I, Lowdin E, Cars O. Postantibiotic effects and postantibiotic sub-MIC effects of roxithromycin, clarithromycin, and azithromycin on respiratory tract pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(1):221-6.
34. Gudmundsson S, Vogelmann B, Craig WA. Decreased bactericidal activity during the period of the postantibiotic effect. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1994;34(6):921-30.
35. Odenholt-Tornqvist I, Lowdin E, Cars O. Postantibiotic sub-MIC effects of vancomycin, roxithromycin, sparfloracin, and amikacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1992;36(9):1852-8.
36. Levison ME, Levison JH. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antibacterial Agents. *Infectious disease clinics of North America*. 2009;23(4):791-vii.
37. Schmidt S, Barbour A, Sahre M, Rand KH, Derendorf H. PK/PD: new insights for antibacterial and antiviral applications. *Current opinion in pharmacology*. 2008;8(5):549-56.
38. Jacobs MR, Johnson CE. Macrolide resistance: an increasing concern for treatment failure in children. *The Pediatric infectious disease journal*. 2003;22(8 Suppl):S131-8.
39. Jacobs MR. Optimisation of antimicrobial therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2001;7(11):589-96.
40. Ferrara A, Dos Santos C, Cimbro M, Grassi GG. Comparative antimicrobial activity and post-antibiotic effect of azithromycin, clarithromycin and roxithromycin against some respiratory pathogens. *Int J Antimicrob Agents*. 1996;7(3):181-6.

41. Mahmoudi L, Niknam R, Mousavi S, Ahmadi A, Honarmand H, Ziaie S, et al. Optimal Aminoglycoside Therapy Following the Sepsis: How Much Is Too Much? *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*. 2013;12(2):261-9.
42. Forrest A, Nix DE, Ballou CH, Goss TF, Birmingham M, Schentag J. Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1993;37(5):1073-81.
43. Zelenitsky SA, Harding GK, Sun S, Ubhi K, Ariano RE. Treatment and outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: an antibiotic pharmacodynamic analysis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2003;52(4):668-74.
44. Drusano GL, Preston SL, Fowler C, Corrado M, Weisinger B, Kahn J. Relationship between fluoroquinolone area under the curve: minimum inhibitory concentration ratio and the probability of eradication of the infecting pathogen, in patients with nosocomial pneumonia. *The Journal of infectious diseases*. 2004;189(9):1590-7.
45. Drlica K. The mutant selection window and antimicrobial resistance. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2003;52(1):11-7.
46. Dong Y, Zhao X, Domagala J, Drlica K. Effect of fluoroquinolone concentration on selection of resistant mutants of *Mycobacterium bovis* BCG and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999;43(7):1756-8.
47. Lu T, Zhao X, Li X, Hansen G, Blondeau J, Drlica K. Effect of chloramphenicol, erythromycin, moxifloxacin, penicillin and tetracycline concentration on the recovery of resistant mutants of *Mycobacterium smegmatis* and *Staphylococcus aureus*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2003;52(1):61-4.
48. Cai Y, Li R, Liang B, Bai N, Liu Y, Wang R. In vitro antimicrobial activity and mutant prevention concentration of colistin against *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(9):3998-9.
49. Cai Y, Yang J, Kan Q, Nie X, Wang R, Liang B, et al. Mutant prevention concentration of colistin alone and in combination with levofloxacin or tobramycin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *International journal of antimicrobial agents*. 2012;40(5):477-8.
50. Liu MT, Sheng MY, Zhang Y, Li Y. [Combined application of ciprofloxacin and tobramycin on mutant selective windows of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*]. *Zhonghua yi xue za zhi*. 2011;91(20):1427-31.
51. Dahdouh E, Shoucair SH, Salem SE, Daoud Z. Mutant prevention concentrations of imipenem and meropenem against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *TheScientificWorldJournal*. 2014;2014:979648.
52. Blondeau JM, Hansen G, Metzler K, Hedlin P. The role of PK/PD parameters to avoid selection and increase of resistance: mutant prevention concentration. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)*. 2004;16 Suppl 3:1-19.
53. Blondeau JM, Zhao X, Hansen G, Drlica K. Mutant prevention concentrations of fluoroquinolones for clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(2):433-8.
54. Almeida D, Nuermberger E, Tyagi S, Bishai WR, Grosset J. In vivo validation of the mutant selection window hypothesis with moxifloxacin in a murine model of tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(12):4261-6.
55. Balaje RM, Sidhu PK, Kaur G, Rampal S. Mutant prevention concentration and PK-PD relationships of enrofloxacin for *Pasteurella multocida* in buffalo calves. *Research in veterinary science*. 2013;95(3):1114-24.
56. Stahlmann R, Lode H. [Pharmacokinetics of antibiotics in obese and critical care patients]. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*. 2015;140(4):271-6.
57. Lagler H, Zeitlinger M. [Tissue penetration of antibiotics. Does the treatment reach the target site?]. *Medizinische Klinik, Intensivmedizin und Notfallmedizin*. 2014;109(3):175-81.

58. Popović R, Tomić Z, Tomas A, Anđelić N, Vicković S, Jovanović G, et al. Five-year surveillance and correlation of antibiotic consumption and resistance of Gram-negative bacteria at an intensive care unit in Serbia. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)*. 2020;1-10.
59. Tomić Z, Tomas A, Vukmirović S, Mikov M, Horvat O, Tomić N, et al. Do We Bury Antibacterials When Launching? Cefaclor Example. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2016;105(3):1295-300.
60. Deitchman AN, Derendorf H. Measuring drug distribution in the critically ill patient. *Advanced drug delivery reviews*. 2014;77:22-6.
61. Schmidt S, Rock K, Sahre M, Burkhardt O, Brunner M, Lobmeyer MT, et al. Effect of protein binding on the pharmacological activity of highly bound antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(11):3994-4000.
62. Tomaselli F, Maier A, Smolle-Juttner FM. [Pharmacokinetics of antibiotics in inflamed and healthy lung tissue]. *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)*. 2003;153(15-16):342-4.
63. Felton TW, Hope WW, Roberts JA. How severe is antibiotic pharmacokinetic variability in critically ill patients and what can be done about it? *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2014;79(4):441-7.
64. Taccone FS, Bond O, Cavicchi FZ, Hites M. Individualized antibiotic strategies. *Current opinion in anaesthesiology*. 2016;29(2):166-71.
65. Mariappan TT, Mandekar S, Marathe P. Insight into tissue unbound concentration: utility in drug discovery and development. *Current drug metabolism*. 2013;14(3):324-40.
66. Liu P, Derendorf H. Antimicrobial tissue concentrations. *Infectious disease clinics of North America*. 2003;17(3):599-613.
67. Schwameis R, Zeitlinger M. Methods to measure target site penetration of antibiotics in critically ill patients. *Current clinical pharmacology*. 2013;8(1):46-58.
68. Langer O, Karch R, Muller U, Dobrozemsky G, Abraham A, Zeitlinger M, et al. Combined PET and microdialysis for in vivo assessment of intracellular drug pharmacokinetics in humans. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2005;46(11):1835-41.
69. Fischman AJ, Alpert NM, Rubin RH. Pharmacokinetic imaging: a noninvasive method for determining drug distribution and action. *Clinical pharmacokinetics*. 2002;41(8):581-602.
70. Tucker EW, Guglieri-Lopez B, Ordonez AA, Ritchie B, Klunk MH, Sharma R, et al. Noninvasive (11)C-rifampin positron emission tomography reveals drug biodistribution in tuberculous meningitis. *Science translational medicine*. 2018;10(470).
71. Langer O, Brunner M, Zeitlinger M, Ziegler S, Müller U, Dobrozemsky G, et al. In vitro and in vivo evaluation of [18F]ciprofloxacin for the imaging of bacterial infections with PET. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2005;32(2):143-50.
72. Fischman AJ, Babich JW, Bonab AA, Alpert NM, Vincent J, Callahan RJ, et al. Pharmacokinetics of [18F]trovafloxacin in healthy human subjects studied with positron emission tomography. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1998;42(8):2048-54.
73. Brunner M, Langer O, Dobrozemsky G, Müller U, Zeitlinger M, Mitterhauser M, et al. [18F]Ciprofloxacin, a new positron emission tomography tracer for noninvasive assessment of the tissue distribution and pharmacokinetics of ciprofloxacin in humans. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(10):3850-7.
74. Kuti JL, Nicolau DP. Presence of infection influences the epithelial lining fluid penetration of oral levofloxacin in adult patients. *International journal of antimicrobial agents*. 2015;45(5):512-8.
75. Mouton JW, Theuretzbacher U, Craig WA, Tulkens PM, Derendorf H, Cars O. Tissue concentrations: do we ever learn? *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008;61(2):235-7.

76. Zhuang L, Xia H, Gu Y, Derendorf H, Li Y, Liu C. Theory and application of microdialysis in pharmacokinetic studies. *Current drug metabolism*. 2015.
77. Liu X, Kruger PS, Roberts MS. How to measure pharmacokinetics in critically ill patients? *Current pharmaceutical biotechnology*. 2011;12(12):2037-43.
78. Dhanani J, Roberts JA, Chew M, Lipman J, Boots RJ, Paterson DL, et al. Antimicrobial chemotherapy and lung microdialysis: a review. *International journal of antimicrobial agents*. 2010;36(6):491-500.
79. Kurata T, Yasuhara H. [Application of microdialysis for pharmacological-toxicological studies]. *The Journal of toxicological sciences*. 1997;22(3):App 89-98.
80. Roberts JA, Roberts MS, Robertson TA, Cross SE, Lipman J. A novel way to investigate the effects of plasma exchange on antibiotic levels: use of microdialysis. *International journal of antimicrobial agents*. 2008;31(3):240-4.
81. D'Souza M A, Ravn A, Jorns C, Nowak G, Isaksson B. Membrane cut-off does not influence results regarding the measurement of small molecules - a comparative study between 20- and 100-kDa catheters in hepatic microdialysis. *Clinical physiology and functional imaging*. 2014;34(2):109-13.
82. Brunner M, Derendorf H, Muller M. Microdialysis for in vivo pharmacokinetic/pharmacodynamic characterization of anti-infective drugs. *Current opinion in pharmacology*. 2005;5(5):495-9.
83. Chaurasia CS, Muller M, Bashaw ED, Benfeldt E, Bolinder J, Bullock R, et al. AAPS-FDA workshop white paper: microdialysis principles, application and regulatory perspectives. *Pharmaceutical research*. 2007;24(5):1014-25.
84. Benveniste H, Hüttemeier PC. Microdialysis—theory and application. *Progress in neurobiology*. 1990;35(3):195-215.
85. Nandi P, Lunte SM. Recent trends in microdialysis sampling integrated with conventional and microanalytical systems for monitoring biological events: a review. *Analytica chimica acta*. 2009;651(1):1-14.
86. Shannon RJ, Carpenter KL, Guilfoyle MR, Helmy A, Hutchinson PJ. Cerebral microdialysis in clinical studies of drugs: pharmacokinetic applications. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2013;40(3):343-58.
87. Roberts JA, Udy AA, Jarrett P, Wallis SC, Hope WW, Sharma R, et al. Plasma and target-site subcutaneous tissue population pharmacokinetics and dosing simulations of cefazolin in post-trauma critically ill patients. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2015;70(5):1495-502.
88. Andreas M, Zeitlinger M, Wisser W, Jaeger W, Maier-Salamon A, Thalhammer F, et al. Cefazolin and linezolid penetration into sternal cancellous bone during coronary artery bypass grafting. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2014.
89. Himebauch AS, Nicolson SC, Sisko M, Moorthy G, Fuller S, Gaynor JW, et al. Skeletal muscle and plasma concentrations of cefazolin during cardiac surgery in infants. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2014;148(6):2634-41.
90. Jonsson TB, Nilsson TK, Breimer LH, Schneede J, Arfvidsson B, Norgren L. Cloxacillin concentrations in serum, subcutaneous fat, and muscle in patients with chronic critical limb ischemia. *European journal of clinical pharmacology*. 2014;70(8):957-63.
91. Hurtado FK, Weber B, Derendorf H, Hochhaus G, Dalla Costa T. Population pharmacokinetic modeling of the unbound levofloxacin concentrations in rat plasma and prostate tissue measured by microdialysis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(2):678-86.

92. Luer MS, Neill KK, Gurley BJ, Shannon ML, Killian AD, Rodvold KA. Fluctuations in vancomycin CNS tissue concentrations following intermittent and continuous infusions in the rat. *Neurological research*. 2004;26(3):312-5.
93. Lu W, Wan J, Zhang Q, She Z, Jiang X. Aclarubicin-loaded cationic albumin-conjugated pegylated nanoparticle for glioma chemotherapy in rats. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2007;120(2):420-31.
94. Chang YL, Chou MH, Lin MF, Chen YF, Chen CF, Cheng FC, et al. Simultaneous determination of unbound cefoperazone in rat blood and brain using microdialysis. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2000;52(8):963-8.
95. Tsai TH, Hung LC, Chang YL, Shum AY, Chen CF. Simultaneous blood and brain sampling of cephalixin in the rat by microdialysis and microbore liquid chromatography: application to pharmacokinetics studies. *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications*. 2000;740(2):203-9.
96. Tsai TH, Chen YF, Chen KC, Shum AY, Chen CF. Concurrent quantification and pharmacokinetic analysis of cefotaxime in rat blood and brain by microdialysis and microbore liquid chromatography. *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications*. 2000;738(1):75-81.
97. Tsai TH, Hung LC, Chen CF. Microdialysis study of biliary excretion of chloramphenicol and its glucuronide in the rat. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 1999;51(8):911-5.
98. Mindermann T, Zimmerli W, Gratzl O. Rifampin concentrations in various compartments of the human brain: a novel method for determining drug levels in the cerebral extracellular space. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1998;42(10):2626-9.
99. Waga J, Ehinger B. Intravitreal concentrations of some drugs administered with microdialysis. *Acta ophthalmologica Scandinavica*. 1997;75(1):36-40.
100. Kovar A, Dalla Costa T, Derendorf H. Comparison of plasma and free tissue levels of ceftriaxone in rats by microdialysis. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1997;86(1):52-6.
101. Mindermann T, Landolt H, Zimmerli W, Rajacic Z, Gratzl O. Penetration of rifampicin into the brain tissue and cerebral extracellular space of rats. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1993;31(5):731-7.
102. Eisenberg EJ, Conzentino P, Eickhoff WM, Cundy KC. Pharmacokinetic measurement of drugs in lung epithelial lining fluid by microdialysis: aminoglycoside antibiotics in rat bronchi. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 1993;29(2):93-8.
103. DeGuchi Y, Terasaki T, Yamada H, Tsuji A. An application of microdialysis to drug tissue distribution study: in vivo evidence for free-ligand hypothesis and tissue binding of beta-lactam antibiotics in interstitial fluids. *Journal of pharmacobio-dynamics*. 1992;15(2):79-89.
104. de Lange EC, Marchand S, van den Berg D, van der Sandt IC, de Boer AG, Delon A, et al. In vitro and in vivo investigations on fluoroquinolones; effects of the P-glycoprotein efflux transporter on brain distribution of sparfloxacin. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2000;12(2):85-93.
105. Drusano GL, Preston SL, Van Guilder M, North D, Gombert M, Oefelein M, et al. A population pharmacokinetic analysis of the penetration of the prostate by levofloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000;44(8):2046-51.
106. Szerkus O, Jacyna J, Wiczling P, Gibas A, Sieczkowski M, Siluk D, et al. Ultra-high performance liquid chromatographic determination of levofloxacin in human plasma and prostate tissue with use of experimental design optimization procedures. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2016;1029-1030:48-59.
107. Liu D, Xu S, Xiao H, Wang Z, Mao N, Zhou J, et al. Quantitative determination of unbound levofloxacin by simultaneous microdialysis in rat pancreas after intravenous and oral doses. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2014;66(9):1215-21.

108. Tsai TH. Pharmacokinetics of pefloxacin and its interaction with cyclosporin A, a P-glycoprotein modulator, in rat blood, brain and bile, using simultaneous microdialysis. *British journal of pharmacology*. 2001;132(6):1310-6.
109. Marchand S, Forsell A, Chenel M, Comets E, Lamarche I, Couet W. Norfloxacin blood-brain barrier transport in rats is not affected by probenecid coadministration. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(1):371-3.
110. Marchand S, Chenel M, Lamarche I, Pariat C, Couet W. Dose ranging pharmacokinetics and brain distribution of norfloxacin using microdialysis in rats. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2003;92(12):2458-65.
111. Ooie T, Terasaki T, Suzuki H, Sugiyama Y. Quantitative brain microdialysis study on the mechanism of quinolones distribution in the central nervous system. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 1997;25(7):784-9.
112. Arakawa H, Shirasaka Y, Haga M, Nakanishi T, Tamai I. Active intestinal absorption of fluoroquinolone antibacterial agent ciprofloxacin by organic anion transporting polypeptide, Oatp1a5. *Biopharmaceutics & drug disposition*. 2012;33(6):332-41.
113. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1990;38(9):1277-87.
114. Ong HX, Traini D, Bebawy M, Young PM. Ciprofloxacin Is Actively Transported across Bronchial Lung Epithelial Cells Using a Calu-3 Air Interface Cell Model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(6):2535-40.
115. Gorski JC, Renbarger JL, Vuppalanchi R, Miller M, Galinsky RE, Hall SD. Effect of MDR1 genotype (G2677T) on the disposition of ciprofloxacin in adults. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2005;77(2):P31-P.
116. Haslam IS, Wright JA, O'Reilly DA, Sherlock DJ, Coleman T, Simmons NL. Intestinal Ciprofloxacin Efflux: The Role of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2). *Drug Metabolism and Disposition*. 2011;39(12):2321-8.
117. Merino G, Alvarez AI, Pulido MM, Molina AJ, Schinkel AH, Prieto JG. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) transports fluoroquinolone antibiotics and affects their oral availability, pharmacokinetics, and milk secretion. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2006;34(4):690-5.
118. Schuck EL, Grant M, Derendorf H. Effect of simulated microgravity on the disposition and tissue penetration of ciprofloxacin in healthy volunteers. *Journal of clinical pharmacology*. 2005;45(7):822-31.
119. Bielecka-Grzela S, Klimowicz A. Penetration of ciprofloxacin and its desethylenemetabolite into skin in humans after a single oral dose of the parent drug assessed by cutaneous microdialysis. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*. 2005;30(4):383-90.
120. Joukhadar C, Klein N, Frossard M, Minar E, Stass H, Lackner E, et al. Angioplasty increases target site concentrations of ciprofloxacin in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2001;70(6):532-9.
121. Brunner M, Hollenstein U, Delacher S, Jager D, Schmid R, Lackner E, et al. Distribution and antimicrobial activity of ciprofloxacin in human soft tissues. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999;43(5):1307-9.
122. Muller M, Brunner M, Hollenstein U, Joukhadar C, Schmid R, Minar E, et al. Penetration of ciprofloxacin into the interstitial space of inflamed foot lesions in non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999;43(8):2056-8.
123. Brunner M, Stabeta H, Moller JG, Schrolnberger C, Erovic B, Hollenstein U, et al. Target site concentrations of ciprofloxacin after single intravenous and oral doses. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002;46(12):3724-30.

124. Joukhadar C, Dehghanyar P, Traunmuller F, Sauermann R, Mayer-Helm B, Georgopoulos A, et al. Increase of microcirculatory blood flow enhances penetration of ciprofloxacin into soft tissue. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(10):4149-53.
125. Joukhadar C, Klein N, Dittrich P, Zeitlinger M, Geppert A, Skhirtladze K, et al. Target site penetration of fosfomycin in critically ill patients. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2003;51(5):1247-52.
126. Hollenstein UM, Brunner M, Schmid R, Muller M. Soft tissue concentrations of ciprofloxacin in obese and lean subjects following weight-adjusted dosing. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2001;25(3):354-8.
127. Zeitlinger MA, Dehghanyar P, Mayer BX, Schenk BS, Neckel U, Heinz G, et al. Relevance of soft-tissue penetration by levofloxacin for target site bacterial killing in patients with sepsis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003;47(11):3548-53.
128. Sauermann R, Delle-Karth G, Marsik C, Steiner I, Zeitlinger M, Mayer-Helm BX, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ceftiofime in subcutaneous adipose tissue of septic patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(2):650-5.
129. Steiner IM, Langenberger H, Marsik C, Mayer BX, Fischer M, Georgopoulos A, et al. Effect of norepinephrine on ceftiofime tissue concentrations in healthy subjects. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2004;53(3):506-11.
130. Zeitlinger MA, Marsik C, Georgopoulos A, Muller M, Heinz G, Joukhadar C. Target site bacterial killing of ceftiofime and fosfomycin in critically ill patients. *International journal of antimicrobial agents*. 2003;21(6):562-7.
131. Joukhadar C, Klein N, Mayer BX, Kreischitz N, Delle-Karth G, Palkovits P, et al. Plasma and tissue pharmacokinetics of ceftiofime in patients with sepsis. *Critical care medicine*. 2002;30(7):1478-82.
132. Roberts JA, Roberts MS, Semark A, Udy AA, Kirkpatrick CM, Paterson DL, et al. Antibiotic dosing in the 'at risk' critically ill patient: Linking pathophysiology with pharmacokinetics/pharmacodynamics in sepsis and trauma patients. *BMC anesthesiology*. 2011;11:3.
133. Roberts JA, Roberts MS, Robertson TA, Dalley AJ, Lipman J. Piperacillin penetration into tissue of critically ill patients with sepsis--bolus versus continuous administration? *Critical care medicine*. 2009;37(3):926-33.
134. Joukhadar C, Frossard M, Mayer BX, Brunner M, Klein N, Siostrzonek P, et al. Impaired target site penetration of beta-lactams may account for therapeutic failure in patients with septic shock. *Critical care medicine*. 2001;29(2):385-91.
135. Muller M, Haag O, Burgdorff T, Georgopoulos A, Weninger W, Jansen B, et al. Characterization of peripheral-compartment kinetics of antibiotics by in vivo microdialysis in humans. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1996;40(12):2703-9.
136. Bellmann R, Kuchling G, Dehghanyar P, Zeitlinger M, Minar E, Mayer BX, et al. Tissue pharmacokinetics of levofloxacin in human soft tissue infections. *British journal of clinical pharmacology*. 2004;57(5):563-8.
137. Zeitlinger MA, Traunmuller F, Abraham A, Muller MR, Erdogan Z, Muller M, et al. A pilot study testing whether concentrations of levofloxacin in interstitial space fluid of soft tissues may serve as a surrogate for predicting its pharmacokinetics in lung. *International journal of antimicrobial agents*. 2007;29(1):44-50.
138. Hutschala D, Skhirtladze K, Zuckermann A, Wisser W, Jaksch P, Mayer-Helm BX, et al. In vivo measurement of levofloxacin penetration into lung tissue after cardiac surgery. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(12):5107-11.

139. De La Pena A, Dalla Costa T, Talton JD, Rehak E, Gross J, Thyroff-Friesinger U, et al. Penetration of cefaclor into the interstitial space fluid of skeletal muscle and lung tissue in rats. *Pharmaceutical research*. 2001;18(9):1310-4.
140. Dahyot C, Marchand S, Pessini GL, Pariat C, Debaene B, Couet W, et al. Microdialysis study of imipenem distribution in skeletal muscle and lung extracellular fluids of *Acinetobacter baumannii*-infected rats. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(6):2265-7.
141. Zeitlinger M, Muller M, Joukhadar C. Lung microdialysis--a powerful tool for the determination of exogenous and endogenous compounds in the lower respiratory tract (mini-review). *The AAPS journal*. 2005;7(3):E600-8.
142. Liu P, Fuhrherr R, Webb AI, Obermann B, Derendorf H. Tissue penetration of cefpodoxime into the skeletal muscle and lung in rats. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2005;25(4-5):439-44.
143. Tomaselli F, Maier A, Matzi V, Smolle-Juttner FM, Dittrich P. Penetration of meropenem into pneumonic human lung tissue as measured by in vivo microdialysis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(6):2228-32.
144. Tomaselli F, Dittrich P, Maier A, Woltsche M, Matzi V, Pinter J, et al. Penetration of piperacillin and tazobactam into pneumonic human lung tissue measured by in vivo microdialysis. *British journal of clinical pharmacology*. 2003;55(6):620-4.
145. Hutschala D, Kinstner C, Skhirtladze K, Mayer-Helm BX, Zeitlinger M, Wisser W, et al. The impact of perioperative atelectasis on antibiotic penetration into lung tissue: an in vivo microdialysis study. *Intensive care medicine*. 2008;34(10):1827-34.
146. Cazzola M, Blasi F, Terzano C, Matera MG, Marsico SA. Delivering antibacterials to the lungs: considerations for optimizing outcomes. *American journal of respiratory medicine : drugs, devices, and other interventions*. 2002;1(4):261-72.
147. Schuler P, Zemper K, Borner K, Koeppe P, Schaberg T, Lode H. Penetration of sparfloxacin and ciprofloxacin into alveolar macrophages, epithelial lining fluid, and polymorphonuclear leucocytes. *The European respiratory journal*. 1997;10(5):1130-6.
148. Chierakul N, Klomsawat D, Chulavatnatol S, Chindavijak B. Intrapulmonary pharmacokinetics of ofloxacin in drug-resistant tuberculosis. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 2001;5(3):278-82.
149. Yamamoto H, Koizumi T, Hirota M, Kaneki T, Ogasawara H, Yamazaki Y, et al. Lung tissue distribution after intravenous administration of grepafloxacin: comparative study with levofloxacin. *Japanese journal of pharmacology*. 2002;88(1):63-8.
150. Muller M, Stass H, Brunner M, Moller JG, Lackner E, Eichler HG. Penetration of moxifloxacin into peripheral compartments in humans. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999;43(10):2345-9.
151. Wicha SG, Haak T, Zink K, Kees F, Kloft C, Kees MG. Population pharmacokinetics and target attainment analysis of moxifloxacin in patients with diabetic foot infections. *Journal of clinical pharmacology*. 2015;55(6):639-46.
152. Tacconelli E, Magrini N, Kahlmeter G, Singh N. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *World Health Organization*. 2017;27:318-27.
153. World Health Organization (WHO) Regional Office for Europe. Central Asian and Eastern European surveillance of antimicrobial resistance: annual report 2019. Central Asian and Eastern European surveillance of antimicrobial resistance: annual report 2019. Copenhagen, Denmark: WHO Regional Office for Europe;2020.
154. Lamut A, Peterlin Mašič L, Kikelj D, Tomašič T. Efflux pump inhibitors of clinically relevant multidrug resistant bacteria. *Medicinal Research Reviews*. 2019;39(6):2460-504.

155. Rao M, Padyana S, Dipin K, Kumar S, Nayak B, Varela M. Antimicrobial compounds of plant origin as efflux pump inhibitors: new avenues for controlling multidrug resistant pathogens. *J Antimicrob Agents*. 2018;4(1000159):2472-1212.1000159.
156. Paulsen IT, Skurray RA, Tam R, Saier MH, Jr., Turner RJ, Weiner JH, et al. The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Molecular microbiology*. 1996;19(6):1167-75.
157. Spengler G, Kincses A, Gajdacs M, Amaral L. New Roads Leading to Old Destinations: Efflux Pumps as Targets to Reverse Multidrug Resistance in Bacteria. *Molecules*. 2017;22(3).
158. van Veen HW, Konings WN. The ABC family of multidrug transporters in microorganisms. *Biochimica et biophysica acta*. 1998;1365(1-2):31-6.
159. Saier MH, Jr., Tam R, Reizer A, Reizer J. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Molecular microbiology*. 1994;11(5):841-7.
160. Brown MH, Paulsen IT, Skurray RA. The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Molecular microbiology*. 1999;31(1):394-5.
161. Pao SS, Paulsen IT, Saier MH, Jr. Major facilitator superfamily. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 1998;62(1):1-34.
162. Hassan KA, Liu Q, Henderson PJ, Paulsen IT. Homologs of the *Acinetobacter baumannii* AceI transporter represent a new family of bacterial multidrug efflux systems. *mBio*. 2015;6(1).
163. Hassan KA, Liu Q, Elbourne LD, Ahmad I, Sharples D, Naidu V, et al. Pacing across the membrane: the novel PACE family of efflux pumps is widespread in Gram-negative pathogens. *Research in microbiology*. 2018;169(7-8):450-4.
164. Kaatz GW, Seo SM, Foster TJ. Introduction of a *norA* promoter region mutation into the chromosome of a fluoroquinolone-susceptible strain of *Staphylococcus aureus* using plasmid integration. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999;43(9):2222-4.
165. Kaatz GW, Thyagarajan RV, Seo SM. Effect of promoter region mutations and *mgrA* overexpression on transcription of *norA*, which encodes a *Staphylococcus aureus* multidrug efflux transporter. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(1):161-9.
166. Du D, Wang Z, James NR, Voss JE, Klimont E, Ohene-Agyei T, et al. Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature*. 2014;509(7501):512-5.
167. Webber MA, Piddock LJ. Absence of mutations in *marRAB* or *soxRS* in *acrB*-overexpressing fluoroquinolone-resistant clinical and veterinary isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(5):1550-2.
168. Tintino SR, Oliveira-Tintino CD, Campina FF, Silva RL, Costa MdS, Menezes IR, et al. Evaluation of the tannic acid inhibitory effect against the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. *Microbial pathogenesis*. 2016;97:9-13.
169. Stavri M, Piddock LJ, Gibbons S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2007;59(6):1247-60.
170. Abreu AC, McBain AJ, Simoes M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Natural product reports*. 2012;29(9):1007-21.
171. Schmitz FJ, Fluit AC, Lückefahr M, Engler B, Hofmann B, Verhoef J, et al. The effect of reserpine, an inhibitor of multidrug efflux pumps, on the in-vitro activities of ciprofloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1998;42(6):807-10.
172. Gibbons S, Udo E. The effect of reserpine, a modulator of multidrug efflux pumps, on the in vitro activity of tetracycline against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) possessing the tet (K) determinant. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 2000;14(2):139-40.

173. Sudano Roccaro A, Blanco AR, Giuliano F, Rusciano D, Enea V. Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in staphylococci by inhibiting its efflux from bacterial cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(6):1968-73.
174. Shiu WK, Rahman MM, Curry J, Stapleton P, Zloh M, Malkinson JP, et al. Antibacterial acylphloroglucinols from *Hypericum olympicum*. *Journal of natural products*. 2012;75(3):336-43.
175. Shiu WK, Malkinson JP, Rahman MM, Curry J, Stapleton P, Gunaratnam M, et al. A new plant-derived antibacterial is an inhibitor of efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *International journal of antimicrobial agents*. 2013;42(6):513-8.
176. Prasch S, Bucar F. Plant derived inhibitors of bacterial efflux pumps: an update. *Phytochemistry reviews*. 2015;14(6):961-74.
177. Roy SK, Kumari N, Pahwa S, Agrahari UC, Bhutani KK, Jachak SM, et al. NorA efflux pump inhibitory activity of coumarins from *Mesua ferrea*. *Fitoterapia*. 2013;90:140-50.
178. Siriyong T, Srیمانote P, Chusri S, Yingyongnarongkul B-e, Suaisom C, Tipmanee V, et al. Conessine as a novel inhibitor of multidrug efflux pump systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC complementary and alternative medicine*. 2017;17(1):405.
179. Aparna V, Dineshkumar K, Mohanalakshmi N, Velmurugan D, Hopper W. Identification of natural compound inhibitors for multidrug efflux pumps of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* using in silico high-throughput virtual screening and in vitro validation. *PloS one*. 2014;9(7):e101840.
180. Yi Y, Adrjan B, Li J, Hu B, Roszak S. NMR studies of daidzein and puerarin: active antioxidants in traditional Chinese medicine. *Journal of molecular modeling*. 2019;25(7):202.
181. Hogervorst JC, Raskovic A, Ubavic M, Tomas A, Gacesa B, Borcic V, et al. Evaluation of Safety and Interactions with Conventional Drugs of Commercially Available Soybean Extract-containing Dietary Supplements. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;80(5):858-67.
182. Dymarska M, Janeczko T, Kostrzewa-Susłow E. Biotransformations of Flavones and an Isoflavone (Daidzein) in Cultures of Entomopathogenic Filamentous Fungi. *Molecules*. 2018;23(6).
183. Křížová L, Daďáková K, Kašparovská J, Kašparovský T. Isoflavones. *Molecules*. 2019;24(6).
184. Wang Q, Liu W, Wang J, Liu H, Chen Y. Preparation and pharmacokinetic study of Daidzein Long-circulating liposomes. *Nanoscale Research Letters*. 2019;14(1):321.
185. Raju KSR, Rashid M, Gundeti M, Taneja I, Malik MY, Singh SK, et al. LC-ESI-MS/MS method for the simultaneous determination of isoformononetin, daidzein, and equol in rat plasma: application to a preclinical pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*. 2019;1129:121776.
186. Das D, Sarkar S, Bordoloi J, Wann SB, Kalita J, Manna P. Daidzein, its effects on impaired glucose and lipid metabolism and vascular inflammation associated with type 2 diabetes. *BioFactors (Oxford, England)*. 2018;44(5):407-17.
187. Kim JW, Jin YC, Kim YM, Rhie S, Kim HJ, Seo HG, et al. Daidzein administration in vivo reduces myocardial injury in a rat ischemia/reperfusion model by inhibiting NF-κB activation. *Life sciences*. 2009;84(7-8):227-34.
188. Choi EJ, Kim GH. The antioxidant activity of daidzein metabolites, O-desmethylangolensin and equol, in HepG2 cells. *Molecular medicine reports*. 2014;9(1):328-32.
189. Poschner S, Maier-Salamon A, Zehl M, Wackerlig J, Dobusch D, Pachmann B, et al. The impacts of genistein and daidzein on estrogen conjugations in human breast cancer cells: a targeted metabolomics approach. *Frontiers in pharmacology*. 2017;8:699.

190. Lechner D, Gibbons S, Bucar F. Plant phenolic compounds as ethidium bromide efflux inhibitors in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008;62(2):345-8.
191. Janneh O, Anwar T, Jungbauer C, Kopp S, Khoo SH, Back DJ, et al. P-glycoprotein, multidrug resistance-associated proteins and human organic anion transporting polypeptide influence the intracellular accumulation of atazanavir. *Antivir Ther*. 2009;14(7):965-74.
192. Butler MS, Blaskovich MA, Owen JG, Cooper MA. Old dogs and new tricks in antimicrobial discovery. *Current opinion in microbiology*. 2016;33:25-34.
193. Rathi E, Kumar A, Kini SG. Computational approaches in efflux pump inhibitors: current status and prospects. *Drug Discovery Today*. 2020.
194. Douafer H, Andrieu V, Phanstiel IV O, Brunel JM. Antibiotic adjuvants: make antibiotics great again! *Journal of medicinal chemistry*. 2019;62(19):8665-81.
195. Liu P, Derendorf H. Antimicrobial tissue concentrations. *Infectious Disease Clinics*. 2003;17(3):599-613.
196. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing 2017.
197. Fortuna A, Alves G, Soares-Da-Silva P, Falcão A. Optimization of a parallel artificial membrane permeability assay for the fast and simultaneous prediction of human intestinal absorption and plasma protein binding of drug candidates: application to dibenz [b, f] azepine-5-carboxamide derivatives. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2012;101(2):530-40.
198. Setchell KD, Faughnan MS, Avades T, Zimmer-Nechemias L, Brown NM, Wolfe BE, et al. Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of ¹³C-labeled tracers in premenopausal women. *The American journal of clinical nutrition*. 2003;77(2):411-9.
199. Langtry HD, Lamb HM. Levofloxacin. *Drugs*. 1998;56(3):487-515.
200. Office of New Drugs in the Center for Drug Evaluation and Research, US Food and Drug Administration. Guidance for industry: estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. Rockville, MD: US Food and Drug Administration; 2005.
201. Suresh R, Sree V, Manavalan R, Vallippan K. Aspect of validation in HPLC method development for pharmaceutical analysis-comparison of validation requirements by FDA, USP And ICH. *Inter. J Pharm S cienc e*. 2010;1(12):123-32.
202. Liu Y-K, Jia X-Y, Liu X, Zhang Z-Q. On-line solid-phase extraction–HPLC–fluorescence detection for simultaneous determination of puerarin and daidzein in human serum. *Talanta*. 2010;82(4):1212-7.
203. Sinha D, Pandey S, Singh R, Tiwari V, Sad K, Tandon V. Synergistic efficacy of Bisbenzimidazole and Carbonyl Cyanide 3-Chlorophenylhydrazone combination against MDR bacterial strains. *Scientific reports*. 2017;7:44419.
204. El Naeem HEMA, Abdelhamid MHE, Atteya DAM. Impact of augmented renal clearance on enoxaparin therapy in critically ill patients. *Egyptian Journal of Anaesthesia*. 2017;33(1):113-7.
205. Udy AA, Dulhunty JM, Roberts JA, Davis JS, Webb SA, Bellomo R, et al. Association between augmented renal clearance and clinical outcomes in patients receiving β -lactam antibiotic therapy by continuous or intermittent infusion: a nested cohort study of the BLING-II randomised, placebo-controlled, clinical trial. *International journal of antimicrobial agents*. 2017;49(5):624-30.
206. Claus BO, Hoste EA, Colpaert K, Robays H, Decruyenaere J, De Waele JJ. Augmented renal clearance is a common finding with worse clinical outcome in critically ill patients receiving antimicrobial therapy. *Journal of critical care*. 2013;28(5):695-700.

207. Baptista JP, Udy AA, Sousa E, Pimentel J, Wang L, Roberts JA, et al. A comparison of estimates of glomerular filtration in critically ill patients with augmented renal clearance. *Critical care*. 2011;15(3):R139.
208. Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, Li Q, et al. PubChem substance and compound databases. *Nucleic acids research*. 2019;47(D1):D1102-D9.
209. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Computer methods and programs in biomedicine*. 2010;99(3):306-14.
210. Ferrer-Espada R, Shahrour H, Pitts B, Stewart PS, Sánchez-Gómez S, Martínez-de-Tejada G. A permeability-increasing drug synergizes with bacterial efflux pump inhibitors and restores susceptibility to antibiotics in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Scientific reports*. 2019;9(1):3452.
211. Frick A, Möller H, Wirbitzki E. Biopharmaceutical characterization of oral immediate release drug products. In vitro/in vivo comparison of phenoxymethylpenicillin potassium, glimepiride and levofloxacin. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 1998;46(3):305-11.
212. Zimmermann ES, Laureano JV, dos Santos CN, Schmidt S, Lagishetty CV, de Castro WV, et al. Simultaneous Semimechanistic Population Analyses of Levofloxacin in Plasma, Lung, and Prostate To Describe the Influence of Efflux Transporters on Drug Distribution following Intravenous and Intratracheal Administration. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(2):946-54.
213. de Lange EC, Marchand S, van den Berg D-J, van der Sandt IC, de Boer AG, Delon A, et al. In vitro and in vivo investigations on fluoroquinolones; effects of the P-glycoprotein efflux transporter on brain distribution of sparfloxacin. *European journal of pharmaceutical sciences*. 2000;12(2):85-93.
214. Destache CJ, Pakiz CB, Larsen C, Owens H, Dash AK. Cerebrospinal fluid penetration and pharmacokinetics of levofloxacin in an experimental rabbit meningitis model. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2001;47(5):611-5.
215. Leitner I, Nemeth J, Feurstein T, Abraham A, Matzneller P, Lagler H, et al. The third-generation P-glycoprotein inhibitor tariquidar may overcome bacterial multidrug resistance by increasing intracellular drug concentration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011;66(4):834-9.
216. Kwiecień A, Ruda-Kucerova J, Kamiński K, Babinska Z, Popiołek I, Szczubiałka K, et al. Improved Pharmacokinetics and Tissue Uptake of Complexed Daidzein in Rats. *Pharmaceutics*. 2020;12(2):162.
217. Setchell KD, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe BE, Brashear WT, et al. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *The Journal of nutrition*. 2001;131(4):1362S-75S.
218. Ma Y, Zhao X, Li J, Shen Q. The comparison of different daidzein-PLGA nanoparticles in increasing its oral bioavailability. *International Journal of Nanomedicine*. 2012;7:559.
219. Bayer T, Colnot T, Dekant W. Disposition and biotransformation of the estrogenic isoflavone daidzein in rats. *Toxicological Sciences*. 2001;62(2):205-11.
220. Liu C, Huang Y. Chinese herbal medicine on cardiovascular diseases and the mechanisms of action. *Frontiers in pharmacology*. 2016;7:469.
221. Kobayashi S, Shinohara M, Nagai T, Konishi Y. Transport mechanisms for soy isoflavones and microbial metabolites dihydrogenistein and dihydrodaidzein across monolayers and membranes. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2013;77(11):2210-7.

222. Roth M, Obaidat A, Hagenbuch B. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *British journal of pharmacology*. 2012;165(5):1260-87.
223. Maeda T, Takahashi K, Ohtsu N, Oguma T, Ohnishi T, Atsumi R, et al. Identification of influx transporter for the quinolone antibacterial agent levofloxacin. *Molecular pharmaceutics*. 2007;4(1):85-94.
224. Zhou Y, Yuan J, Li Z, Wang Z, Cheng D, Du Y, et al. Genetic polymorphisms and function of the organic anion-transporting polypeptide 1A2 and its clinical relevance in drug disposition. *Pharmacology*. 2015;95(3-4):201-8.
225. Glaeser H, Bailey D, Dresser G, Gregor J, Schwarz U, McGrath J, et al. Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2007;81(3):362-70.
226. Cheng X, Maher J, Chen C, Klaassen CD. Tissue distribution and ontogeny of mouse organic anion transporting polypeptides (Oatps). *Drug Metabolism and Disposition*. 2005;33(7):1062-73.
227. Li Y, Revalde J, Paxton JW. The effects of dietary and herbal phytochemicals on drug transporters. *Advanced drug delivery reviews*. 2017;116:45-62.
228. Navrátilová L, Applová L, Horký P, Mladěnka P, Pávek P, Trejtnar F. Interaction of soy isoflavones and their main metabolites with hOATP2B1 transporter. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2018;391(10):1063-71.
229. Fuchikami H, Satoh H, Tsujimoto M, Ohdo S, Ohtani H, Sawada Y. Effects of herbal extracts on the function of human organic anion-transporting polypeptide OATP-B. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2006;34(4):577-82.
230. Haslam IS, Wright JA, O'Reilly DA, Sherlock DJ, Coleman T, Simmons NL. Intestinal ciprofloxacin efflux: the role of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2011;39(12):2321-8.
231. Ando T, Kusuhara H, Merino G, Alvarez AI, Schinkel AH, Sugiyama Y. Involvement of breast cancer resistance protein (ABCG2) in the biliary excretion mechanism of fluoroquinolones. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2007;35(10):1873-9.
232. Álvarez AI, Vallejo F, Barrera B, Merino G, Prieto JG, Tomás-Barberán F, et al. Bioavailability of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in breast cancer resistance protein 1 knockout mice. *Drug metabolism and disposition*. 2011;39(11):2008-12.
233. Perez M, Otero JA, Barrera B, Prieto JG, Merino G, Alvarez AI. Inhibition of ABCG2/BCRP transporter by soy isoflavones genistein and daidzein: effect on plasma and milk levels of danofloxacin in sheep. *The Veterinary Journal*. 2013;196(2):203-8.
234. Yang RZ, Park S, Reagan WJ, Goldstein R, Zhong S, Lawton M, et al. Alanine aminotransferase isoenzymes: molecular cloning and quantitative analysis of tissue expression in rats and serum elevation in liver toxicity. *Hepatology*. 2009;49(2):598-607.
235. Marinković NS, Maličević Ž, Dimitrijević J. Ambient temperature impact on hepatocellular liver damage in rats following intake of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine. *Vojnosanitetski pregled*. 2011;68(7):561-6.
236. Kleiner DE, Chalasani NP, Lee WM, Fontana RJ, Bonkovsky HL, Watkins PB, et al. Hepatic histological findings in suspected drug-induced liver injury: systematic evaluation and clinical associations. *Hepatology*. 2014;59(2):661-70.
237. Geyikoglu F, Emir M, Colak S, Koc K, Turkez H, Bakir M, et al. Effect of oleuropein against chemotherapy drug-induced histological changes, oxidative stress, and DNA damages in rat kidney injury. *Journal of food and drug analysis*. 2017;25(2):447-59.

238. Laddha AP, Murugesan S, Kulkarni YA. In-vivo and in-silico toxicity studies of daidzein: an isoflavone from soy. *Drug and Chemical Toxicology*. 2020;1-9.
239. Auti ST, Kulkarni YA. Acute and 28-day repeated dose oral toxicity study of caraway oil in rats. *Drug Metabolism and Personalized Therapy*. 2019;34(3).
240. Doern CD. When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(12):4124-8.
241. Guideline A. Document M26-A. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1999.
242. Takeshima K, Hidaka T, Wei M, Yokoyama T, Minamisawa K, Mitsui H, et al. Involvement of a novel genistein-inducible multidrug efflux pump of *Bradyrhizobium japonicum* early in the interaction with *Glycine max* (L.) Merr. *Microbes and environments*. 2013;ME13057.
243. Abreu AC, Coqueiro A, Sultan AR, Lemmens N, Kim HK, Verpoorte R, et al. Looking to nature for a new concept in antimicrobial treatments: Isoflavonoids from *Cytisus striatus* as antibiotic adjuvants against MRSA. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-16.
244. Namjilsuren S. The Importance of RND-type Efflux Pumps in the Interactions of *Pseudomonas aeruginosa* with 4-Methoxybenzaldehyde. 2019.
245. Das Kurmi B, Tekchandani P, Paliwal R, Rai Paliwal S. Transdermal drug delivery: opportunities and challenges for controlled delivery of therapeutic agents using nanocarriers. *Current drug metabolism*. 2017;18(5):481-95.
246. Molinuevo JL, Arranz FJ. Impact of transdermal drug delivery on treatment adherence in patients with Alzheimer's disease. *Expert review of neurotherapeutics*. 2012;12(1):31-7.
247. Lewis SJ, Chaijamorn W, Shaw AR, Mueller BA. In silico trials using Monte Carlo simulation to evaluate ciprofloxacin and levofloxacin dosing in critically ill patients receiving prolonged intermittent renal replacement therapy. *Renal Replacement Therapy*. 2016;2(1):45.
248. Cristinacce A, Wright JG, Stone GG, Hammond J, McFadyen L, Raber S. A Retrospective Analysis of Probability of Target Attainment in Community-Acquired Pneumonia: Ceftaroline Fosamil Versus Comparators. *Infectious diseases and therapy*. 2019;8(2):185-98.

8. PRILOZI

Objavljeni radovi u vezi sa temom doktorske disertacije

European Journal of Pharmaceutical Sciences 131 (2019) 230–242



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutical Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejps



Review

Use of microdialysis for the assessment of fluoroquinolone pharmacokinetics in the clinical practice



Ana Tomas^{*}, Nebojša Stilinović, Ana Sabo, Zdenko Tomić

Department of Pharmacology, Toxicology and Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Serbia

ARTICLE INFO

Keywords:

Fluoroquinolones
Microdialysis
Interstitial fluid
Tissue penetration
Pharmacokinetics
Pharmacodynamics

ABSTRACT

Antibacterial drugs, including fluoroquinolones, can exert their therapeutic action only with adequate penetration at the infection site. Multiple factors, such as rate of protein binding, drug liposolubility and organ blood-flow all influence ability of antibiotics to penetrate target tissues. Microdialysis is an *in vivo* sampling technique that has been successfully applied to measure the distribution of fluoroquinolones in the interstitial fluid of different tissues both in animal studies and clinical setting. Tissue concentrations need to be interpreted within the context of the pathogenesis and causative agents implicated in infections. Integration of microdialysis-derived tissue pharmacokinetics with pharmacodynamic data offers crucial information for correlating exposure with antibacterial effect. This review explores these concepts and provides an overview of tissue concentrations of fluoroquinolones derived from microdialysis studies and explores the therapeutic implications of fluoroquinolone distribution at various target tissues.

1. Introduction

Fluoroquinolones are an important class of broad-spectrum antimicrobials commonly used in both outpatient and hospital setting (Shams and Evans, 2005). They display good *in vitro* activity against the pathogens frequently implicated in respiratory, urinary and skin and soft tissue infections, but antibacterial *in vivo* efficacy cannot be predicted solely on this information (Drusano et al., 2004; Zelenitsky et al., 2003a). Traditional interpretation of *in vitro* antibiotic potency was based on correlating this data with plasma antibiotic levels (Wispelwey, 2005). However, majority of infections are located in peripheral tissues, and tissue concentrations may not necessary correspond to plasma concentration in certain patients and tissue compartments (Lagler and Zeitlinger, 2014). Furthermore, emerging antimicrobial resistance increases the chance of clinical failure despite *in vitro* susceptibility (Labreche and Frei, 2012). Improved characterization of fluoroquinolone tissue pharmacokinetics (PK) (Hurtado et al., 2014; Liu et al., 2014; Marchand et al., 2008; Sammeta et al., 2009) and penetration ratios allows for treatment optimization, and precise

information about fluoroquinolone tissue PK is of great importance as drug distribution is frequently nonhomogeneous and tissue specific (Taccone et al., 2016). Tissue pharmacokinetics of antibiotics have been studied in clinical setting using different approaches - indirect modeling of tissue drug levels from plasma drug concentration curves, tissue biopsies, skin blister sampling, microdialysis (Liu and Derendorf, 2003; Mariappan et al., 2013). Various imaging techniques- planar gamma scintigraphy, single photon emission computed tomography, positron emission tomography and magnetic resonance spectroscopy can also be employed to pharmacokinetic studies (Fischman et al., 2002; Langer et al., 2005; Schwameis and Zeitlinger, 2013). These novel images techniques are costly and since radiolabeling of antibiotics was shown to be difficult, a limited number of studies of antibiotic distribution has been conducted using imaging techniques (Schwameis and Zeitlinger, 2013). Common method of taking samples of tissue biopsies and successive quantification in tissue homogenates, produces measures of average concentration over several compartments as tissue homogenate includes drug that is protein bound and unbound, intracellular and extracellular (Edginton et al., 2009; Lorentzen et al., 2000). Majority of

Abbreviations: AUC, area under the concentration-time curve; BCRP, breast cancer resistance protein; CABG, coronary artery bypass grafting; CFU, colony forming units; C_{max} , peak concentration; CPB, cardiopulmonary bypass; CSF, cerebrospinal fluid; ELF, epithelial lining fluid; $fAUC$, free area under the concentration-time curves; ISF, interstitial fluid; MDR-TB, multi-drug resistant tuberculosis; MIC, minimum inhibitory concentration; MRSA, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; MSSA, methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*; OATPs, organic anion transporting polypeptides; OATs, organic anion transporters -transporting polypeptides; OCTs, organic cation transporters; OPCAB, off-pump coronary artery bypass grafting; p.o., *per os*; PD, pharmacodynamics; P-gp, P-glycoprotein; PK, pharmacokinetics; SSI, skin and soft tissue infections; SSI, surgical site infection; tAUC, total area under the concentration-time curve; t_{max} , time to peak concentration

^{*} Corresponding author at: Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Serbia.

E-mail address: ana.tomas@mf.uns.ac.rs (A. Tomas).

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.02.032>

Received 18 October 2018; Received in revised form 22 February 2019; Accepted 22 February 2019

Available online 24 February 2019

0928-0987/ © 2019 Published by Elsevier B.V.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical Sciences

journal homepage: www.jpharmsci.org

Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Drug Transport and Metabolism

Do We Bury Antibacterials When Launching? Cefaclor Example

Zdenko Tomić¹, Ana Tomas^{1,*}, Saša Vukmirović¹, Momir Mikov¹, Olga Horvat¹, Nataša Tomić², Ana Sabo¹¹ Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine Novi Sad, University of Novi Sad, 21000 Novi Sad, Serbia² Institute of Emergency Medicine, Clinical Center of Vojvodina, 21000 Novi Sad, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 September 2015
Revised 10 November 2015
Accepted 1 December 2015
Available online 30 January 2016

Keywords:

formulation
drug design
pharmacokinetics
pharmacodynamics
pharmacokinetics/pharmacodynamics

ABSTRACT

This study aimed to compare existing dosing regimens of cefaclor with recommended pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) parameters and to see if the proposed dosing regimen could have been the reason for development of bacterial resistance. PKs of cefaclor were determined after administering the highest therapeutic dose of 750 mg in standard release (SF) and modified release form (MRF) in 12 volunteers. The study was performed on clinical isolates of the most frequent causative agents in urinary and respiratory infections. Minimum inhibitory concentration (MIC), postantibiotic effect, and PK/PD efficacy indices were determined. Peak plasma concentrations of 23.142 ± 5.67 (SF) and 8.7 ± 2.09 $\mu\text{g/mL}$ (MRF) were observed after 40–60 min and 3.04 ± 0.75 h, respectively. MIC for investigated bacterial strains ranged from 1 to 4 mg/L. Postantibiotic effect lasted from $2.10\text{--}2.18 \pm 0.2$ h for Gram-positive to $0.58\text{--}0.90 \pm 0.05$ h for Gram-negative bacteria. PK/PD indices ($t > \text{MIC}$) ranged from $27.08 \pm 5.93\%$ to $43.23 \pm 6.54\%$ of 8-h dosing interval (SF) and $22.57 \pm 8.93\%$ to $49.65 \pm 1.95\%$ of 12-h dosing interval (MRF). Plasma levels were below MIC for more than 50% of the dosing interval even for the most sensitive pathogens (MIC = 1 mg/L). During both dosing intervals the total “antibacterial activity” was not longer than 6 h for Gram-positive and 5 h for Gram-negative bacteria for SF and 9 h for Gram-positive and 5 h for Gram-negative bacteria for MRF.

© 2016 American Pharmacists Association®. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

In the past, pharmacokinetic (PK) parameters (mainly elimination half-life, peak plasma level) and MIC (minimum inhibitory concentration) of antimicrobial drugs were the only parameters used to optimize dosing intervals. In the last 2 decades it was recognized that pharmacodynamic (PD) parameters—ways of bacterial killing and presence and duration of postantibiotic effect (PAE)—can significantly influence dosing regimens.^{1,2} Numerous studies have demonstrated a link between PK and PD indices with antimicrobial activity and clinical outcomes.^{3–5} Main PK/PD parameters calculated are AUC/MIC (24-h area under the concentration time curve vs. MIC of antibiotic), $C_{\text{max}}/\text{MIC}$ (peak plasma level/MIC), and $t > \text{MIC}$ (time in which the plasma level exceeds the MIC).⁵ The AUC/MIC and $C_{\text{max}}/\text{MIC}$ are important for antibiotics

with mainly concentration-dependent killing, while for antibiotics with predominant time-dependent activity, the portion of dosing interval in which drug levels are higher than the MIC ($t > \text{MIC}$) best correlates with clinical outcome.^{2,5} The time for which concentrations of antibiotics should be above the MIC is different and it depends, in addition to PK parameters and MIC, on the presence and duration of PAE, which allows concentrations of antibiotics in blood to fall below the MIC for certain period of time without clinical consequences.

Cefaclor is the second-generation cephalosporin antibiotic for oral administration with activity against the most prevalent Gram-positive and Gram-negative respiratory and urinary tract pathogens.⁶ Cefaclor is rapidly absorbed from the gastrointestinal tract, with 60%–85% of cefaclor being eliminated unchanged by the kidneys during 8 h after administration.⁷ It has a short half-life of approximately 40 min in patients with regular renal function.⁸ Cefaclor was formerly one of the most commonly used antimicrobials in Serbia, but due to fast development of bacterial resistance other oral cephalosporins rapidly upstaged cefaclor and finally cefaclor was removed from the list of the drugs reimbursed by the Health Fund of Serbia. Possible cause of the high resistance rates

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

* Correspondence to: Ana Tomas (Telephone: +381-21-522-172; Fax: +381-21-6615-771).

E-mail address: anaaa_tomas@yahoo.com (A. Tomas).<http://dx.doi.org/10.1016/j.xphs.2015.12.003>

0022-3549/© 2016 American Pharmacists Association®. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.



Pharmacokinetic/pharmacodynamic based dosing of ciprofloxacin in complicated urinary tract infections

Ana Sabo¹, Ana Tomas¹, Nataša Tomić², Momir Mikov¹, Olga Horvat¹, Radmila Popović¹ and Zdenko Tomić¹

¹Department of Pharmacology, Toxicology and Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Serbia; ²Institute of Emergency medicine, Clinical Centre of Vojvodina, Novi Sad, Serbia.

Article Info

Received: 10 June 2015
Accepted: 17 June 2015
Available Online: 12 July 2015
DOI: 10.3329/bjpv.v10i3.23604

Cite this article:

Tomas A, Tomić N, Popović R, Mikov M, Horvat O, Sabo A, Tomić Z. Pharmacokinetic/pharmacodynamic based dosing of ciprofloxacin in complicated urinary tract infections. *Bangladesh J Pharmacol*. 2015; 10: 621-26.

Abstract

Ciprofloxacin is often used in treatment of complicated urinary tract infections in areas with high rates of resistance to first line agents. The aim of this study was to evaluate efficacy of ciprofloxacin in standard dosing regimens in treatment of complicated urinary tract infections. Plasma concentration curves were simulated and minimum inhibitory concentration (MIC) and post-antibiotic effect were determined. Ciprofloxacin MIC ranged from 0.0156 for Gram-negative and to 0.125-0.5 µg/mL for Gram-positive bacteria. Both dosing regimens were suitable for eradication of Gram-negative bacteria, with slight supremacy of 750 mg/12 hours over 500 mg/12 hours dosing regimen. Even though all strains were fully susceptible to ciprofloxacin, pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters did not meet target thresholds for pathogens with MIC over 0.1-0.2 µg/mL regardless of the administered dose. Ciprofloxacin remains an excellent choice for treatment of complicated urinary tract infections caused by Gram-negative bacteria, but in infection caused by Gram-positive strains, deeper analysis is necessary in order to achieve optimal results.

Introduction

Urinary tract infections are among the most common community bacterial infections. Urinary tract infections with involvement of upper urinary tract portions, occurring in patients with underlying diseases (diabetes mellitus, immunosuppression) (Krcmery and Naber, 1999) or structural abnormalities of urinary tract are classified as complicated urinary tract infections (Nicolle, 2005). Ciprofloxacin and other fluoroquinolones have become a popular treatment option for patients with complicated urinary tract infections in areas with higher rates of resistance to traditionally used antibacterial agents such as trimethoprim-sulfamethoxazole and aminopenicillins (Van Bambeke et al., 2005; Finch, 2000). However, excessive use of ciprofloxacin that has led to a considerable and worrying increase in the rate of resistant isolates

(Daoud et al., 2014) which raises a question of adequacy of current dosing strategies. The outcome of antibiotic treatment depends on several complex inter-actions between the infectious agent, antimicrobial drug and host defense mechanisms, and treatment outcome shows high variability of the dose-response relationship (Jacobs, 2001; Wilspeilwey, 2005). For the optimal clinical outcome, high concentrations at the site of the infection are critical for fluoroquinolones (Drussano et al., 2004). This is reflected in the peak concentration and area under the concentration-time curve being the main pharmacokinetic parameters taken into account when discussing efficacy indices for ciprofloxacin (Mueller et al., 2004). In past decades, the importance of pharmacodynamic parameters- mainly mechanism of bacterial eradication and postantibiotic effect has also been recognized and an answer to complexity of antibiotic-microorganism interaction has been found in a quanti-

P 24 - Significance of mutant selection window and mutant prevention concentration concepts: a review

Ana Tomas¹, Milica Paut Kusturica¹, Zdenko Tomić¹, Olga Horvat¹, Marko Milović²,
Jovana Trifunović¹, Ana Sabo¹

¹Department of Pharmacology, Toxicology and Clinical Pharmacology, Faculty of
Medicine, University of Novi Sad, Serbia

²Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Serbia

Abstract

The mutant selection window (MSW) concept offers knowledge of relationship between antibacterial pharmacodynamics and resistance development which is crucial for optimizing the use of existing antibacterial agents. It is based on a novel pharmacodynamic measure of antibiotic potency – the mutant prevention concentration (MPC). This review aimed to explore these concepts with a special regard to their clinical applicability. A literature search (–2015) using keywords 'mutant prevention concentration' or 'mutant selection window' and 'antibiotic' or 'antibiotics' or 'antibacterial' of PubMed database was conducted. Search yielded 450 results, after checking the titles, and 181 abstracts, 84 articles were assessed in full text. The concept of MSW was first reported in 1999 in relation to fluoroquinolones. Within a susceptible wild-type population, a fraction of bacterial cells is not affected when subjected to an antibiotic. This subpopulation carries mutations that inhibit antimicrobial action, allowing their selection during clinical treatment. Multiplication of this resistant subpopulation occurs in a range of concentration (MSW) between the MIC of the susceptible cells, and the mutant prevention concentration (MPC). MPC represents a concentration of antibiotic that prevents the development of first-step resistant mutants - the MIC of the least drug-susceptible mutant subpopulation. Multiple *in vitro* studies that monitored the increase in MIC after bacterial exposure to different concentrations of antibiotics, confirmed that resistant mutants are selectively enriched when antibiotic concentrations remain within MSW. Besides fluoroquinolones, this hypothesis has been tested for other classes of antibacterial agents such as polymyxins, macrolides, aminoglycosides and beta-lactams *in vitro*. MSW has been widely confirmed *in vitro*, but not all generated data agree with the results attained *in vivo* (i.e. fosfomicin). The mutant selection window concept is definitely relevant for fluoroquinolones based on *in vitro* and *in vivo* experiments, but further research is necessary to determine the applicability of MSW *in vivo* for other antibacterial groups. For fluoroquinolones, MSW determined *in vitro* can be a reliable tool for guiding the optimization of antimicrobial treatment regimens for suppression of the selection of antimicrobial resistance, and clinical implementation of selection window dosing strategy is feasible.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Science and Technological Development, Republic of Serbia, project No. 41012

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укорицити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Одређивање ткивне фармакокинетице левофлоксацина и даидзеина применом микродијализне методе
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
Универзитет у Новом Саду, Медицински факултет Нови Сад
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Докторске студије клиничке медицине
1. Опис података
1.1 Врста студије
Докторска дисертација
1.2 Врсте података
а) <u>квантитативни</u>
б) <u>квалитативни</u>
1.3. Начин прикупљања података
а) анкете, упитници, тестови
б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи
в) генотипови: навести врсту _____
г) административни подаци: навести врсту _____
д) узорци ткива: парафински калупи узорака ткива јетре и бубрега пацова соја Wistar
ђ) снимци, фотографије: фотографије патохистолошких препарата јетре и бубрега бојених стандардном методом хематоксилин - еозин (HE)
е) текст: литературни изводи
ж) мапа, навести врсту _____

з) остало: **експериментална испитивања**

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

- a) Excel фајл, датотека ____**.xls**_____
- b) SPSS фајл, датотека ____**.sav**_____
- c) PDF фајл, датотека _____
- d) Текст фајл, датотека ____**.docx**_____
- e) JPG фајл, датотека ____**.jpg**_____
- f) Остало, датотека _____

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- a) број варијабли **велики број**
- б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) **велики број**

1.3.3. Поновљена мерења

a) да

б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- a) временски размак између поновљених мера је _____
- б) варијабле које се више пута мере односе се на _____
- в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као _____

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, **Експерименти на лабораторијским животињама, анализа концентрација испитиваних ксенобиотика применом течне хроматографије под високим притиском, анализа биохемијских параметара у серуму животиња применом спектрофотометријских метода, хистолошко испитивање узорака ткива, одређивање осетљивости бактерија на испитиване ксенобиотике.**

б) корелационо истраживање, навести тип _____

ц) анализа текста, навести тип **Прикупљање података анализом доступне литературе.**

д) остало, навести шта _____

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) Колики је број недостајућих података? _____

б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да **Не**

в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података контролисан је применом различитих статистичких метода и поређењем са литературним подацима.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Упоредом добијених података са литературним подацима.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Репозиторијуму Универзитета у Новом Саду.

3.1.2. URL адреса <https://cris.uns.ac.rs/searchDissertations.jsf>

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

- a) Да
- б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____
- в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

3.2. Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? **трајно**

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да **Не**

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да **Не**

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да **Не**

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да **Не**

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

Пошто експерименти укључују истраживања на огледним животињама, истраживање је одобрено од стране Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Универзитета у Новом Саду, 20.12.2016.

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да **Не**

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

а) Подаци нису у отвореном приступу

б) Подаци су анонимизирани

ц) Остало, навести шта

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство – некомерцијално – без прераде

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Ана Томас Петровић ana.tomas@mf.uns.ac.rs

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Ана Томас Петровић ana.tomas@mf.uns.ac.rs

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Ана Томас Петровић ana.tomas@mf.uns.ac.rs