



UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET



Uticaj žučnih kiselina na bioraspoloživost makrolidnih antibiotika

– doktorska disertacija –

Mentor:
Doc. dr Svetlana Goločorbin-Kon

Kandidat:
Jovana Trifunović

Novi Sad, 2016.

UNIVERZITET U NOVOM SADU

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

REDNI BROJ:
RBR
Identifikacioni broj:
IBR
Tip dokumentacije: TD
Monografska dokumentacija
Tekstualni štampani materijal
Tip zapisa: TZ
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): Doktorska disertacija
VR
Ime i prezime autora: Jovana Trifunović
AU
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): Mentor: Doc. dr Svetlana Goločorbin
MN
Naslov rada: Uticaj žučnih kiselina na
NR bioraspoloživost makrolidnih
antibiotika
Jezik publikacije: Srpski / latinica
JP
Jezik izvoda: Srpski / eng
J
Zemlja publikovanja: Srbija
ZP
Uže geografsko područje: Autonomna pokrajna Vojvodine
UGP
Godina: 2016.
GO
Izdavač: autorski reprint
IZ
Mesto i adresa: Srbija, Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
MA
Fizički opis rada: 6 poglavlja / 101 strane / 33 slike / 11

FO	grafikona / 33 tabele/ 99 referenci /
Naučna oblast: NO	Farmakologija, farmacija
Naučna disciplina: ND	Farmakokinetika, medicinska hemija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Makrolidi; Žučne kiseline i soli; Propustljivost ćelijskih membrana; Magnetno-rezonantna spektroskopija; Anti-bakterijski lekovi; Micele; Farmakokinetika; Eksperimentalni životinjski modeli
UDK	615.33.033:547.93
Čuva se: ČU	U biblioteci Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, 21000 Novi Sad, Srbija, Hajduk Veljkova 3
Važna napomena: VN	

Izvod:

IZ

Uvod:

U prošlosti žučne kiseline su uglavnom razmatrane sa stanovišta njihove funkcije koju obavljaju u crevima jer posreduju u varenju masti i apsorpciji liposolubilnih vitamina. Nedavne studije potvrđuju da žučne kiseline ne igraju samo ulogu u varenju masti, nego se ponašaju i kao signalni molekuli koji stupaju u interakciju sa raznim receptorima uključujući nuklearne receptore i receptore vezane za G-proteine. Kao amfipatični molekuli one su sposobne da reaguju sa fosfolipidima ćelijskih membrana i da poboljšavaju prolazak lekova kroz njih. Stoga se žučne kiseline razmatraju kao promoteri u bukalnim, okularnim i nazalnim farmaceutskim formulacijama.

Cilj:

Svrha ovog istraživanja je bila da se ispituju žučne kiseline i njihovi okso derivati kao jedinjenja koja utiču na propustljivost ćelijskih membrana i prolazak lekova do ciljnih tkiva.

Materijal i metod:

Interakcije makrolidnih antibiotika i žučnih kiselina su ispitivane uz pomoć NMR difuzionih merenja i relaksacije paramagnetičnim jonima. Retencioni parametri odabranih žučnih kiselina su dobijeni korišćenjem hromatografije na normalnim fazama i evaluisani su primenom pet različitih softvera. In vivo ekaperimenti su sprovedeni na 126 eksperimentalnih životinja koje su bile podeljene u 21 grupu.

Rezultati:

Vezivanje žučnih kiselina za micelle je indikovano razlikama u hemijskom pomeranju makrolida i proširenju signala kao posledica redukovane mobilnosti unutar micela. Dodatak micela žučnih kiselina povećava solubilizaciju makrolida za faktor približno 2-3. Sprovedena korelaciona analiza pokazala je značajnu zavisnost između faktora retencije i intestinalne apsorpcije, prodora u MDCK epitelne ćelije, permeabilnost kroz kožu, logBB i PPB%. Putem implementacije in vivo eksperimentalnog dela pokazano je da žučne kiseline utiču na prolazak makrolida u tkivo mozga, bubrega i jetre.

Zaključak:

Ispitivane žučne kiseline pokazuju dobre farmakokinetičke karakteristike i olakšavaju prolazak makrolida kroz različite ćelijske membrane.

Datum prihvatanja teme od strane

05.06.2014. godine

NN veća:

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

(ime i prezime / titula / zvanje /
naziv organizacije / status)

KO

Predsednik komisije: Prof. dr
Velibor Vasović, Medicinski fakultet
Novi Sad, Katedra za farmakologiju,
toksikologiju i kliničku farmakologiju,
redovni profesor

član: Prof. dr Karmen Stankov,
Medicinski fakultet Novi Sad, Katedra
za biohemiju, vanredni profesor

član: Prof. dr Silva Dobrić,
Vojnomedicinska akademija Beograd,
načelnik instituta za naučne
informacije, redovni profesor

član: Doc. dr Saša Vukmirović,
Medicinski fakultet Novi Sad, Katedra
za farmakologiju, toksikologiju i
kliničku farmakologiju, docent

član: Doc. dr Nebojša Stilinović,
Medicinski fakultet Novi Sad, Katedra
za farmakologiju, toksikologiju i
kliničku farmakologiju, docent

UNIVERSITY OF NOVI SAD

ACIMSI

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number:
ANO
Identification number:
INO
Document type: Monograph documentation
DT
Type of record: Textual printed material
TR
Contents code: Ph.D. Thesis
CC
Author: Jovana Trifunović
AU
Mentor: Assistant Professor Svetlana
MN Goločorbin Kon
Title: The effects of bile acids on macrolide
TI antibiotics bioavailability
Language of text: Serbian (Roman) (scr)
LT
Language of abstract: English
LA
Country of publication: Serbia
CP
Locality of publication: The Autonomous Province Of
LP Vojvodina

Publication year: 2016
PY
Publisher: Author reprint
PU
Publication place: 21000 Novi Sad, Serbia, Hajduk
PP Veljkova 3

Physical description:
PD 6 chapters / 101 pages / 33 pictures/ 11
schemes / 33
tables / 99 references

Scientific field
SF Pharmacology, pharmacy

Scientific discipline
SD Pharmacokinetics. Medicinal
chemistry

Subject, Key words
SKW Macrolides; Bile Acids and Salts; Cell
Membrane Permeability; Magnetic
Resonance Spectroscopy; Anti-
Bacterial Agents; Micelles;
Pharmacokinetics; Models, Animal

UC 615.33.033:547.93

Holding data:
HD Library of Medical Faculty Novi Sad
21000 Novi Sad, Serbia, Hjuk
Veljkova 3

Note:

Abstract

AB

Introduction:

In the past, bile acids were mostly considered to function in the intestine where they play a role in digestion of fats and mediate absorption of fat-soluble vitamins. Recent studies confirm that bile acids not only facilitate solubilization of fats but behave as signal molecules that interact with various receptors including nuclear receptors and G protein-coupled receptors. As amphipathic molecules they are able to interact with phospholipids of cells membranes and enhance drugs permeation. Thus, bile acids are considered as drug promoters in buccal, ocular, nasal, and transdermal dosage forms.

Purpose:

The purpose of this research was to investigate bile acids and its oxo derivatives as enhancers in drug permeability. Three research methods to evaluate the characteristics of bile acids and its properties were used.

Material and method:

The interaction between macrolide antibiotics and bile acids was investigated by NMR chemical-shift titration, self-diffusion measurements and paramagnetic relaxation enhancements. Retention parameters of selected bile acids are acquired by normal-phase thin layer chromatography and evaluated using five different softwares. In vivo experiments were conducted on 126 animals which were divided in 21 groups.

Results:

Binding bile acids to the micelles is indicated by differences in the chemical shift of the macrolides and line broadening as a consequence of reduced mobility in the micelle. Addition of bile micelles increases the solubility of macrolide antibiotics by a factor of approximately 2–3. Examined correlation analysis confirmed significant dependence between retention factor and intestinal absorption, MDCK epithelial cells, skin permeability, logBB and PPB%. Through the implementation of in vivo experiments it is shown that bile acids promote penetration of macrolides in brain tissue, kidney and liver.

Conclusion:

Investigated bile acids showed good pharmacokinetic properties and facilitate in macrolides permeation through various membranes.

Accepted on Scientific Board on:AS

Defended: DE

Thesis Defend Board:

DB

The Fifth of June 2014

President: Professor Velibor Vasović,
Medical Faculty Novi Sad, Department
of Pharmacology, Toxicology and
Clinical Pharmacology, Full Professor

member: Professor Karmen Stankov,
Medical Faculty Novi Sad, Department
of Biochemistry , Associate professor

member: Professor Silva Dobrić,
Military Medical Academy Belgrade,
Director of Institute for scientific
Information, Full Professor

member: Professor Saša Vukmirović,
Medical Faculty Novi Sad, Department
of Pharmacology, Toxicology and
Clinical Pharmacology, Assistant
professor

member: Professor Nebojša
Stilinović, Medical Faculty Novi Sad,
Department of Pharmacology,
Toxicology and Clinical
Pharmacology, Assistant professor

Reč autora

Ova doktorska disertacija je urađena u okviru projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj republike Srbije "Interakcije ksenobiotika i uticaj na sisteme u biomedicini" III41012 kojim rukovodi Prof. dr Momir Mikov. Ovim putem se zahvaljujem Prof. Mikovu na izuzetnoj pomoći tokom izrade ove doktorske disertacije.

Takođe, zahvaljujem se i mojoj mentorki Doc. dr Svetlani Goločorbin-Kon na izuzetnim savetima i sugestijama kojima je doprinela da ova doktorska disertacija dobije svoj konačan oblik. Veliku zahvalnost dugujem i Doc. dr Saši Vukmiroviću na pomoći prilikom izvođenja LC-MS analiza i značajnim savetima koji su pomogli prilikom pisanja doktorske disertacije. Dugujem zahvalnost članovima komisije za ocenu doktorske disertacije na čelu sa Prof. Veliborom Vasovićem kao predsednikom, koji su detaljnim pregledom rukopisa i unetim korekcijama poboljšali sadržaj ove teze. Zahvalila bih se Katedri za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju u okviru koje je urađen najveći deo ovog rada, kao i svim njenim članovima na velikoj podršci tokom izrade. Posebnu zahvalnost dugujem Milici i Ani na angažovanju i pomoći u toku pisanja disertacije. Takođe, bih se zahvalila Prof. Klausu Zanggeru iz NMR laboratorije Karl-Franzens Univerziteta u Gracu gde su urađene sve NMR analize. Zahvalila bih se i laborantu Slavenu Šuputu na tehničkoj pomoći prilikom izvođenja eksperimenata na laboratorijskim životinjama.

Posebna čast i veliko zadovoljstvo mi je da se zahvalim članovima moje porodice, naročito Dr Radinki Trifunović na tehničkoj i moralnoj podršci prilikom izvođenja in vivo eksperimenatalnog dela, kao i mojoj sestri i mom vereniku.

Jovana Trifunović

Skraćenice

ASBT-apiklani natrijum zavisni transporter žučnih soli

BSEPT-pumpa za izbacivanje žučnih soli

CMC-kritična micelarna koncentracija

12MKH-3 β -hidroksi-12-keto-5 β -holanska kiselina

CNS-centralni nervni sistem

FDA-Food and Drug Administration, Američka agencija za hranu i lekove

HIA-humana intestinalna apsorpcija

KMB-krvno-moždana barijera

logBB-logaritam prolaska leka kroz krvno-moždanu barijeru

MDCK- Madin Darby Canine Kidney/kulture ćelija epitela

MIK-minimalna inhibitorna koncentracija

Mw-molekulska masa

NMR-nuklearna magnetna rezonanca

NTCP-natrijum zavisni tauriholat kotransportni polipeptid

OATP-natrijum nezavisni organski anjonski transporter

PPB%-procenat vezivanja za proteine plazme

r-RNA-ribosomalna ribonukleinska kiselina

TKA-3,7,12-triketo-5 β -holanska kiselina

TPSA-ukupna površina polarnih grupa molekula

V-volumen molekula

SADRŽAJ

1. UVOD	4
1.1. Razlozi za modifikovanje biorasploživosti makrolidnih antibiotika	4
1.2. Makrolidni antibiotici.....	4
1.3. Farmakokinetika resorpcije makrolidnih antibiotika.....	6
1.4. Neželjena delovanja i toksičnost makrolida.....	6
1.5. Hemijska struktura i svojstva eritromicina.....	7
1.6. Hemijska struktura i svojstva azitromicina	8
1.7. Hemijska struktura i svojstva klaritromicina.....	9
1.8. Linkozamini.....	10
1.8.1. Mehanizam dejstva linkozamina	10
1.8.2. Antibakterijski spektar linkozamina	10
1.8.3. Uzroci pojave rezistencije na linkozamine	11
1.8.4. Farmakokinetika linkozamina	11
1.8.5. Neželjena delovanja linkozamina	11
1.8.6. Terapijska primena linkozamina	11
1.9. Žučne kiseline i njihove soli.....	12
1.10. Micele žučnih soli	14
1.11. Hemijske reakcije oksidacije žučnih kiselina.....	15
1.12. Transporteri žučnih soli.....	16
1.13. Sinteza 3 β -hidroksi-12-keto-5 β -holanske kiseline.....	18
1.14. Sinteza 3,7,12-triketo-5 β -holanske kiseline	19
1.15. Biološke membrane	20
1.16. Čelijska membrana	20
1.17. Resorpcija lekova iz digestivnog trakta.....	21
1.18. Krvno-moždana barijera.....	21
1.19. <i>In silico</i> karakterizacija odabranih derivata žučnih kiselina.....	23
1.20. Molekulski deskriptori	24
1.20.1. Particioni koeficijent	25
1.20.2. Deskriptori intestinalne apsorpcije	26

1.20.3. Deskriptori distribucije (volumen distribucije, vezivanje za proteine plazme i koeficijent raspodele između krvi i mozga (logBB))	26
2. Ciljevi ISTRAŽIVANJA.....	29
2.1. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....	29
3. Materijali i metode	30
3.1. <i>In vitro</i> eksperimentalni deo.....	30
3.2. Nuklearno-magnetne (NMR) spektroskopske analize.....	30
3.2.1. Priprema rastvora za NMR.....	30
3.2.2. Snimanje NMR spektara.....	31
3.2.3. Određivanje molekularne lipofilnosti putem tankoslojne hromatografije.....	31
3.3. <i>In vivo</i> eksperimentalni deo.....	32
3.4. Plan istraživanja	32
3.5. Pripremanje rastvora klindamicina i eritromicina	36
3.6. Pripremanje rastvora žučnih soli	36
3.7. Prikupljanje uzoraka za analizu.....	36
3.7.1. Prikupljanje uzoraka krvi	37
3.7.2. Prikupljanje uzoraka moždanog tkiva	37
3.8. Tečno-masena spektrometrija (LC-MS).....	37
3.9. Priprema kolone za analitičku proceduru	38
3.10. LC-MS analitička procedura korišćena u toku analize koncentracije eritromicina u tkivima jetre, bubrega i mozga	38
3.11. LC-MS analitička procedura korišćena u toku analize koncentracije klindamicina u tkivima jetre, bubrega i mozga	38
3.12. Priprema uzoraka jetre, bubrega i mozga za LC-MS analize	38
3.13. Priprema uzoraka seruma za LC-MS analize	39
3.14. Podešavanje sastava mobilne faze.....	39
4. Rezultati	41
4.1. Vezivanje makrolidnih antibiotika za micelle žučnih soli.....	41
4.2. Poređenje vrednosti difuzionog koeficijenta ispitivanih makrolidnih antibiotika.....	44
4.3. Vrednosti parametara molekularne lipofilnosti dobijenih primenom normalno-fazne tankoslojne hromatografije (NP TLC).....	47
4.4. <i>In silico</i> vrednosti podeonog koeficijenta i korelacije njihovih vrednosti sa vrednostima retencionih konstanti R_m^0 i b	48
4.5. Određivanje vrednosti parametara pravila po Lipinskom	52
4.6. Vrednosti farmakokinetičkih deskriptora utvrđenih <i>in silico</i> i njihova korelacija sa retencionim parametrima.....	52

4.7. Vrednosti nivoa eritromicina u krvi nakon <i>intra-arterijske</i>	56
aplikacije leka.....	56
4.8. Vrednosti nivoa eritromicina u krvi nakon <i>intra-venske</i> aplikacije leka.....	57
4.9. Vrednosti nivoa eritromicina u krvi nakon <i>per os</i> primene leka	59
4.10. Vrednosti nivoa klindamicin u krvi nakon <i>intra-arterijske</i> primene leka	61
4.11. Vrednosti nivoa klindamicina u krvi nakon <i>intra-venske</i> primene leka.....	63
4.12. Vrednosti nivoa klindamicina u krvi nakon <i>per os</i> primene leka.....	64
4.13. Koncentracije eritromicina u moždanom tkivu nakon <i>intra-arterijske</i> primene leka	66
4.14. Koncentracije eritromicina u moždanom tkivu nakon <i>intra-venske</i> primene leka	68
4.15. Koncentracije eritromicina u moždanom tkivu nakon <i>per os</i> primene leka.....	69
4.16. Koncentracije klindamicina u moždanom tkivu nakon <i>intra-arterijske</i> primene leka	71
4.17. Koncentracije klindamicina u moždanom tkivu nakon <i>intra-venske</i> primene leka.....	72
4.18. Koncentracije klindamicina u moždanom tkivu nakon <i>per os</i> primene leka.....	73
4.19. Koncentracije eritromicina u tkivu bubrega nakon <i>intra-arterijske</i> aplikacije leka	75
4.20. Koncentracije eritromicina u tkivu bubrega nakon <i>intra-venske</i> aplikacije leka.....	76
4.21. Koncentracije eritromicina u tkivu bubrega nakon <i>per os</i> aplikacije leka	77
4.22. Koncentracije eritromicina u tkivu jetre nakon <i>intra-arterijske</i> aplikacije leka.....	77
4.23. Koncentracije eritromicina u tkivu jetre nakon <i>intra-venske</i> aplikacije leka	78
4.24. Koncentracije eritromicina u tkivu jetre nakon <i>per os</i> aplikacije leka	78
5. Diskusija.....	79
5.1. Interakcija makrolidnih antibiotika sa žučnim solima ispitivana u <i>in vitro</i> eksperimentalnim uslovima	79
5.2. Određivanje farmakokinetičkih parametara odabranih žučnih kiselina <i>in silico</i> metodama	81
5.3. Uticaj odabranih derivata žučnih soli na transport eritromicina i klindamicina u <i>in vivo</i> eksperimentalnim uslovima.....	85
5.4. Uticaj odabranih derivata žučnih soli na vrednosti eritromicina i klindamicina u moždanom tkivu, bubrezima i jetri	86
6. Zaključci.....	90
7. LITERATURA.....	92

1. UVOD

1.1. Razlozi za modifikovanje bioraspoloživosti makrolidnih antibiotika

Makrolidni antibiotici dugi niz godina predstavljaju predmet intenzivnih hemijskih, analitičkih i farmakoloških proučavanja u cilju produbljivanja znanja o efikasnosti njihovog delovanja, a time i proširenju aspekata antimikrobnih i farmakokinetičkih parametara. S obzirom na sve veću učestalost pojave rezistencije na antibiotike postalo je od izuzetnog značaja važno modifikovanje svojstava postojećih antibiotika sa ciljem da se obezbedi bolja distribucija molekula u ciljna tkiva i organe. Soli žučnih kiselina kao jedinjenja koja učestvuju u emulgaciji masti i apsorpciji liposolubilnih vitamina u određenim koncentracijama mogu značajno da utiču na propustljivost ćelijske membrane i poboljšaju ulazak ksenobiotika u tkiva i organe. U ovom radu se analizira uticaj odabranih derivata žučnih soli na bioraspoloživost eritromicina i klindamicina na životinjskom modelu sa posebnim osvrtom na distribuciju ovih antibiotika u tkiva jetre, bubrega i mozga. Eksperimentalnom *in vivo* delu istraživanja prethodio je deo u kojem se u *in vitro* uslovima najpre testirao uticaj žučnih soli na povećanje difuzionog koeficijenta makrolidnih antibiotika sa ciljem da se izabere najpogodniji životinjski model i dobiju najpouzdaniji podaci u vezi sa ovom tematikom.

1.2. Makrolidni antibiotici

Makrolidni antibiotici pripadaju klasi prirodnih proizvoda, poliketida. Osnovu njihove strukture čini makrociklični laktonski prsten sa 14 do 16 ugljenikovih atoma koji je odgovoran za antibiotsko delovanje, a za koji je najčešće vezan jedan ili više dezoksi šećera kao što su kladinoza i dezosamin.

U grupu makrolidnih antibiotika odobrenih za upotrebu od strane FDA (Američka agencija za hranu i lekove-Food and Drug Administration) spadaju:

- Azitromicin
- Klaritromicin
- Eritromicin

- Roksitromicin
- Telitromicin
- Dritomicin

Grupi makrolida prema hemijskoj strukturi pripadaju i takrolimus, pimekrolimus, i sirolimus koji ne poseduju antibiotsko dejstvo, ali se koriste kao imunomodulatori i imaju aktivnost sličnu kao ciklosporin.

Mehanizam delovanja makrolida je inhibicija sinteze proteina u bakterijama vezivanjem za bakterijsku 50S subjedinicu ribozoma. To se ostvaruje tako što se makrolidi upliću u translokaciju peptidil-transportne ribonukleinske kiseline na ribozomima i time zaustavljaju sintezu proteina u bakterijskim ćelijama što na kraju dovodi do njihove smrti. Njihovo dejstvo može biti baktericidno ili bakteriostatsko, što zavisi od koncentracije leka i tipa mikroorganizama (*Nie et al. 2014*).

Zbog sličnog antibakterijskog spektra sa prirodnim penicilinima primena makrolidnih antibiotika se svodi na tretiranje infekcija uzrokovanih Gram pozitivnim bakterijama kao sto su: *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium diphtheriae* i *Listeria monocytogenes*. Takođe, ispoljavaju delovanje i na Gram negativne koke kao sto su *Neisseria meningitidis* i *Neisseria gonorrhoeae*, Gram negativne aerobne bacile *Pasteurella multocida*, *Bordetella pertussis*, *Legionella sp.* i *Campylobacter sp.* Makrolidi deluju antibiotski i na sojeve mikoplazme, borelije i hlamidija dok na *Haemophilus influenzae*, *Ureplasma sp.* i *Toxoplasma sp.* deluju klaritromicin i azitromicin (*Skalasky et al. 2013; Asadi et al. 2012*).

Rezistencija na makrolidne antibiotike se razlikuje u različitim regionima sveta, ali se ona stalno povećava. Rezistentnost *Streptococcus pneumoniae* se označava kao veoma visoka 96% u Aziji, približno 30-40% u Sjedinjenim Američkim Državama i 16% u Kanadi. Rezistentnost *Mycoplasma pneumoniae* postaje viša od 80% prema jednoj kineskoj studiji. Procene američkih studija o rezistenciji *M. pneumoniae* su značajno niže približno za 10%. Nivo rezistencije *H. Influenzae* i *M. Catarrhalis* je čak niži od 1.3 i 0.5% za svaki patogen na osnovu američkih izveštaja iz 2008-2010. godine. Rezistentni mikroorganizmi umanjuju ulazak makrolida u ćelije i izazivaju promene na ribozomima pod uticajem enzima metilaze koji sprečavaju vezivanje leka, dok enterobakterije hidrolizuju makrolide esterazama.

Rezistencija se razvija relativno sporo i može biti potpuna ili delimična-ukrštena rezistencija (*Hackel et al. 2013*).

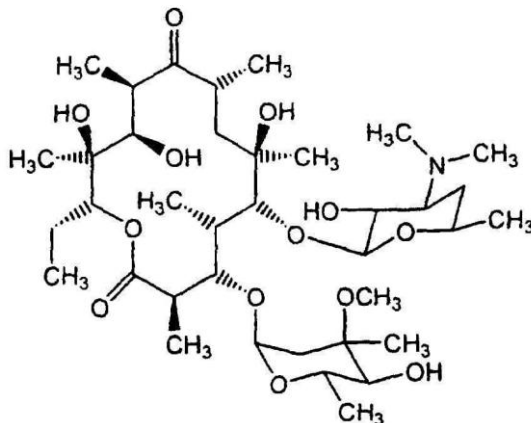
1.3. Farmakokinetika resorpcije makrolidnih antibiotika

Makrolidni antibiotici koji su namenjeni za peroralnu primenu nalaze se u formi svojih soli ili estara. Najopsežnije se resorbuju iz tankog creva, a najviše koncentracije se postižu u serumu u toku 1-2 h od momenta primene što u većini slučajeva zavisi od prisustva hrane u crevima ili od oblika leka koji je primenjen. Nakon *intra muskularne* i *supkutane* primene resorpcija je brza, ali je mesto aplikacije često bolno i otečeno. Više od 75% doze se vezuje za proteine plazme (α -kisele proteine). U tkiva se brzo i dobro raspodeljuju, a koncentracije u jetri, plućima i bubrezima su nakon 2h od momenta primene znatno više nego u serumu. Makrolidi se nakupljaju u mnogim ćelijama uključujući i makrofage (do 20 puta više koncentracije od onih u plazmi), što uzrokuje i dugačak dozni interval. U plućima je koncentracija makrolida 3-5 puta viša od onih u plazmi zbog čega se infekcije disajnih puteva mogu lečiti dozama ispod MIK (minimalna inhibitorna koncentracija) u serumu. Makrolidi prelaze u pleuralnu i peritonealnu tečnost, a kroz krvno-moždanu barijeru samo u toku upale (2-13%). Prolaze i kroz posteljicu pa se mogu dokazati u krvotoku ploda. Biotransformacija makrolidnih antibiotika se uglavnom opsežno odvija u jetri. Nakon *per os* primene oko 80% eritromicina podleže metaboličkoj inaktivaciji. Makrolidni antibiotici i njihovi metaboliti se uglavnom izlučuju putem žuči (više od 60%) i često podležu enterohepatičkoj recirkulaciji. Putem urina se izlučuju u koncentraciji manjoj od 10%. Opsežno se izlučuju i putem mleka usled čega se ne preporučuju tokom dojenja.

1.4. Neželjena delovanja i toksičnost makrolida

Prilikom *intra muskularne* aplikacije mogu se javiti otekline, crvenilo i svrab na mestu primene. Histološki posmatrano dolazi do seroznih infiltracija, oštećenja mišićnih ćelija i produkcije vezivnog tkiva. Pojedini preparati za paranteralnu primenu (eritromicin) često sadrže i lokalni anestetik. Reakcije preosetljivosti primećene su pri lokalnoj i sistemske primeni, a poznata su i toksična oštećenja jetre (holeostatsku žuticu izaziva eritromicin) (*Sabo et al. 2014; McFarlane A et al. 2015; Arancibia et al. 2000*).

1.5. Hemijska struktura i svojstva eritromicina



Slika 1.5.1. Hemijska struktura eritromicina

Izvor: nacrtano u ChemBioDraw Ultra14.0

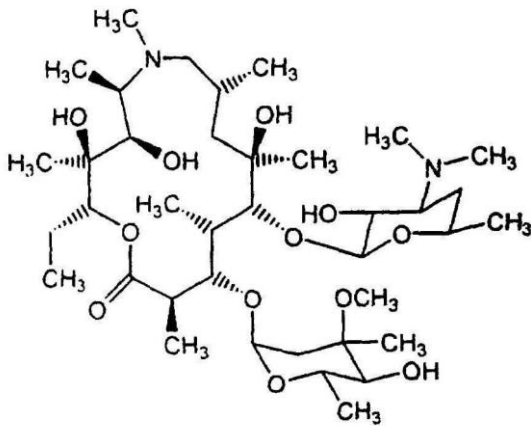
Prvi predstavnik grupe makrolidnih antibiotika je eritromicin, otkriven 1952. godine. Dobija se mikrobiološkim postupkom ekstrakcije od kulture gljivice *Streptomyces Erythreus*.

U upotrebi se nalazi u formi njegovih estara i to: estolata, etilsukcinata i stearata. Estri eritromicina su acidorezistentni i dobro se resorbuju iz digestivnog trakta, ne prodiru u CNS (centralni nervni sistem) i koncentrišu se u fagocitima u koncentracijama 30-50 puta višim nego u plazmi. Poluvreme eliminacije ovog antibiotika iznosi 2h, najvećim delom se metaboliše u jetri, a izlučuje se putem žuči. Antimikrobni spektar eritromicina veoma je sličan penicilinu i dokazana je njegova efikasnost i bezbednost kao zamene, kod pacijenata osetljivih na penicilin (Sabo et al. 2014).

Koristi se kod sledećih infekcija:

- infekcija respiratornog sistema;
- infekcija kože i potkožnog tkiva
- konjunktivitisa kod novorođenčadi i pneumonije kod male dece
- nekomplikovanih urogenitalnih infekcija pertusisa, listerioze, legionarske bolesti, teškog oblika akni, difterije, šarlaha, trahoma i primarnog sifilisa

1.6. Hemijska struktura i svojstva azitromicina



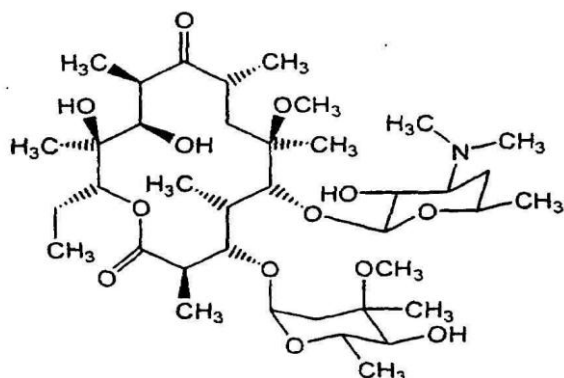
Slika 1.6.1.. Hemijska struktura azitromicina

Izvor: nacrtano u ChemBioDraw Ultra14.0

Azitromicin je 1981. godine patentirala hrvatska farmaceutska kompanija "Pliva". Ovaj lek se dobija hemijskom modifikacijom eritromicina, uvođenjem azota unutar makrolidnog prstena. Azitromicin ima sličan antibakterijski spektar ostalim antibioticima iz ove grupe, ali se izdvaja od njih po karakteristikama da se u krvi koncentriše u leukocitima. U slučaju infekcija leukociti se kreću ka mestu upale, a sa njima i azitromicin usled čega se prenosi specifično do mesta infekcije gde je njegovo delovanje i najpotrebnije. Zbog navedenih svojstava primenjuje se samo jednom dnevno, a terapija traje tri dana. Poluvreme eliminacije iznosi čak do 50h. Azitromicin je manje aktivan protiv Gram pozitivnih bakterija nego eritromicin, a znatno efikasniji protiv *Haemophilus influenzae* i može biti efikasniji protiv *Legionella*. Ima odlično dejstvo na *Toxoplasma sp.*, uništavajući ciste (Sabo et al. 2014). U prometu se nalazi u formama tableta, kapsula i sirupa i najčešće se koristi u terapiji infekcija izazvanih osetljivim mikroorganizmima kao što su:

- infekcije gornjih disajnih puteva (sinuzitis, faringitis/tonzilitis)
- infekcije donjih disajnih puteva (bakterijski bronhitis, vanbolnički stečena pneumonija, akutni otitis media)
- nekomplikovane infekcije kože i mekih tkiva,
- nekomplikovani uretritis i cervicitis uzrokovan sa *Chlamydia trachomatis* i genitalni ulkus kod muškaraca.

1.7. Hemijska struktura i svojstva klaritromicina



Slika 1.7.1. Hemijska struktura klaritromicina

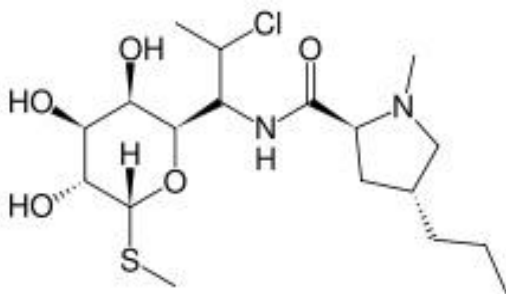
Izvor: nacrtano u ChemBioDraw Ultra 14.0

Klaritromicin se u hemijskom pogledu minimalno razlikuje od eritromicina i to po substituisanoj hidroksilnoj grupi na položaju 6 makrolidnog prstena metoksi grupom. Stoga, je ovaj molekul jedan od tipičnih primera koji ukazuje kako se malim hemijskim modifikacijama u strukturi molekula može doći do značajnih promena farmakoloških svojstava leka. Za razliku od eritromicina klaritromicin je stabilniji u kiseloj sredini i otporniji na razarajuće delovanje hlorovodonične kiseline iz digestivnog trakta odakle se znatno brže i resorbuje nego eritromicin. Usled ovakve promene u strukturi molekula došlo je i do promena u farmakoterapijskom smislu pa se klaritromicin koristi uz omeprazol i amoksisilin u trojnoj terapiji eradikacije bakterije *Helicobacter pylori* i lečenju ulkusne bolesti (Martin-Loeches *et al.* 2010; Sabo *et al.* 2014).

U prometu se nalazi u formi tableta i sirupa, a koristi se u terapiji:

- infekcija disajnih puteva (bronhitis i upala pluća)
- infekcija grla i sinusa
- infekcija kože i mekih tkiva

1.8. Linkozamini



Slika 1.8.1 Hemijska struktura

Izvor: nacrtano u ChemBioDraw Ultra 14.0

- linkomicin i
- klindamicin

Osnovna razlika između ova dva predstavnika u hemijskom pogledu je supstitucija -OH grupe u molekulu linkomicina atomom hlora pri čemu se dobija klindamicin. Ova izmena je umnogome poboljšala farmakokinetiku klindamicina u odnosu na linkomicin.

1.8.1. Mehanizam dejstva linkozamina

Slično kao i makrolidni antibiotici linkozamini se vezuju reverzibilno za 50S podjedinicu ribozoma pri čemu inhibišu očitavanje informacija sa ribozomalne ribonukleinske kiseline (r-RNA). S obzirom na isti mehanizam delovanja istovremena primena makrolida i linkozamina nije preporučljiva jer bi dovela do umanjenja antibiotskih efekata.

1.8.2. Antibakterijski spektar linkozamina

Linkozamini zaustavljaju razmnožavanje Gram pozitivnih aerobnih i anaerobnih bakterija: *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Peptococcus sp.*, *Peptostreptococcus sp.*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Eubacterium*. Od Gram negativnih anaeroba deluju na *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Veilonella*.

1.8.3. Uzroci pojave rezistencije na linkozamine

Do rezistencije dolazi usled izmene na receptorskim mestima na ribozomima za koji se linkozamini vezuju. Između linkomicina i klindamicina postoji kompletna unakrsna rezistencija.

1.8.4. Farmakokinetika linkozamina

Klindamicin se bolje resorbuje iz gastrointestinalnog trakta u odnosu na linkomicin, oba leka se dobro raspoređuju u organizmu, ali ne prolaze hematoencefalnu barijeru. Linkozamini se koncentruju u makrofazima, razgrađuju u jetri i izlučuju u obliku neaktivnih metabolita sa poluvremenom eliminacije 2-3 sata.

1.8.5. Neželjena delovanja linkozamina

Linkozamini mogu da izazovu dijareju kod 2-20% pacijenata, a kod nekih može da preraste i u pseudomembranozni kolitis. Iako nema mnogo kontrolisanih prospektivnih studija o učestalosti pseudomembranoznog kolitisa kod pacijenata ovo neželjeno delovanje je značajno ograničilo njihovu primenu. Osim pseudomembranoznog kolitisa ponekad mogu izazvati i reakcije preosetljivosti i veoma retko oštećenje jetre.

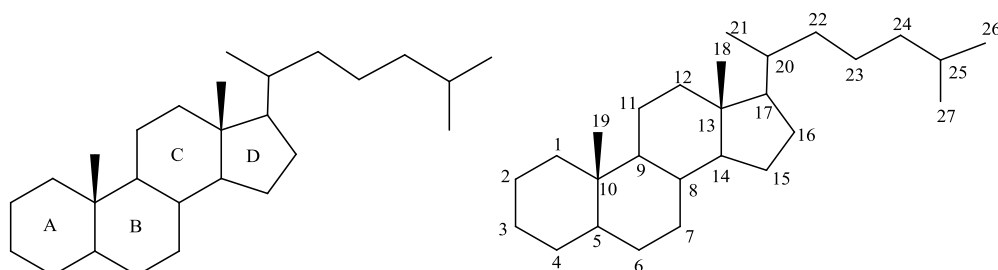
1.8.6. Terapijska primena linkozamina

Koriste se za lečenje mešovutih aerobno-anaerobnih abdominalnih infekcija izazvanih preko *Bacteroides sp.*, ginekoloških infekcija, teških stafilokoknih infekcija i osteomijelitisa. Linkomicin se sve više zamenjuje klindamicinom koji ređe izaziva pseudomembranozni kolitis (*Canu et al. 2012*).

Tabela 1.8.7.1. Način primene i doziranja makrolidnih antibiotika i linkozamina

Lek	Primena	$t_{1/2}$ (sati)	Doze za odrasle	Doze za decu
Eritromicin	<i>p.o.</i>	1,6	250- 500mgx4/dan	30-50mg/dan
Roksitromicin	<i>p.o.</i>	8-13	150mgx2/dan	7,5mg/kg/dan
Spiramicin	<i>p.o., i.v.</i>	8	6-8Mij/dan:3	50mg/kg/dan
Azitromicin	<i>p.o.</i>	40,0	500mgx1, posle 250mg/dan	30mg/kg/dan
Klaritromicin	<i>p.o., P.</i>	5-9	1000mg/dan:2	15mg/kg/dan
Midekamicin	<i>p.o.</i>		800- 1200mg/dan:3-4	30-50mg/kg/dan
Linkomicin	<i>p.o., i.m.</i>	2-3	500-1000mgx3- 4/dan	30-60mg/kg/dan
Klindamicin	<i>p.o., i.m.</i>	2-3	150- 450mgx4g/dan	8-25mg/kg/dan

1.9. Žučne kiseline i njihove soli



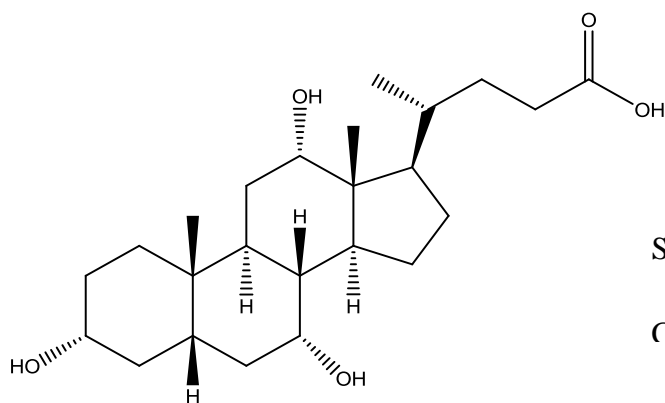
Slika 1.9.1 Numeracija i obeležavanje steroidnog prstena žučnih kiselina

Izvor: nacrtano u ChemBioDraw Ultra 14.0

Žučne kiseline su steroidna jedinjenja koja se sastoje iz tri šestočlana, jednog petočlanog prstena koji su kondenzovani i bočnog niza koj sadrži između 5 i 8 ugljenikovih atoma. Četiri prstena su označena sa leva na desno kao A, B, C, i D, pri čemu prstenovi A i B mogu biti orijentisani cis (5β serija) ili trans (5α serija). Većina žučnih kiselina je rasprostranjena u prirodi u vidu 5β serije. Žučne kiseline se u čovekovom organizmu biosintetišu iz holesterola u jetri. Inicijalni korak u njihovoj biosintezi predstavlja adicija

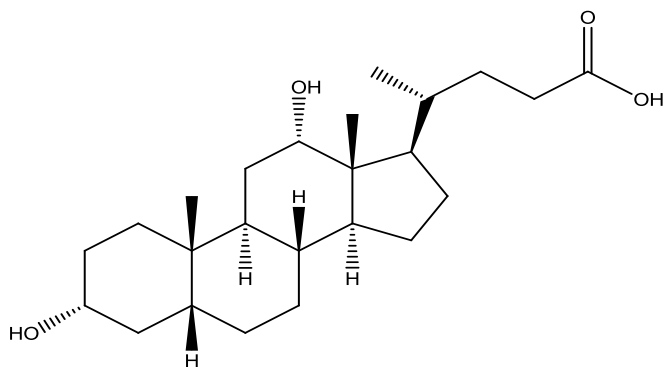
hidroksilne grupe na položaj 7 molekula holesterola. Takođe, dešava se promena u povezanosti prstenova A i B čime molekul dobija povijenu formu, a u tom procesu dolazi i do konverzije hidroksilne grupe na položaju tri u alfa orijentaciju. Dva najznačajnija puta sinteze žučnih kiselina su klasični i alternativni put sinteze. Klasičnim putem sinteze se u jetri sintetišu primarne žučne kiseline: holna i henodeoksiholna kiselina koje pod dejstvom bakterijske flore prelaze u odgovarajuće sekundarne žučne kiseline a to su: deoksiholna i ursodeoksiholna kiselina. Nastale žučne kiseline se preko karboksilne grupe amidnom vezom vezuju za aminokiseline glicin i taurin pri čemu se grade njihovi konjugati: tauroholna i glikoholna kiselina (Mikov et al. 2007) koje potom u prisustvu jona natrijuma grade odgovarajuće soli. Sekundarni derivati žučnih soli podležu enterohepatičkoj recirkulaciji i na taj način se preko 90% produkovanih žučnih soli zadržava u organizmu. Samo mali deo žučnih soli se izluči putem fecesa (120-225mg/dan). U složenom procesu enterohepatičke recirkulacije uključeni su brojni transporteri kao sto su: natrijum zavisni tauriholat kotransportni polipeptid (NTCP), natrijum nezavisni organski anjonski transporter (OATP), pumpa za izbacivanje žučnih soli (BSEPT, ABC11), i apiklani natrijum zavisni transporter žučnih soli (ASBT) (Balakrishnan and Polli, 2006; Zelcer et al., 2003; Bodo et al., 2003; Geyer et al., 2006; Zollner et al., 2003).

Jedna od najznačajnijih uloga žučnih soli ostvaruje se zahvaljući njihovoj sposobnosti da emulguju masti i tako učestvuju u njihovoj apsorpciji kao i u apsorpciji liposolubilnih vitamina. Ova jedinjenja su od velikog značaja i za regulaciju rada pankreasa i produkciju pankreasnih enzima (Koop et al., 1996). Otkrićem FXR receptora potvrđena je i veoma bitna funkcija žučnih soli kao signalnih molekula (Wang et al., 1999). Osim toga on utiču i na regulaciju crevne flore tankog creva zahvaljujući njihovim antimikrobnim svojstvima.



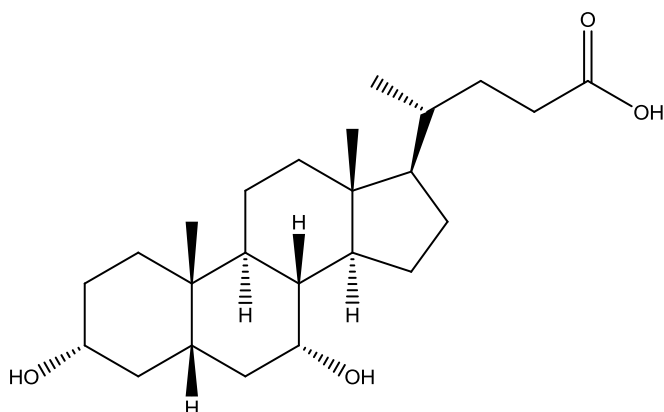
Slika 1.9.2. **Holna kiselina**

Izvor: nacrtano u
ChemBioDraw Ultra 14.0



Slika 1.9.3. **Deoksiholna kiselina**

Izvor: nacrtano u
ChemBiodraw Ultra 14.0



1.9.4. **Henodeoksiholna kiselina**

Izvor: nacrtano u
ChemBioDraw Ultra 14.0

1.10. Micele žučnih soli

Kao amfifilni molekuli koji se sastoje iz hidrofилnog i hidrofobnog dela konjugovane žučne soli na graničnoj površini vode i lipida pri određenim koncentracijama formiraju micele. Žučne soli nemaju mogućnost pasivne reapsorpcije u tankom crevu što dodatno doprinosi povećanju njihove koncentracije u ovom delu digestivnog trakta i na taj način omogućava formiranje micela. Kritična micelarna koncentracija se odnosi i na hemijsku strukturu žučnih soli i na njihovu koncentraciju neophodnu za spontano formiranje micela. Specifična geometrija molekula žučnih soli, posebno onih koji sa α -strane steroidnog jezgra imaju dve ili više hidroksilne grupe (natrijum deoksiholat, natrijum henodeoksiholat i natrijum holat) uslovljava u vodenoj sredini nastajanje molekulskih agregata-micela elipsoidnog oblika sa hidrofobnim jezgrom i to onda, kada su žučne soli iznad kritične micelarne koncentracije (CMC) (Roda *et al.*1983). Na taj način formirane micele žučnih soli emulguju lipide i

doprinosu njihovom varenju od strane specifičnih lipaza kao i apsorpciji na četkastom pokrovu tankog creva.

Poznavanje načina formiranja micela žučnih soli u vodenoj sredini je bitno ne samo zbog solubilizacije lipofilnih supstanci u biološkim sistemima već i zbog njihove primene u farmaceutskoj industriji u sklopu savremenih formulacija lekova. Kritična micelarna koncentracija žučnih soli je značajna osobina, pošto njena vrednost određuje mogućnost njihove samoasocijacije kao i građenja mešovitih micela naročito sa hidrofobnim katjonskim lekovima. Smatra se da promotorni efekat žučnih soli na transport pojedinih lekova kroz biološke membrane potiče usled stvaranja reversnih micela u lipidnoj fazi membrane. Međutim u literaturi se navode i primeri u kojima žučne soli grade micide u ćelijskim membranama kao i u vodenoj sredini što može biti objašnjeno da se usled povećanja hidrofobne površine žučnih soli povećava i transport kroz biološke membrane (*Posa et al., 2011*).

Krajem prošlog veka započeta su i prva ispitivanja uloge molekula žučnih soli u transportu lekova kroz biološke membrane. Zapaženo je da su keto derivati pokazali slabiji promotorni efekat u poređenju sa natrijum holatom, ali su ispoljili i manje toksičnih posledica u odnosu na natrijum holat (*Mikov et al., 2004*).

1.11. Hemijske reakcije oksidacije žučnih kiselina

U pogledu reaktivnosti hidroksilnih grupa žučnih kiselina prema oksidujućim reagensima odavno je uočena razlika. Govoreći na primeru holne kiseline, zapažen je sledeći red reaktivnosti $C7 > C12 > C3$, ali isti ne važi za katalitičku oksidaciju kao ni za oksidaciju po Oppenauer-u, jer se u ovakvim reakcijama prvo oksiduju hidroksilne grupa na položaju C-3. Brža oksidacija aksijalnih hidroksilnih grupa u odnosu na ekvatorijalne kod steroidnih jedinjenja objašnjava se:

- sternim interakcijama kojima je izložena OH grupa u toku reakcije
- lakšim pristupom baze iz ekvatorijalnog pravca pri raskidanju C-H veza u fazi koja određuje brzinu reakcije
- većim smanjenjem repulzivnih interakcija kod oksidacije aksijalnih alkohola

Prilikom oksidacije hidroksilnih grupa žučnih kiselina uglavnom se primenjuju sledeće reakcije:

- korsteći kalijum dihromat dolazi do neselektivne oksidacije hidroksilnih grupa žučnih kiselina, ali podešavanjem količine reagensa reakcija se može usmeriti u pravcu selektivne oksidacije OH grupe na položaju C-7
- Oppenauer-ova regioselektivna oksidacija hidroksilne grupe na položaju C-3
- Oksidacija uz pomoć srebrnog karbonata na celitu kao adsorbensu, takođe regioselektivna reakcija
- Regioselektivna oksidacija C-3 i C-7 hidroksilne grupe uz pomoć kalijum permanganata
- Regioselektivna oksidacija hidroksilne grupe na položaju C-12 gde se žučna kiselina najpre prevodi u odgovarajući amid, a potom oksidiše bromom u alkalnoj sredini
- Regioselektivna oksidacija hidroksilne grupe na položaju C-7 uz pomoć broma u alkalnoj sredini

Prvi pokušaj selektivne oksidacije holne kiseline izveo je Haselwood vodenim rastvorom kalijum-dihromata u sirćetnoj kiselini uz prisustvo natrijum acetata pri čemu je ostvarena oksidacija hidroksilne grupe na položaju C-7 (*Kuhajda et al. 2006; Fiser et al. 1950*)

1.12. Transporteri žučnih soli

Transporteri žučnih soli utiču direktno ili indirektno na biološke procese na osnovu fizičko-hemijskih ili signalnih svojstava žučnih soli. Koordinisana akcija apsorpcije i izlučivanja žučnih soli na polarizovanim epitelnim ćelijama jetre, bilijarnog stabla, tankog creva i bubrega odeđuje koncentraciju žučnih soli u različitim delovima tela. Genetske varijacije transportera žučnih soli dovode do klinički relevantnih fenotipova koji mogu da se ispolje u različitom opsegu od predispozicije za oštećenje jetre uzrokovano primenom lekova do brzog napredka ka krajnjem stadijumu u oboljenju jetre (*Zelcer et al. 2003*).

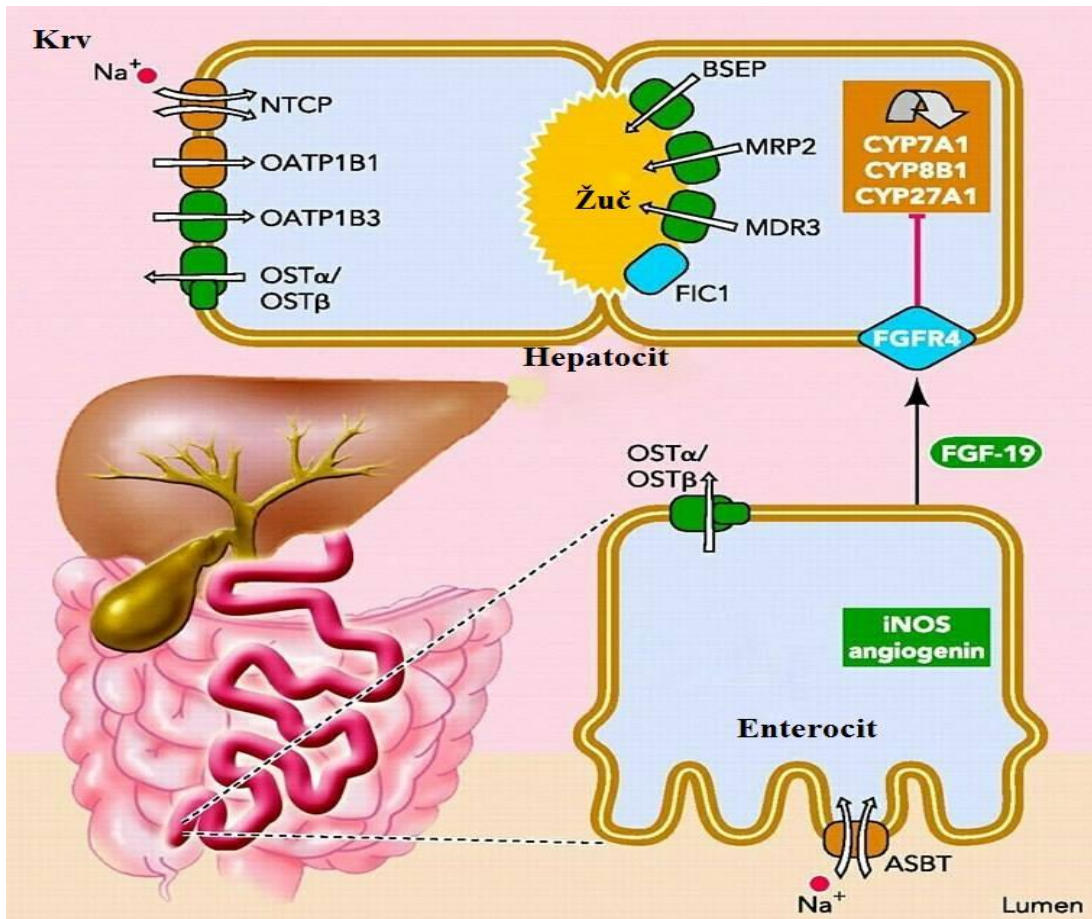
Da bi se održala homeostaza žučnih soli uključeno je nekoliko transportnih sistema koji pripadaju porodici ABC transportera:

- Natrijum tauroholat kotransporni polipeptid (NTCP)
- Eksport pumpa žučnih soli (BSEP)
- Apikalni natrijum-zavisni transporter žučnih soli (ASBT)
- Organski transporteri rastvorenih supstanci (OST α /OST β)

NTCP je glavni sistem za apsorpciju žučnih soli lokalizovan na sinusoidalnoj membrani hepatocita koji se oslanja na natrijumov gradijent regulisan Na⁺/K⁺ ATP-azom. Članovi porodice organskih anjonskih transportnih polipeptida (OATP) transportuju žučne soli pored širokog spektra organskih anjona. Oni deluju kao anjonski izmenjivači i primera radi transportuju natrijum tauroholat u zamenu za bikarbonatni anjon. Pored toga proteini multiple rezistencije (MRP3 i MRP4) imaju sposobnost da transportuju žučne soli natrag u krvotok. U holestazi sa povećanjem intracelularnih koncentracija žučnih soli to može olakšati regulaciju njihovog nivoa. U skladu sa tim dokazana je značajna uloga MRP4 kod dece sa nasleđenom holestazom. Slično tome kod odraslih indukcija MRP4 pomoću ursodeoksiholne kiseline delimično objašnjava korisne efekte ursodeoksiholne kiseline u holestazi. Nasuprot ovome OST α /OST transporteri koji se nalaze na sinusoidalnoj membrani hepatocita posreduju u efluksu žučnih soli nazad u krvotok mehanizmom koji nije u potpunosti razjašnjen (*Kimura et al., 2005, Balakrishnan et al., 2006*).

Glavni transporter za soli žučnih kiselina je BSEP lokalizovan na kanalikularnoj membrani i pripada porodici ATP vezujućih proteina. BSEP imaju sposobnosti da koncentrišu žučne soli do 1000 puta prenoseći ih iz hepatocita u žuč.

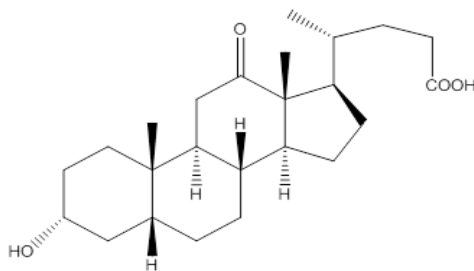
ASBT se nalaze na luminalnoj strani membrane holangiocita zajedno sa Cl⁻/HCO₃⁻ izmenjivačima. U procesu koji se naziva holehepatičko manevrisanje soli žučnih kiselina mogu biti apsorbovane od strane ASBT i reciklirane putem perbilijarnog pleksusa nazad u hepatocit za ponovnu sekreciju u žuč. Ovaj proces služi za intacelijsku signalizaciju od strane žučnih soli i pomaže u kanalikularnoj sekreciji žučnih soli čak i kada je drenaža umanjena opstruktivnom holestazom (*Kubitz et al., 2014*).



Slika 1.12.1 Prikaz osnovne grupe transportera žučnih kiselina

Izvor: (Jyrki et al. 2008) izmenjeno u Powerpoint

1.13. Sinteza 3 β -hidroksi-12-keto-5 β -holanske kiseline



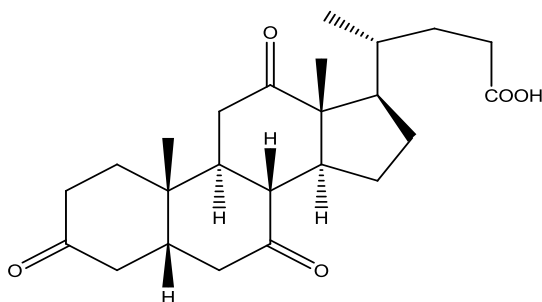
Slika 1.13.1. Hemijska struktura 3 β -hidroksi-12-keto-5 β -holanske kiseline

Izvor: Crtano u ChemBioDraw Ultra 14.0

Prvi put je 3 β -hidroksi-12-keto-5 β -holanska kiselina izolovana 1920. godine u smeši zajedno sa henodeoksiholnom kiselinom (Weyland, 1920). Tek 1933. godine je izolovana u

čistom obliku iz goveđe žuči (*Weyland et al, 1933*). Haslewood je prisustvo ove žučne kiseline dokazao u fecesu više vrsta sisara 1967. godine. 3 β -hidroksi-12-keto-5 β -holanska kiselina se može dobiti na dva načina ili direktnom oksidacijom deoksiholne kiseline ili predhodnom zaštitom hidroksilne grupe na položaju C-3 pa oksidacijom slobodne hidroksilne grupe na položaju C-12 (*Haselwood et al., 1967*).

1.14. Sinteza 3,7,12-triketo-5 β -holanske kiseline

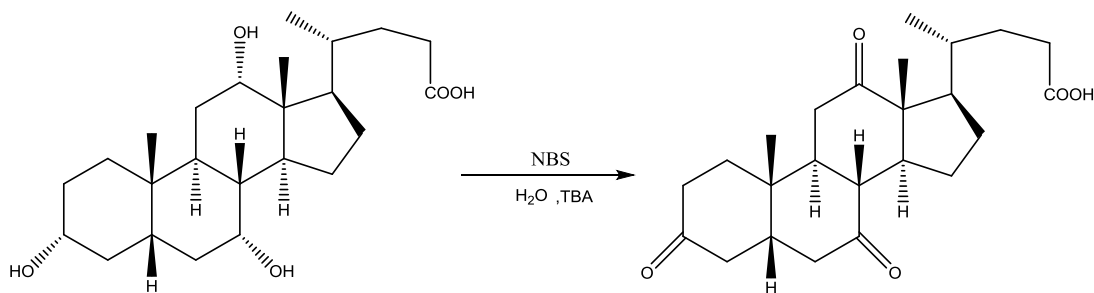


Slika 1.14.1. Hemijska struktura 3,7,12-triketo-5 β -holanske kiseline

Izvor: nacrtano u ChemBioDraw Ultra 14.0

Dokazano je da sa povećanjem broja keto grupa u molekulima žučnih kiselina se smanjuje i njihova toksičnost jer opada njihova sposobnost za građenje mešanih micela sa fosfolipidima ćelijskih membrana. Zbog takvih pojedinosti ispitivanje keto derivata žučnih kiselina je veoma značajno za buduće farmaceutske formulacije i njihove primene u preparatima lekova.

Fieser i Rajagoplan su tokom svojih eksperimenata zapazili da N-bromsukcinimid (NBS) i N-bromacetamid (NBA) u vodenoj sredini imaju sposobnost da oksidišu sve tri hidroksilne grupe molekula holne kiseline. Ovi autori su takođe dokazali da korsteći NBS u vodenom rastvoru u prisustvu natrijum-hidrogenkarbonata dolazi do oksidacije hidroksilne grupe isključivo na položaju C-7 dok hidroksilne funkcije na C-3 i C-12 ne podležu oksidaciji (*Fiser et al. 1950*).



Slika 1.14.2. Hemijska reakcija sinteze 3,7,12-triketo-5 β -holanske kiseline

Izvor: (Fiser et al., 1950) nacrtano u ChemBioDraw Ultra14.0

1.15. Biološke membrane

Membrane se sastoje od različitih kombinacija lipida i proteina, što zavisi od vrste organizma i vrste ćelije. One definišu ćelijske dimenzije, dele ćelije u posebne delove, omogućavaju izvođenje kompleksnih reakcija i učestvuju u primanju signala i pretvaranju energije. Prosečna debljina membrana je od 7-10 nm. Intracelularne membrane su obično tanje od transcelularnih membrana. Pod elektronskim mikroskopom se vide kao troslojne strukture sa dve tamne spoljašnje i jednom svetlom unutrašnjom trakom. Sastav bioloških membrana varira u zavisnosti od njihove funkcije pa plazma membrane imaju najveću koncentraciju neutralnih lipida i sfingolipida dok mijelinske membrane sadrže uglavnom glikosfingolipide. Intracelularne membrane prvenstveno sadrže fosfogliceride i vrlo malo sfingolipida i holesterola.

1.16. Ćelijska membrana

Osnove vrste membranskih lipida su: fosfogliceridi, sfingolipidi, glikolipidi (glikosfingolipidi) i steroli (holesterol kod kičmenjaka). Glavna sila koja pokreće stvaranje membrana je hidrofobni efekat. Lipidni slojevi su kooperativne strukture koje se međusobno drže zajedno Van Der Waalsovima silama. Membranski lipidi poseduju sposobnost da grade lipidne dvosloje u vodenim rastvorima kao i micle i vezikule. Fosfolipidni dvosloj je osnovna struktura svih bioloških membrana. To je dvodimenzionalni lipidni dvosloj koji se sastoji od dve spoljašnje hidrofilne strane i hidrofobne unutrašnjosti. Sam lipidni dvosloj slabo je propustljiv za molekule i jone rastvorne u vodi dok je bolje propustljiv za jedinjenja rastvorljiva u lipidima.

1.17. Resorpcija lekova iz digestivnog trakta

Glavni način unošenja lekova u ljudski organizam je oralna administracija lekova. Ovaj vid uzimanja lekova je jednostavan, dosta dobro podnošljiv i efikasan za veliki broj lekovitih supstanci koje su otporne na dejstvo želučanog soka. Početak apsorpcije lekova već počinje u ustima preko dobro prokrvljene sluzokože, zatim sluznice želuca, pa sluzokože tankog creva i debelog creva.

U digestivnom traktu su zastupljena tri načina apsorpcije lekova:

- Pasivna difuzija (gasovi i voda)
- Aktivni transport (natrijum, litijum i jod)
- Pinocitoza (velike čestice i koloidni rastvori)

Sluzokoža u ustima i želucu ima malu površinu i tu se najbolje resorbuju slabe kiseline dok je sluzokoža tankog creva jako naborana i savijena pa je površina veća a tu je apsorpcija najveća. Sadržaj tankog creva i njegov pH utiče na solubilnost leka, brzinu rastvaranja tableta i odlaže apsorpciju. Motilitet creva utiče na brzinu rastvaranja tableta i brzinu kojom lek odlazi u rastvor i kretanje leka do mesta apsorpcije. Lipofilni molekuli se najvećim delom absorbuju od strane digestivnog trakta transcelularnim putem zahvaljujući složenoj aktivnosti familije transportera nazvanih ABC (ATP-binding cassette drug transporters) transporteri.

1.18. Krvno-moždana barijera

Brzina ulaska leka u CNS određena je prolaskom kroz krvno moždanu barijeru koja sprečava ulazak jonizovanih jedinjenja. Ceo sistem raspodele leka je u ravnoteži sa molekulima leka koji prolaze između plazme i tkiva pri brzini koja je određena vaskularizacijom i liposolubilnošću. Poznato je da mali i liposolubilni molekuli prolaze kroz KMB, dok mali i veliki hidrofilni molekuli zahtevaju aktivni transport.

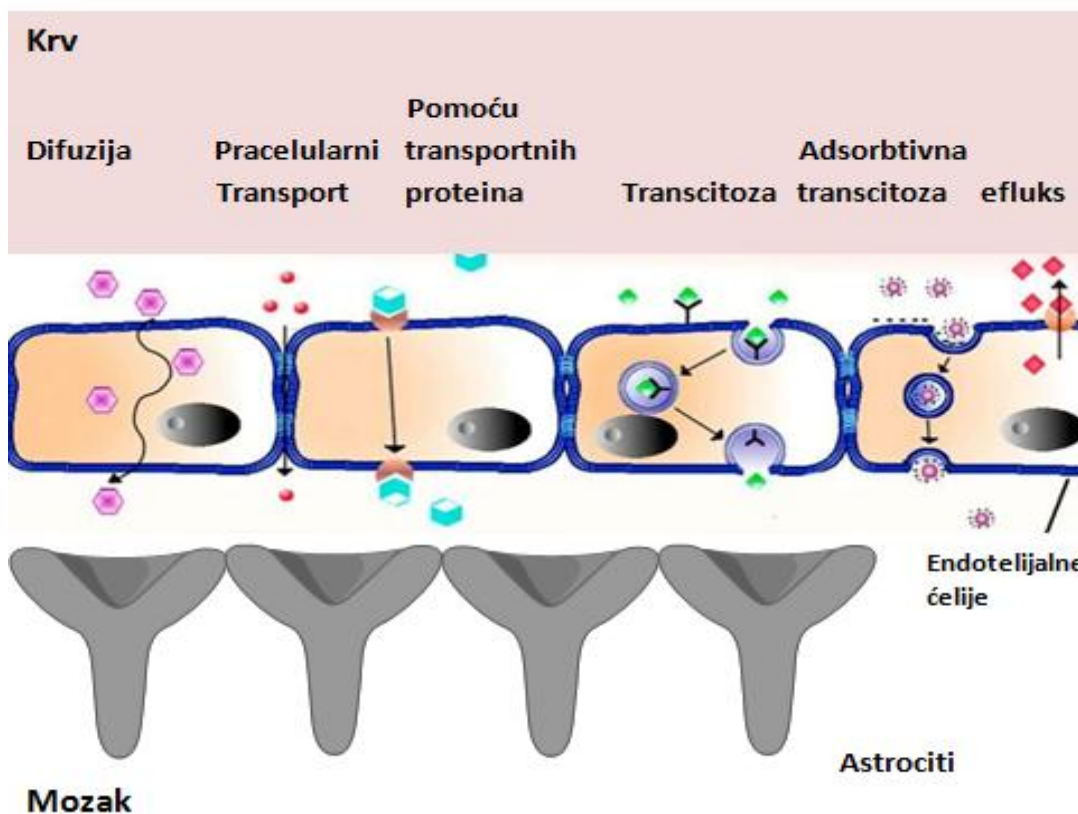
Strukturno, krvno-moždana barijera (KMB) je jednoslojni niz specijalizovanih, mikrovaskularnih endotelnih ćelija, koje su međusobno spojene čvrstim vezama i lišene transcelularnih pora. Oko ovog kontinuiranog sloja kapilara nalazi se bazalna membrana i sloj

pericita koji proizvode imunomodulatorne supstance koje učestvuju u imunom odgovoru KMB.

Poseban značaj KMB ima u prometu ćelija iz krvi u moždano tkivo i obratno, što je proces koji je prisutan i u patološkim i fiziološkim okolnostima. Danas, još uvek nije razjašnjeno kako pojedine ćelije poseduju sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru kada se zna da je ona nepropustljiva za veliki broj malih molekula lekova veličine do 400 kDa (*Mikov et al. 2004; Misra 2003*).

Iz krvi strane supstance se mogu transportovati kroz krvno-moždanu barijeru na sledeće načine:

- Transcelularno (lipofilne supstance)
- Paracelularno
- Pomoću transportnih proteina
- Transcitozom posredovanom uz pomoć određenih receptora
- Adsorptivnom transcitozom
- Putem efluksa



Slika 1.18.1. Prikaz transporta kroz krvno-moždanu barijeru

Izvor: Nacrtno uz pomoć ChemBioDraw Ultra 14.0 i Powerpoint

1.19. *In silico* karakterizacija odabranih derivata žučnih kiselina

Tokom ranijih perioda sinteze novih lekova razvojni put stvaranja novih biološki aktivnih jedinjenja je bio prilično složen i usporen činjenicama da je stvarano mnogo novih jedinjenja koja su nakon sinteze podvrgavana zahtevnim farmakološkim ispitivanjima da bi rezultat bio odbacivanje oko 40% molekula zbog toksičnosti i loših farmakokinetičkih parametara (Mahar *et al.*, 2002; Luis *et al.*, 2009; Lombardo *et al.*, 2001). To je dovelo do utroška velike količine sredstava i vremena, pri čemu se odbacivala polovina jedinjenja dobijena na ovakav način (Bajorath *et al.*, 2011; Klopman *et al.*, 1992).

Savremeni pristup razvoju novih jedinjenja se ogleda u *in silico* pribavljanju što većeg broja informacija o molekulu novog leka koje bi mogle da zamene eksperimentalne podatke. Na ovaj način mogu se predvideti jedinjenja koja će imati zadovoljavajuća farmakološka svojstva ili čak izdvojiti molekuli sa najpoželjnijim karakteristikama iz serije već sintetisanih jedinjenja. Takođe, može u napred biti utvrđeno kakve će posledice imati modifikacija

strukture čak i pre nego molekul bude sintetisan što dovodi so manjeg broja hemijskih modifikacija i farmakoloških ispitivanja jedinjenja (*Winkler, 2002; Li et al., 2001; Marjanović et al. 1983*). Da bi kandidat mogao da se koristi kao lek, on treba da prođe određeni put pri čemu se ispituju njegove osobine: u kojoj meri se resorbuje u digestivnom traktu, kako se distribuira u organizmu, da li reaguje sa određenim receptorima i na koji način se eliminiše iz organizma. Zapaženo je da postoji tesna veza između strukture jedinjenja i njegovog biološkog ponašanja (*Butina et al., 2002; Miller et al., 1988; Kaliszan et al., 1989*). Zahvaljujući ovakvim činjenicama razvile su se metode koje mogu da predvide farmakokinetičke parametre kao i toksikološke i fizičko-hemijske osobine jedinjenja na osnovu baze eksperimentalno dobijenih podataka za već poznate molekule (*Todeschini et al, 2000*).

- QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships) na ovaj način se prikazuju matematički modeli za odnos strukture jedinjenja i njihovih bioloških svojstava koje se mogu dobiti *in vivo* ili *in vitro* (*Snyder et al., 1968*).

- QSTR (Quantitative Structure-Toxicity Relationships) ovim se kvantifikuju odnosi između hemijske strukture molekula i toksikoloških podataka (*Scott et al., 1975*)

- QSPR (Quantitative Structure-Property Relationships) ovom metodom se na osnovu strukture molekula predviđaju njegove fizičko-hemijske osobine (*Collander R et al., 1951*)

1.20. Molekulski deskriptori

Molekulski deskriptori predstavljaju vrednosti kojima se karakteriše ceo molekul ili samo jedan njegov deo. Broj deskriptora eksperimentalnih (empirijskih) ili izračunatih (neempirijskih) je veoma velik i kreće se čak do 3000 (*Ferydoun et al., 2008; Randić, 1991; Franklin et al., 1975; Gleeson et al., 2011*).

Molekulski deskriptori mogu biti:

- fizičko-hemijski (tu spadaju deskriptori koji utvrđuju elektronske, hidrofobne i sterne efekte)
- topološki (predstavlja indeks konektivnosti)

- geometrijski parametri (izračunavaju se iz specifične površine molekula)
- elektronski (dobijaju se iz molekulske-orbitalnih podataka)
- strukturni deskriptori (govore o učestalosti pojavljivanja određene strukture)

1.20.1. Particioni koeficijent

Jedan od najznačajnijih molekulskih deskriptora je particioni koeficijent (P) odnosno njegov logaritam ($\log P$). Particioni koeficijent pretstavlja meru raspodele neutralne forme molekula između 1-oktanola i vode, a odslikava meru lipofilnosti (hidrofobnosti) molekula (Avdeef et al., 1992; Scott et al. 1977; Petrović et al., 1990). Zbog sličnosti ovog sistema sa biološkom membranom dobija se njena najbolja aproksimacija. Lipofilnost nekog fiziološki aktivnog jedinjenja je izuzetno važna karakteristika dotičnog molekula jer od ovog podatka zavisi prolazak molekula kroz membrane, vezivanje za proteine plazme i interakcija sa receptorima na mestu delovanja (Leo et al. 1971; Lombardo et al. 2000; Pidgeon et al., 1989). S obzirom da lipofilnost najviše zavisi od strukture samog molekula ispitivanja na živim organizmima nisu potrebna.

Postoji nekoliko metoda za određivanje vrednosti partitionog koeficijenta:

- Shake-flask metoda (metoda mućkanja) uz HPLC-UV detekciju je jedna od najčešće korišćenih metoda za određivanje partitionog koeficijenta (Braumann et al, 1986).
- Potenciometrijska titracija koja se odnosi na prelaženje supstance koja je u jonskom obliku iz vodene sredine u 1-oktanol. Ovo je dobar način za određivanje partitionog koeficijenta kod veoma hidrofilnih ili hidrofobnih molekula, a podrazumeva da supstanca može da jonizuje u vodenoj sredini (Miyake et al., 1987; Scott et al., 1980; Milojković et al. 2000).
- Različite hromatografske metode koje podrazumevaju primenu stacionarnih mobilnih faza koje su posebno prilagodjene da bi najadekvatnije pretstavile raspodelu u sistemu lipid/voda (Wildman et al., 1999)

In silico modeli za predviđanje $\log P$ oslanjaju se na formiranje modela iz baze podataka o već ispitivanim molekulima. Kompjuterski programi mogu da izračunavaju

vrednosti log P hidrofobne parametre na bazi različitih modela od kojih su najznačajniji (Rekker et al., 1998):

- Atomski bazirano predviđanje (Alog P , Mlog P)
- Predviđanje bazirano na fragmentaciji molekula (Clog P) (Kellogg et al. 1992)

1.20.2. Deskriptori intestinalne apsorpcije

Stepen apsorpcije leka iz digestivnog trakta zavisi od njegove rastvorljivosti u intestinalnim fluidima i njegovog transporta kroz intestinalne membrane. Smatra se da je osnovni način apsorpcije lekova pasivna difuzija. Pasivan transport predstavlja difuziju kroz lipidni dvosloj pa i sama permeabilnost zavisi od lipofilnosti date supstance (Clark et al., 2001; Lambert et al., 1993; Cserhati et al., 1993). Pored transcelularne, prisutna je i paracelularna permeacija koja predstavlja difuziju kroz negativno naelektrisane tesne veze između epitelnih ćelija creva, što znači da se na ovaj način mali katjoni lako, a veliki anjoni slabo apsorbuju. Danas se koriste različiti pristupi prilikom određivanja pasivne intestinalne apsorpcije molekula, što omogućava da se ovi molekuli dalje klasifikuju na osnovu stepena apsorpcije (Pearlman et al., 1987; Nasal et al., 2003).

Najviše se određuje konstanta apsorpcije (k_a), koja se opisuje kao odnos prirodnog logaritma broja dva i poluvremena apsorpcije datog jedinjenja, osim toga često se izražava i kao procenat apsorbovanog leka HIA:

$$\text{HIA} = \frac{\text{koncentracija oralne doze} - \text{koncentracija izlucena iz organizma}}{\text{koncentracija oralne doze}} \times 100$$

1.20.3. Deskriptori distribucije (volumen distribucije, vezivanje za proteine plazme i koeficijent raspodele između krvi i mozga (logBB))

Farmakokinetiski parametar koji se koristi za opisivanje veličine distribucije leka o organizmu se naziva volumen distribucije (V_d). Volumen distribucije predstavlja meru raspodele leka između plazme i tkiva. Najvažniji parametar koji utiče na distribuciju leka u organizmu je lipofilnost molekula (Krueger-Thiemer et al., 1965).

Još jedan od faktora koji utiče na distribuciju leka u organizmu je i procenat vezivanja leka za proteine plazme (PPB), a koji može da se predstavi kao odnos koncentracije leka vezanog za proteine plazme i ukupne koncentracije leka u plazmi i izražava se u procentima. Farmakološko delovanje leka ne zavisi toliko od njegove ukupne koncentracije u plazmi, već više od koncentracije njegove slobodne frakcije koja stiže do mesta delovanja, dok vezana frakcija služi kao depo kojim se nadomešćuje gubitak slobodnog leka različitim putevima njegove eliminacije. Stoga procenat vezivanja leka za proteine plazme predstavlja činilac koji utiče i na farmakokinetiku i na farmakodinamiku nekog leka (*Lipinski et al., 2001; Kratochwil et al., 2002*).

Sposobnost vezivanja za proteine plazme je drugačija za svaki lek i za tu procenu potrebno je uzeti u obzir i njegov fizičko-hemijski i farmakološki profil. Koncentracija slobodne frakcije leka u plazmi koja je potrebna da bi se ostvarilo farmakološko delovanje može široko da varira, dok koncentracije veće od ciljanih dovode do neželjenih efekata lekova. PPB pruža značajne informacije tokom razvoja novog leka, jer se na osnovu ovih vrednosti izračunava koncentracija slobodne frakcije molekula u plazmi životinja i u vezi sa tim se određuje bezbedan režim doziranja prilikom prelaska na ispitivanje na ljudima (*Đaković-Sekulić et al., 2002; Nasal et al., 2003*).

Sposobnost prolaska leka kroz hematoencefalnu barijeru je veoma važno svojstvo za sve lekove koji deluju na nervni sistem. Da bi ostvarili svoje farmakološko dejstvo, mnogi lekovi moraju imati sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru. Modelovanjem, moguće je predvideti ponašanje novih jedinjenja u odnosu na funkciju i transport kroz hematoencefalnu barijeru (*Modaa et al., 2007; Laznicek et al., 1995*). Postoji set od pet pravila koje je potrebno da zadovolje molekuli da bi uspeali da prodju kroz krvno-moždanu barijeru:

- Ukoliko zbir atoma azota i kiseonika (N+O) u nekom molekulu ima vrednost manju ili jednaku 5, taj molekul ima određene šanse da prođe kroz krvno-moždanu barijeru
- Kada je vrednost $\text{ClogP} - (\text{N} + \text{O}) > 0$, tada postoji određena verovatnoća da će i $\log\text{BB}$ imati pozitivnu vrednost
- Poželjno je da ukupna polarna površina molekula (Total Polar Surface Area – TPSA) bude ispod određene vrednosti. TPSA predstavlja sposobnost molekula da veže

vodonik. Postoje dve granične vrednosti za maksimalnu vrednost površine: van de Waterbeemd et al daju granicu od 90 Å² (*van de Waterbeemd et al., 2003*), dok Kelder et al daju nešto niži prag – 60-70 Å² (*Kelder et al., 1999*);

- Molekulska masa (MW) treba da ima vrednost ispod 450 kako bi prodor u mozak bio lakši (*van de Waterbeemd et al., 1998*);
- Preporučljivo je da log D vrednost bude u opsegu 1-3

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U istraživanju su postavljeni sledeći ciljevi:

1) Ispitati kako 3,7,12-triketo-5 β -holanska kiselina i 3 β -hidroksi-12-keto-5 β -holanska kiselina utiču na prolazak eritromicina i klindamicina u jetru, bubrege i mozak eksperimentalnih životinja.

2) Ispitati da li 3,7,12-triketo-5 β -holanska kiselina ili 3 β -hidroksi-12-keto-5 β -holanska kiselina pokazuje bolji efekat na prodornost eritromicina i klindamicina u jetru, bubrege i mozak eksperimentalnih životinja.

2.1. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

1) Očekuje se značajno povećanje prodornosti eritromicina i klindamicina u jetru, bubrege i mozak pod uticajem 3,7,12-triketo-5 β -holanske kiseline i 3 β -hidroksi-12-keto-5 β -holanske kiseline.

2) Očekuje se da 3,7,12-triketo-5 β -holanska kiselina omogućava značajno veću prodornost eritromicina i klindamicina u jetru, bubrege i mozak u odnosu na 3 β -hidroksi-12-keto-5 β -holanska kiselina.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. *In vitro* eksperimentalni deo

Ovaj eksperimentalni deo je prethodio *in vivo* ogledima koji su sprovedeni na eksperimentalnim životinjama i rađen je sa ciljem da se utvrde tačnosti teorijskih hipoteza na odabranom *in vitro* modelu kako bi se izbeglo sprovođenje invazivnih eksperimenata na životinjama ukoliko to etički ne bi bilo opravdano.

3.2. Nuklearno-magnetne (NMR) spektroskopske analize

3.2.1. Priprema rastvora za NMR

U ovom eksperimentalnom delu za istraživanja su korišćeni sledeći makrolidni antibiotici: azitromicin aglikon, azahomoeritromicin, dekladinofilazitromicin, eritromicin A, azitromicin dihidrat i klaritromicin. Ispitivane soli žučnih kiselina su bile: natrijum holat (NaC), natrijum deoksiholat (NaDC) i natrijum tauroholat (NaTC). Za pripremu rastvora za NMR analizu korišćen je HBSS (Hank's balanced salt solution) medijum koji je najpre liofilizovan i rastvoren u D₂O i korišćen za pravljenje simulirane intestinalne tečnosti u uslovima gladovanja (FaSSIF) i Simulirane intestinalne tečnosti posle uzimanja hrane (FeSSIF) medijuma. Rastvori koji simuliraju intestinalne tečnosti su pravljeni prema sledećim procedurama:

- FaSSIF: HBSS medijum, 19.45 mM glukoza, 10 mM HEPES, 3 mM NaTC, 0.75 mM lecithin
- FeSSIF: HBSS medijum, 19.45 mM glukoza, 10 mM HEPES, 15 mM NaTC, 3.75 mM lecitin

Prilikom ispitivanja interakcija između makrolidnih antibiotika i žučnih kiselina uz pomoć NMR spektroskopije upotrebljavani su rastvori žučnih kiselina u koncentracijama iznad kritične micelarne (50-100 mM). U skladu sa ograničenom rastvorljivošću makrolida u vodenom rastvoru korišćeni su zasićeni rastvori koji su pripremani rastvaranjem odgovarajuće količine makrolida i sonifikacijom rastvora u trajanju od 20-30 minuta. Da bi se oslobodili

preostlog nerastvorenog oblika antibiotika uzorak se centrifugira, a tečna faza koristila za dalje eksperimente (*Glanzer et al., 2015*)

3.2.2. Snimanje NMR spektara

Svi NMR eksperimenti su sprovedeni na 500 MHz Bruker Avance III NMR spektrometru na temperaturi od 298 K.

Da bi se odredio difuzioni koeficijent ispitivanih makrolidnih antibiotika korišćena je dvodimenzionalna NMR tehnika DOSY (**D**iffusion **O**rdere**D** Spectroscopy).

Korišćena puls sekvenca je bila bipolarni puls par (BPP-LED - **b**ipolar **p**ulse **p**air **l**ongitudinal **e**ddy current **d**elay) sa kalibracionim parametrima od 100 ms za difuziono vreme i 2 ms za gradientni puls.

Za razliku od konvencionalnih eho stimulisanih eksperimenata bipolarni puls par je korišćen za smanjenje distorzija vrtložnih struja, a tokom dodatnog odlaganja magnetizacija je očuvana u z (uzdužnom) pravcu omogućavajući vrtložnoj struji da se izgubi.

3.2.3. Odredjivanje molekularne lipofilnosti putem tankoslojne hromatografije

U ovom eksperimentalnom delu analizirano je hromatografsko ponašanje sledećih žučnih kiselina: deoksiholne, henodeoksiholne, ursodeoksiholne, taurodeoksiholne i hiodeoksiholne kiseline (Sigma, New Zealand, 98%). Takođe, analizirani su i pojedini predstavnici derivata žučnih kiselina koji sadrže jednu ili više keto grupa u sklopu svoga molekula. 3 α -hidroksi-12-okso-5 β -holanska kiselina je sintetisana po proceduri koju je ustanovio Miljkovic i saradnici (*Miljkovic et al. 1996*). 3 α -hidroksi-7-okso-5 β -holanska i 3 α -hidroksi-7,12-diokso-5 β -holanska kiselina su pripremljeni prema postupku koji su uspešno izveli Tullar i saradnici (*Tullar et al. 1951*) dok je 3,7,12-triokso-5 β -holanska kiselina sintetisana prema postupku koji su opisali Fiser i Rajgopalan (*Fieser and Rajagopalan, 1950*). U sintezi 12 α -hidroksi-3,7-diokso-5 β -holanske kiseline polazna komponenta je bio metil holat koji je selektivno oksidisan sledeći proceduru koju su ustanovili Kuwada i saradnici (*Kuwada et al. 1949*).

Prilikom određivanja hromatografskih parametara korišćena je tehnika normalno fazne tankoslojne hromatografije (NP TLC) i dva sistema razvijaača toluen/etanol i toluen/butanol gde su etanol i butanol poslužili kao modifikatori svojstava razvijaača i njihova koncentracija je varirana u rasponu između 5-35% (*Posa et al. 2011*)

3.3. *In vivo* eksperimentalni deo

U ogledu su korišćeni zdravi odrasli laboratorijski pacovi muškog pola soja Wistar, telesne mase 200-300 grama čije je poreklo iz uzgajališta oglednih životinja na Vojnomedicinskoj akademiji u Beogradu. Tokom eksperimenta životinje su boravile u standardnim laboratorijskim uslovima na Zavodu za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju, Medicinskog fakulteta u Novom Sadu na sobnoj temperaturi od 25 stepeni Celzijusovih, sa ciklusom svetlost-tama po 12 sati i slobodnim pristupom hrani i vodi.

3.4. Plan istraživanja

Tokom sprovođenja ovog eksperimentalnog dela doktorske disertacije korišćena su dva antibiotika: eritromicin kao predstavnik iz grupe makrolida i klindamicin kao predstavnik iz grupe linkozamina. Žučne kiseline kojima su tretirane eksperimentalne životinje pripadaju grupi keto derivata i dobijene su sintetskim putem u skladu sa procedurama (*B. Staels et.al 2009*). Keto derivati su upotrebljavani iz razloga jer poseduju manju toksičnost u odnosu na primarne žučne kiseline sa većim brojem hidroksilnih grupa. U skladu sa tim ovaj deo istraživanja je podluno na dva dela:

- Prvi deo tokom kojeg je praćen prodor antibiotika u centralni nervni sistem pod uticajem odabranih žučnih soli.
- Drugi deo tokom kojeg je praćena kinetika i apsorpcija antibiotika iz digestivnog trakta pod uticajem odabranih žučnih soli.

U prvom delu eksperimenata praćen je uticaj natrijumove soli 3 β -hidroksi-12-keto-5 β -holanske kiseline i natrijumove soli 3,7,12-triketo-5 β -holanske kiseline na prolazak eritromicina i klindamicina u moždano tkivo. Životinje su najpre anestezirane uretanom 4 mg/kg i krvni sudovi su preparisani pre inicijalne aplikacije leka. Eritromicin i klindamicin

davani direktno u *a. axillaris* a uzorci su uzimani iz *v. jugularis* (150 μ l) u 30, 60, 150 i 240 sekundi od momenta apliciranja leka. Nakon toga životinje su žrtvovane kardiopunkcijom i izvađeni su jetra, bubrezi i mozak. Organima je izmerena masa i izvršena je podela moždanog tkiva na mali mozak, moždano stablo, levu i desnu hemisferu, potom su uzorci propisano skladišteni na temperaturi od -20°C i čuvani za dalju laboratorijsku analizu.

1. kontrolna grupa (n=6): fiziološki rastvor 1ml/kg *intra-arterijski* u jednokratnoj dozi
2. grupa (n=6): rastvor eritromicina 50mg/kg *intra-arterijski* u jednokratnoj dozi
3. grupa (n=6): rastvor klindamicina 50mg/kg *intra-arterijski* u jednokratnoj dozi
4. grupa (n=6): rastvor 12-monoketoholne kiseline 4mg/kg *supkutano* 30 minuta pre *intra-arterijske* aplikacije rastvora eritromicina 50mg/kg u jednoj dozi
5. grupa (n=6): rastvor 12-monoketoholne kiseline 4mg/kg *supkutano* 30 minuta pre *intra-arterijske* aplikacije rastvora klindamicina 50mg/kg u jednoj dozi
6. grupa (n=6): rastvor triketoholne kiseline 4mg/kg *supkutano* 30 minuta pre *intra-arterijske* aplikacije rastvora eritromicina 50mg/kg u jednoj dozi
7. grupa (n=6): rastvor triketoholne kiseline 4mg/kg *supkutano* 30 minuta pre *intra-arterijske* aplikacije rastvora klindamicina 50mg/kg u jednoj dozi

U drugom delu eksperimenta praćena je kinetika apsorpcije eritromicina i klindamicina iz digestivnog trakta u prisustvu odabranh derivata žučnih kiselina. Postojala su dva načina administracije antibiotika *intra venski (i.v.)* i *per oralni (p.o.)* dok su žučne soli aplicirane *supkutano (s.c.)* 30 minuta pre primene leka. Uzorci krvi su uzimani 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 120, 180, 240, 360, 420 i 600 minuti od momenta aplikacije leka. Životinje su žrtvovane kardiopunkcijom i uzeti su im jetra, bubrezi i mozak čije mase su odmerene i nakon toga su propisno skladišteni na temperaturi od -20°C.

1. kontrolna grupa (n=6): fiziološki rastvor 1ml/kg *intra-venski* u jednokratnoj dozi
2. grupa (n=6): rastvor eritromicina 50mg/kg *intra-venski* u jednokratnoj dozi
3. grupa (n=6): rastvor klindamicina 50mg/kg *intra-venski* u jednokratnoj dozi

4. grupa (n=6): rastvor 12MKH 4mg/kg *supkutano* 30 minuta pre *intra-venske* aplikacije rastvora eritromicina 50mg/kg u jednoj dozi
5. grupa (n=6): rastvor 12MKH 4mg/kg *supkutano* 30 minuta pre *intra-venske* aplikacije rastvora klindamicina 50mg/kg u jednoj dozi
6. kontrolna grupa (n=6): fiziološki rastvor 1ml/kg *peroralno* u jednokratnoj dozi
7. grupa (n=6): rastvor eritromicina 50mg/kg *peroralno* u jednokratnoj dozi
8. grupa (n=6): rastvor klindamicina 50mg/kg *peroralno* u jednokratnoj dozi
9. grupa (n=6): rastvor 12MKH 4mg/kg *supkutano* 30 minuta pre *peroralne* aplikacije rastvora klindamicina 50mg/kg u jednoj dozi
10. grupa (n=6): rastvor 12MKH kiseline 4mg/kg *supkutano* 30 minuta pre *peroralne* aplikacije rastvora eritromicina 50mg/kg u jednoj dozi
11. grupa (n=6): rastvor TKA kiseline 4mg/kg *supkutano* 30 minuta pre *intra-venske* aplikacije rastvora eritromicina 50mg/kg u jednoj dozi
12. grupa (n=6): rastvor TKA kiseline 4mg/kg *supkutano* 30 minuta pre *intra-venske* aplikacije rastvora klindamicina 50mg/kg u jednoj dozi
13. grupa (n=6): rastvor TKA kiseline 4mg/kg *supkutano* 30 minuta pre *peroralne* aplikacije rastvora klindamicina 50mg/kg u jednoj dozi
14. grupa (n=6): rastvor TKA kiseline 4mg/kg *supkutano* 30 minuta pre *peroralne* aplikacije rastvora eritromicina 50mg/kg u jednoj dozi

Tabela 3.4.1. Grupe oglednih životinja kod *intraarterijske* aplikacije lekova

Grupa	Tretman	Broj životinja
I	Fiziološki rastvor 1mg/kg	6
II	Eritromicin <i>i.a.</i> 50mg/kg	6
III	Klindamicin <i>i.a.</i> 50mg/kg	6
IV	12MKH <i>s.c.</i> 4mg/kg 30 min pre <i>i.a.</i> aplikacije eritromicina	6
V	12MKH <i>s.c.</i> 4mg/kg 30 min pre <i>i.a.</i> aplikacije klindamicina	6
VI	TKA <i>s.c.</i> 4mg/kg 30 min pre <i>i.a.</i> aplikacije eritromicina	6
VII	TKA <i>s.c.</i> 4mg/kg 30 min pre <i>i.a.</i> aplikacije klindamicina	6
Ukupan broj/42		

Tabela 3.4.2. Grupe oglednih životinja kod *intravenske* aplikacije lekova

Grupa	Tretman	Broj životinja
I	Fiziološki rastvor 1mg/kg	6
II	Eritromicin <i>i.v.</i> 50mg/kg	6
III	Klindamicin <i>i.v.</i> 50mg/kg	6
IV	12MKH <i>s.c.</i> 4mg/kg 30 min pre <i>i.v.</i> aplikacije eritromicina	6
V	12MKH <i>s.c.</i> 4mg/kg 30 min pre <i>i.v.</i> aplikacije klindamicina	6
VI	TKA <i>s.c.</i> 4mg/kg 30 min pre <i>i.v.</i> aplikacije eritromicina	6
VII	TKA <i>s.c.</i> 4mg/kg 30 min pre <i>i.v.</i> aplikacije klindamicina	6
Ukupan broj/42		

Tabela 3.4.3. Grupe oglednih životinja kod *per os* aplikacije lekova

Grupa	Tretman	Broj životinja
I	Fiziološki rastvor 1mg/kg	6
II	Eritromicin <i>per os</i> 50mg/kg	6
III	Klindamicin <i>per os</i> 50mg/kg	6
IV	12MKH <i>s.c.</i> 4mg/kg 30 min pre <i>per os</i> aplikacije eritromicina	6
V	12MKH <i>s.c.</i> 4mg/kg 30 min pre <i>per os</i> aplikacije klindamicina	6
VI	TKA <i>s.c.</i> 4mg/kg 30 min pre <i>per os</i> aplikacije eritromicina	6
VII	TKA <i>s.c.</i> 4mg/kg 30 min pre <i>per os</i> aplikacije klindamicina	6
Ukupno/42		

3.5. Pripremanje rastvora klindamicina i eritromicina

Rastvori antibiotika su pripremani neposredno pre izvođenja eksperimenata ili najranije 2h pre momenta aplikacije leka. Rastvori su izrađivani u koncentraciji od 50 mg/ml propisnim rastvaranjem supstance u destilovanoj vodi ili vodi za injekcije. Eritromicin i klindamicin su čuvani na tamnom i suvom mestu pri temperaturi od 4°C.

3.6. Pripremanje rastvora žučnih soli

Keto derivati žučnih soli su čuvani u dobro zatvorenim posudama zaštićeni od direktnog dejstva sunčevih zraka. Pripremanju rastvora se pristupalo neposredno pre ili najranije 2h neposredno pre aplikacije. Rastvori su izrađivani u koncentraciji od 4 mg/ml rastvaranjem soli žučnih kiselina u određenom volumenu vode. S obzirom da su u pitanju natrijumove soli derivata žučnih kiselina one se dobro rastvaraju u vodi.

3.7. Prikupljanje uzoraka za analizu

Tokom eksperimenata koji su izvođeni na laboratorijskim životinjama sakupljani su uzorci krvi i pojedini organi: jetra, bubrezi i mozak sa ciljem da se podvrgnu daljim laboratorijskim analizama.

3.7.1. Prikupljanje uzoraka krvi

Nakon intraarterijske primene leka u *a. axillaris* uzimani su uzorci krvi (150µl) iz *v. jugularis* mikropipetom sa heparizovanim nastavcima u 30, 60, 150 i 240 sekundi od momenta primene leka. Uzorci krvi su skladisteni u obeležene mikroeprovete i centrifugirani tokom 10 minuta na 10 000 obrtaja. Nakon toga pipetirani su serumi i prenošeni u nove obeležene mikroeprovete sa stalcima. Uzorci su čuvani na temperaturi od -20°C do dalje analize.

3.7.2. Prikupljanje uzoraka moždanog tkiva

Moždano tkivo nakon vađenja iz lobanje je disecirano na levu i desnu hemisferu, mali mozak i moždano stablo. Delovi mozga su odmeravani na analitičkoj vagi i nakon toga se pristupilo homogenizaciji uzorka koja se izvodi na homogenizatoru tipa Braun. Odmereni delovi mozga su preneseni u staklene posude za homogenizaciju i na uzorke se dodavao četvorostruki volumen vode od njihove pojedinačne mase. Homogenizacija izvedena uz pomoć Braun homogenizatora sa teflonskim klipom sa vremenom trajanja od 60 sekundi. Homogenizovani uzorci se nakon toga prenose u obeležene epruvete i skladište na temperaturi od -20°C i na taj način čuvaju do dalje laboratorijske analize. Delovi homogenizatora koji su bili u direktnom kontaktu sa samim uzorkom se ispiraju vodom i koncentrovanim etanolom i suše neposredno pre svake upotrebe.

3.8. Tečno-masena spektrometrija (LC-MS)

LC-MS je analitička tehnika veoma široko rasprostranjena u farmakokinetičkim ispitivanjima farmaceutskih proizvoda i stoga najčešće upotrebljavana tehnika u oblasti bioanalize. Ovom tehnikom je moguće dobiti rezultate o brzini eliminacije leka iz krvotoka jetre, pojedinih organa i delova tela. Maseni spektrometar doprinosi skraćanju vremena trajanja analize i povećava osetljivost i specifičnost izabrane metode. LC-MS tehnika je danas široko rasprostranjena i u različitim fazama oblasti razvoja lekova uključujući mapiranje peptida, glikoproteina, analizi prirodnih proizvoda, *in vivo* analitici lekova i njihovih metabolita, identifikaciji nečistoća, kvantitativnoj bioanalizi i kontroli kvaliteta.

3.9. Priprema kolone za analitičku proceduru

U toku rada na LC-MS spektrometru korišćena je Zorbax ODS Solvent saver (3,0x150mm 5-micron) kolona sa ODS predkolonom (Zorbax; 20mm x 2.1 mm, 5 jam).. Pre početka analize uzoraka kolona je ispirana mobilnom fazom do stabilizacije bazne linije i uz delimično povećanje protoka od 100-300 µl /min. Nakon završetka analitičkih merenja kolona je ispirana smešom methanol voda u odnosu 1:1

3.10. LC-MS analitička procedura korišćena u toku analize koncentracije eritromicina u tkivima jetre, bubrega i mozga

Za analizu uzoraka tkiva jetre, bubrega i mozga korišćena je ranije publikovana metoda (*Batt and Aga, 2005*). Po istim principima rađeno je i određivanje koncentracije eritromicina u tkivu jetre, mozga, bubrega i u serumu. Korišćena je Zorbax ODS Solvent saver (3,0x150mm 5-micron) kolona sa ODS predkolonom (Zorbax; 20mm x 2.1 mm, 5 jam). Mobilna faza je za klindamicin i eritromicin bila ista sastojala od **A**: mravlje kiseline 0,1% i vode i **B**: acetonitrila. Protok je iznosio 300µl/min-gradijent. Analiza je vršena na 25 °C.

3.11. LC-MS analitička procedura korišćena u toku analize koncentracije klindamicina u tkivima jetre, bubrega i mozga

Određivanje koncentracije eritromicina i klindamicina vršeno je na LC-MS uređaju po ranije publikovanom metodu (*Zarghi et al., 2003*). Jednaki hromatografski uslovi su korišćeni za određivanje koncentracije leka u serumu i u moždanom tkivu. Korišćena je Zorbax ODS kolona solvent saver (3,0x150mm, 5 mikron) sa ODS predkolonom (Zorbax; 20mm x 2.1 mm, 5µm). Mobilna faza se sastojala od **A**: voda i 0,1% mravlja kiselina i **B**: acetonitril. Protok je iznosio 300 µl/min. Analiza je vršena na 25 °C.

3.12. Priprema uzoraka jetre, bubrega i mozga za LC-MS analize

Prilikom pripreme uzoraka uzimano je po 500 µl homogenata tkiva jetre, bubrega i mozga. Na pojedinačne uzorke dodavano je po 2 ml hloroforma i uzorci su stavljeni na vortex

tokom 30 s. Nakon toga uzorci su centrifugirani na 3000 obrtaja u trajanju od 10 min da bi se odvojilo po 150 μ l hloroformskog sloja po uzorku. Potom je usledilo uparavanje na vodenom kupatilu u struji azota. Upareni uzorci su rekonstituisani sa po 100 μ l metanola.

3.13. Priprema uzoraka seruma za LC-MS analize

Uzorci seruma životinja kojima je davan eritromicin i klindamicin su pripremani na isti način. Odmeravano je po 40 μ l seruma na koji je dodavano po 80 μ l acetonitrila predviđenog za LC-MS. Uzorci su centrifugirani na 3000 obrtaja u trajanju od 10 min da bi se odvojilo po 90 μ l supernatanta nakon centrifugiranja.

3.14. Podešavanje sastava mobilne faze

Mobilna faza se sastojala od dve komponente:

Komponenta A : voda + 0,1% mravlje kiseline

Komponenta B : acetonitril

Ovakva mobilna faza je korišćena prilikom analize uzoraka u kojima je detektovan eritromicin i kod životinja koje su dobijale klindamicin, a razlike su postojale samo u gradijentu.

Tipični solvensi koji se koriste u LC-MS hromatografiji su voda acetonitril, metanol, etanol i hloroform dok se pH vrednosti mobilne faze najčešće podešavaju primenom organskih kiselina u niskim koncentracijama kao što su mravlja ili sirćetna. Upotreba pufera koji sadrže natrijumove jone se generalno izbegava jer mogu da dovedu do kontaminacije jonskog izvora. Umesto njih se najčešće koriste: amonijum acetat, amonijum formijat i bikarbonat.

3.14.1. Tabela Prikaz sastava mobilne faze koji je korišćen prilikom za analizu uzoraka životinja koje su dobijale eritromicin

ERITROMICIN

Vreme (min)	A	B
0,00	90	10
0,5	90	10
1,0	80	20
9,0	5	95
9,1	90	10
13,0	90	10

3.14.1. Tabela Prikaz sastava mobilne faze koji je korišćen prilikom za analizu uzoraka životinja koje su dobijale klindamicin

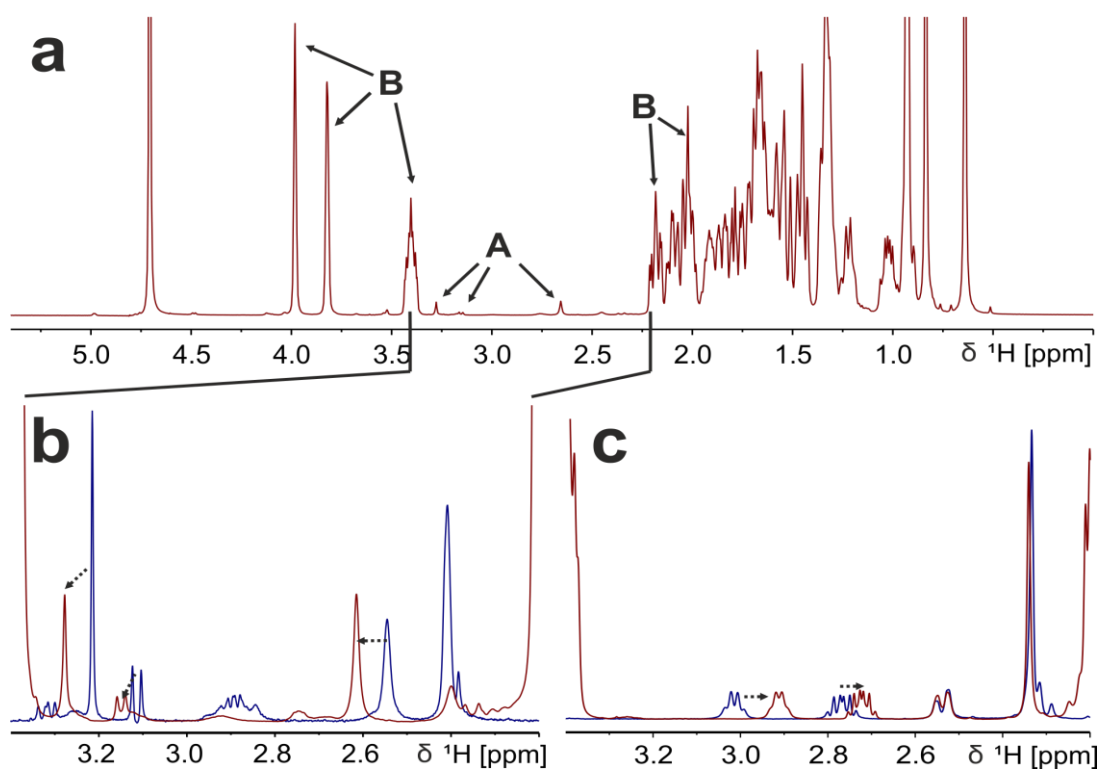
KLINDAMICIN

Vreme (min)	A	B
0,00	90	10
0,5	90	10
1,0	80	20
9,0	5	95
9,1	90	10
13,0	90	10

4. REZULTATI

4.1. Vezivanje makrolidnih antibiotika za micelle žučnih soli

Informacije o interakciji makrolidnih antibiotika sa micelama žučnih soli mogu se dobiti NMR titracionim merenjima. Na zabeleženim protonskim (^1H)NMR spektrima dominira veliki signal koji potiče od žučnih soli koje su pri merenjima korišćene u koncentracijama od 50-100 mM dok je koncentracija makrolida u zasićenom rastvoru iznosila od 1-2 mM. U tipičnim NMR studijama interakcija malih molekula sa micelama uglavnom se koriste deuterizovani lipidi i deterdženti što značajno umanjuje pojavu kasnijih signala. Nažalost žučne kiseline nisu dostupne u deuterizovanoj formi stoga sve informacije o vezivanju makrolida za micelle žučnih soli moraju biti ekstrahovane iz snimljenih spektara. Ovo je prva studija interakcije neobebeženih liganada sa nedeuterisanim micelama. Dodatak žučnih soli dovodi do značajnih promena u spektrima svih makrolidnih antibiotika (Slika 4).



Slika 4.1.a) 1D ^1H NMR spektar azitromicin dihidrata u 100mM rastvoru natrijum holata

Svi intenzivni pikovi su obeleženi sa B i pripadaju žučnim solima dok je samo mali deo od 2.2-3.4 ppm otvoren za analizu signala koji potiču od makrolidnih antibiotika označen sa A. b) uveličan deo regiona između 2.2-3.4 ppm gornjeg spektra (crveno) i poredjenja radi

sa spektrom azitromicina u D₂O (plavo). Isprekidana linija pokazuje pomeranje signala slobodnog azitromicina u odnosu na azitromicin vezan za micide. c) Predstavlja uveličanje istog regiona od 2.2-3.4 ppm ali azitromicin aglikona u odsustvu (plavo) i prisustvu (crveno) 100mM natrijum holata.

Vezivanje za micide je indikovano razlikama u hemijskom pomeranju makrolida i proširenju signala kao posledice smanjene pokretljivosti unutar micela. Kod aglikona neki pikovi su pomereni ali oblik signala je manje promenjen što ukazuje na veoma labavu vezu sa micelama. Za kvantitativno opisivanje sposobnosti vezivanja za micide žučnih soli ispitane su mogućnosti vezivanja za već oformljene agregate žučnih soli. Stoga su eksperimentalno određene vrednosti kritične micelarne koncentracije (CMC) za ispitivane žučne soli zbog velikih literaturnih varijacija za njihove vrednosti (8-20 mM za natrijum holat, 3-13 mM za natrijum deoksiholat i 18 mM za natrijum tauroholat), a da bi se dobili ovi podaci u D₂O kao solvensu korišćena je DOSY spektroskopska metoda. Za ovu svrhu je difuzioni koeficijent različitih žučnih soli određen pri različitim koncentracijama. Na vrednosti CMC micide počinju da se formiraju i ukupni difuzioni koeficijent se smanjuje. U ovim eksperimentim su dobijene vrednosti CMC za natrijum holat 11 mM, natrijum deoksiholat 4 mM i natrijum tauroholat 9 mM koji su u rasponu objavljenih u literaturi. Ove vrednosti CMC mogu biti objašnjene razmatranjem amfifilne prirode žučnih soli. Što je veći broj nepolarnih grupa unutar molekula žučnih soli to je manja rastvorljivost samih molekula a i niže vrednosti CMC. Nedostatak hidroksilne grupe molekula deoksiholata i prisustvo taurina na natrijum tauroholatu redukuje polarnost ovih molekula i stoga njihovu vrednost CMC. Da bi bilo osigurano da se svi eksperimenti izvode na vrednostima iznad CMC za žučne soli korišćeni su rastvori natrijum holata i natrijum deoksiholata u vrednosti 50 mM i 100 mM za natrijum tauroholat. Zbog ograničene rastvorljivosti korišćeni su zasićeni rastvori makrolidnih antibiotika. Stvarne vrednosti koncentracija makrolidnih antibiotika su dobijene poređenjem NMR signala makrolidnih antibiotika i žučnih kiselina poznatih koncentracija. Rastvorljivost makrolidnih antibiotika se smanjuje sledećim redosledom: Azitromicin aglikon > dekladinozilazitromicin > eritromicin > azahomoeritromicin > azitromicin > klaritromicin. Rastvorljivost je slična njihovoj polarnosti. Počevši od eritromicina i azahomoeritromicina sa prosečnom hidrofobnošću proton na O6 i N9 je zamenjen metil grupom u klaritromicinu i azitromicinu čineći ih hidrofobnijim molekulima. Sa druge strane dva šećera kladinoza i dezosamin su polarniji nego ostatak molekula. Uklanjanje šećera (dekladinozilazitromicina i

azitromicin aglikona) povećava polarnost. Informacija o jačini vezivanja makrolidnih antibiotika i micela žučnih soli mogu se dobiti difuzionim merenjima.

U ovom ogledu difuzioni koeficijent makrolidnih antibiotika predstavlja kombinaciju difuzionog koeficijenta slobodnih antibiotika D_f i D_b i vezanih:

$$D_e = D_f \cdot \frac{A_f}{A_t} + D_b \cdot \frac{A_b}{A_t}$$

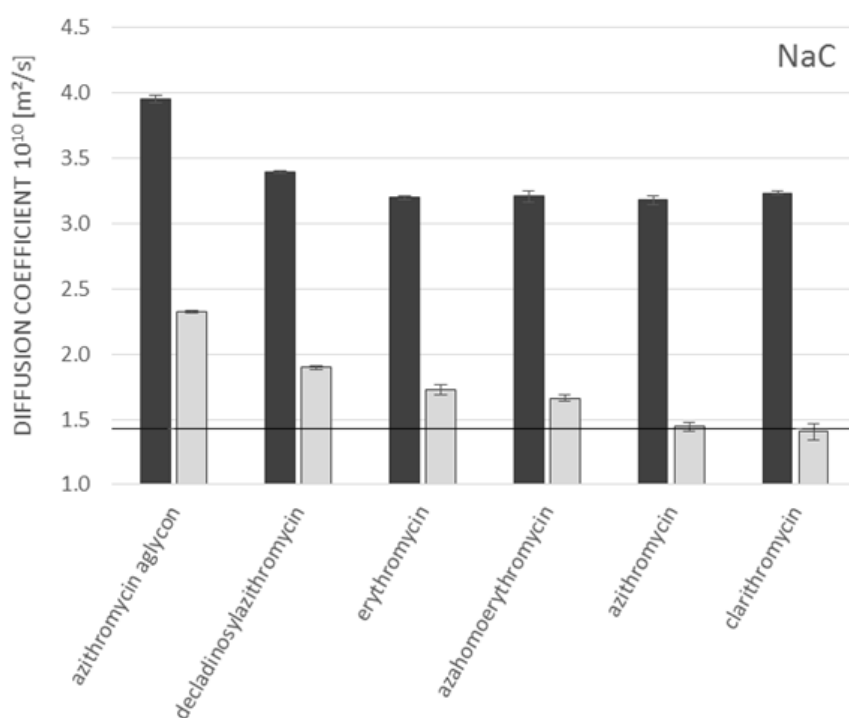
Gde je D_e izmereni difuzioni koeficijent makrolidnih antibiotika, A_b predstavlja molsku frakciju vezanih makrolida, a A_f slobodnih. A_t predstavlja ukupan zbir makrolida u rastvoru ($A_t = A_b + A_f$). Ova matematička formula je takođe validna u slučaju sloli žučnih kiselina. Vrednost micelarnog difuzionog koeficijenta može biti dobijena iz sledeće formule:

$$D_{mic} = D_b = \left(D_e - D_f \cdot \frac{A_f}{A_t} \right) \cdot \frac{A_t}{A_{mic}}$$

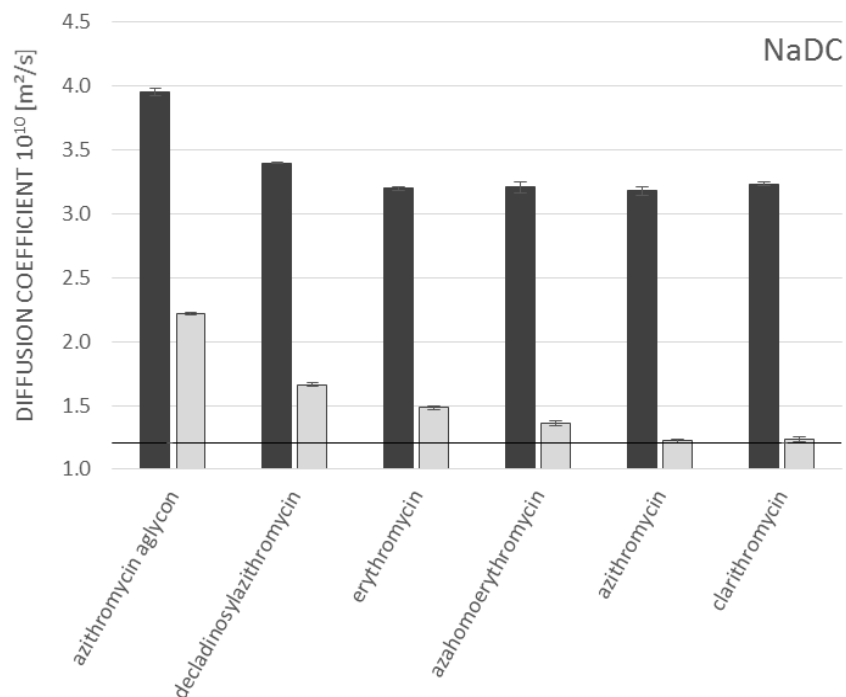
Ovde je koncentracija slobodnih molekula žučnih soli (A_f) vrednost njihove kritične micelarne koncentracije. Sa ovim informacijama D_{mic} se može izračunati za sledeće žučne kiseline redom: $1.44 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, $1.21 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ i $1.22 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ za natrijum holat, natrijum deoksiholat i natrijum tauroholat. Difuziona merenja svih ispitivanih makrolidnih antibiotika sa tri žučne kiseline pokazuju velike razlike između slobodnog antibiotika i antibiotika u smeši sa žučnim kiselinama što ukazuje na jaku interakciju i vezivanje makrolida za micelle žučnih soli. Kod azitromicin aglikona i dekladinofilazitromicina nedostatak šećera smanjuje veličinu njihovog molekula i povećava koeficijent difuzije slobodnog antibiotika. Svi ostali makrolidi pokazuju slična difuziona svojstva. Dodatak svake od tri navedene žučne soli ima sličan efekat na difuzioni koeficijent antibiotika. Iako su difuzioni koeficijenti za azitromicin aglikon i dekladinofilazitromicin drastično smanjeni u prisustvu žučnih soli ovo može biti objašnjeno njihovom većom polarnošću. Sa druge strane klaritromicin i azitromicin imaju difuzioni koeficijent veoma blizak difuzionom koeficijentu micela žučnih soli što ukazuje na njihovo čvršće vezivanje. Eritromicin i azahomoeritromicin se takođe vezuju za micelle ali u manjem obimu ostaju slobodni u rastvoru.

4.2. Poređenje vrednosti difuzionog koeficijenta ispitivanih makrolidnih antibiotika

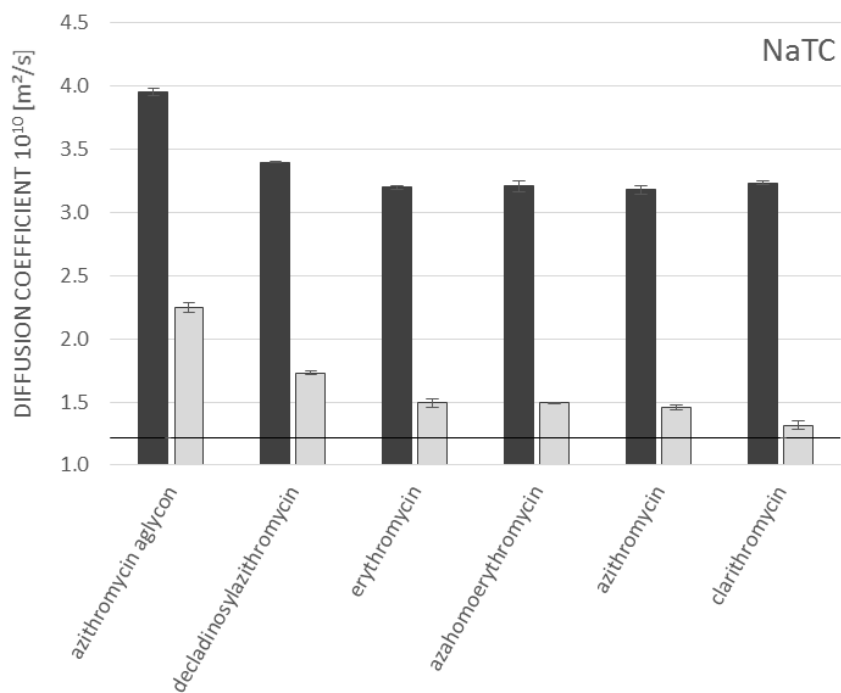
Eksperimentalno su određivane vrednosti difuzionog koeficijenta: azitromicin aglikona, dekladinosilazitromicina, eritromicina, azahomoeritromicina, azitromicina i klaritromicina kao slobodnih molekula a nakon toga i u rastvorima u prisustvu odabranih soli žučnih kiselina.



Grafikon 4.2.1. Difuzioni koeficijent slobodnog antibiotika (crno) i u prisustvu natrijum holata (sivo). Horizontalna linije predstavlja D_{mic} vrednost za date antibiotike i natrijum holat



Grafikon 4.2.2. Difuzioni koeficijent slobodnog antibiotika (crno) i u prisustvu natrijum deoksiholata (sivo). Horizontalna linije predstavlja D_{mic} vrednost za date antibiotike i natrijum deoksiholat



Grafikon 4.2.3. Difuzioni koeficijent slobodnog antibiotika (crno) i u prisustvu natrijum tauroholata (sivo). Horizontalna linije predstavlja D_{mic} vrednost za date antibiotike i natrijum tauroholat

Kvantitativni odnos o jačini vezivanja između micela i liganada vrlo često se izražava preko mol frakcionog particionog koeficijenta K_p koji predstavlja odnos između vezanog i slobodnog liganda molekula. Može se dobiti difuzionim merenjima slobodnog i vezanog liganda (makrolida) za žučne micidele.

$$K_p = \frac{A_b}{A_f} = \frac{D_e - D_f}{D_{mic} - D_e}$$

Gde D_e , D_f i D_{mic} se odnose na difuzione koeficijente antibiotika u žučnoj soli, slobodnog antibiotika i slobodne micidele žučne soli. Kod veoma čvrstog vezivanja antibiotika za micidele žučnih soli difuzioni koeficijent D_e ima vrednost veoma blisku D_{mic} što čini K_p vrednost skolnu grešci. Dakle, može biti data samo gornja granična vrednost. Ovo je slučaj za azitromicin i klaritromicin u prisustvu holata i deoksiholata. Koristeći gornju granicu standardne devijacije D_e i donju granicu za D_f moguće je izračunati minimalnu vrednost za K_p (>40 za ova dva antibiotika za NaC i NaDC).

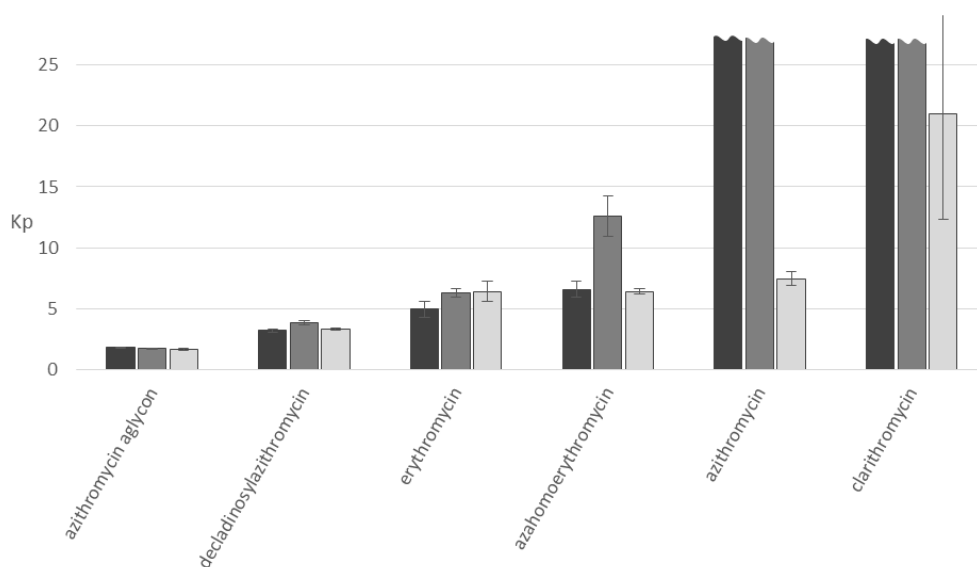
Tabela 4.2.4. Molarni frakcioni particioni koeficijent NaC 100mM, NaDC 50mM and NaTC 50mM.

* K_p vrednosti iznad ~40 su nepouzdana zbog velike standardne devijacije

	azithromycin aglycone	decladinosyl- azithromycin	erythromycin	azahomo- erythromycin	azithromycin	clarithromycin
NaC	1,82 +/- 0,04	3,22 +/- 0,12	4,94 +/- 0,64	6,60 +/- 0,63	> 42.5 *	> 60.9*
NaDC	1,71 +/- 0,03	3,83 +/- 0,16	6,29 +/- 0,38	12,6 +/- 1,66	> 68.2 *	> 41.2 *
NaTC	1,67 +/- 0,08	3,31 +/- 0,12	6,40 +/- 0,85	6,39 +/- 0,22	7,47 +/- 0,53	21,0 +/- 8,72

Zbog veoma visoke polarnosti azitromicin aglikona odnos slobodnog i vezanog oblika molekula je najniži od svih testiranih makrolidnih antibiotika. Dodatak šećerne jedinice kod dekladinozilazitromicina podiže K_p od 3-5. Eritromicin i azahomoeritromicin se vezuju čvrsto za micidele žučnih soli samo 10-20% ostaje kao slobodan molekul. Praktično sva količina azitromicina i klaritromicina je vezana za micidele što donosi vrednost K_p preko 40. Ovo može

biti objašnjeno njihovom hidrofobnošću što čini rastvaranje molekula u vodenoj vazi energetski nepovoljnim.



Grafikon 4.2.5. Vrednosti molarnih frakcionih particionih koeficijenata su predstavljene grafički pri čemu se jasno vidi da tabelarno opisane vrednosti ne mogu biti jasno definisane ukoliko dosežu iznos iznad 40

4.3. Vrednosti parametara molekularne lipofilnosti dobijenih primenom normalno-fazne tankoslojne hromatografije (NP TLC)

Vrednosti retencionih konstanti su izračunate prema sledećoj formuli:

$$R_m = \log(1/R_f - 1)$$

gde R_f predstavlja vrednost retencionog faktora. R_m vrednosti linearno zavise od vrednosti logaritma koncentracije organskog modifikatora u mobilnoj fazi prema relaciji:

$$R_m = R_m^0 + b \log C$$

dok R_m^0 predstavlja vrednost odsečka na y osi kada je koncentracija modifikatora jednaka nuli, a b nagib linearne korelacije; specifična hidrofobna površina supstance.

Tabela 4.3.1. Vrednosti R_m^0 i b u zavisnosti od sastava razvijaača u NP TLC hromatografiji.

Jedinjenje	R_m^0 (tol/et)	R_m^0 (tol/bu)	b (tol/et)	b (tol/bu)
Deoksiholna kiselina	1,24	1,45	-0,69	-0,92
Henodeoksiholna kiselina	1,21	1,43	-0,71	-0,94
3 α -hidroksi-12-okso-5 β -holanska kiselina	1,05	1,24	-0,62	-0,80
3 α -hidroksi-7-okso-5 β -holanska kiselina	1,02	1,21	-0,6	-0,8
3 α -hidroksi-7,12-diookso-5 β -holanska kiselina	0,53	0,74	-0,27	-0,49
12 α -hidroksi-3,7-diookso-5 β -holanska kiselina	0,36	0,54	-0,21	-0,37
3,7,12-Triokso-5 β -holanska kiselina	0,48	0,64	-0,28	-0,43
Hiodeoksiholna kiselina	1,08	1,22	-0,63	-0,81
Ursodeoksiholna kiselina	1,23	1,44	-0,72	-0,92

4.4. *In silico* vrednosti podeonog koeficijenta i korelacije njihovih vrednosti sa vrednostima retencionih konstanti R_m^0 i b

Logaritam podeonog koeficijenta, $\log P$ određen je *in silico*, korišćenjem različitih platformi dostupnih putem interneta (<https://ilab.acdlabs.com/iLab2/>, www.molinspiration.com i <http://preadmet.bmdrc.kr/adme/>) kao i ChemBioDraw Ultra 14.0 i COSMOquick softvera. Korišćeni softverski paketi se međusobno razlikuju prema različitim algoritmima na kojima se zasniva računanje vrednosti $\log P$.

Tabela 4.4.1. Log P vrednosti dobijene *in silico* za različite žučne kiseline i njihove derivate

Jedinjenje	ClogP ^a	logK _(o/w) ^b	ACDlogP ^c	milogP ^d	SKlogP ^e
Deoksiholna kiselina (1)	4,51	3,82	4,66	4,25	3,86
Henodeoksiholna kiselina (2)	4,51	3,6	4,66	4,25	3,8
3 α -hidroksi-12-okso-5 β -holanska kiselina (3)	4,11	3,39	4,08	4,06	3,81
3 α -hidroksi-7-okso-5 β -holanska kiselina (4)	4,11	3,65	4,25	4,06	3,69
3 α -hidroksi-7,12-diookso-5 β -holanska kiselina (5)	2,36	2,76	2,22	2,96	2,622
12 α -hidroksi-3,7-diookso-5 β -holanska kiselina (6)	1,99	1,93	2,09	2,96	2,4
3,7,12-triookso-5 β -holanska kiselina (7)	2,33	2,38	1,77	2,77	2,41
Hiodeoksiholna kiselina (8)	4,51	3,6	5	4,25	3,79
Ursodeoksiholna kiselina (9)	4,51	3,8	4,66	4,25	3,8

a - ChemBioDraw Ultra 14.0

b - COSMOquick

c - ACD/I-LAB

d - Molinspiration

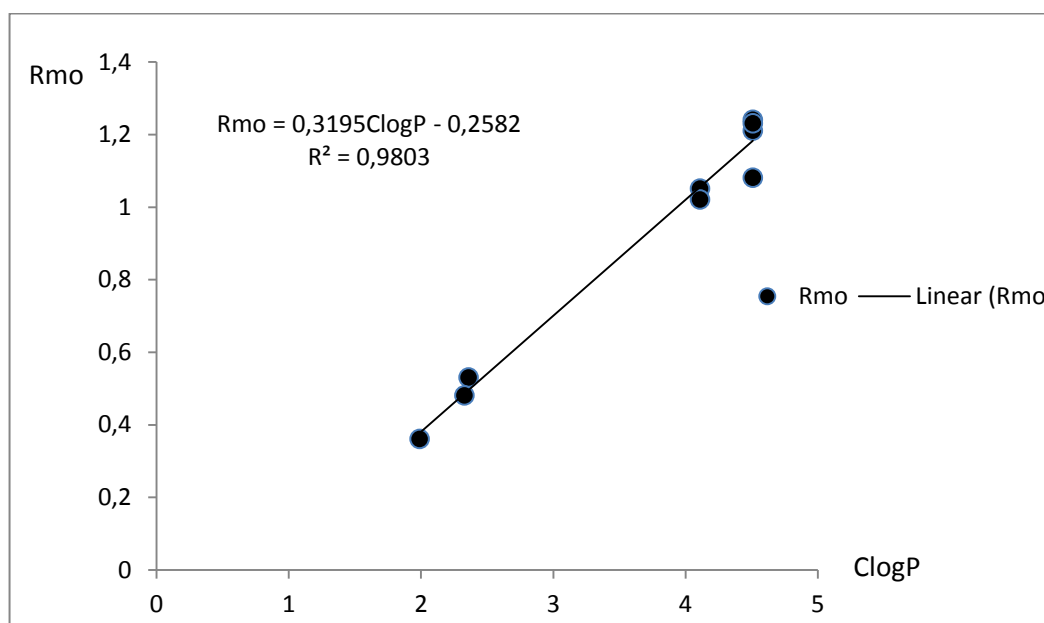
e - PreADMET

Tabela 4.4.2. Zavisnost retencionog parametra b od softverski izračunatih $\log P$ pri čemu je korišćen toluen/etanol kao razvijajč

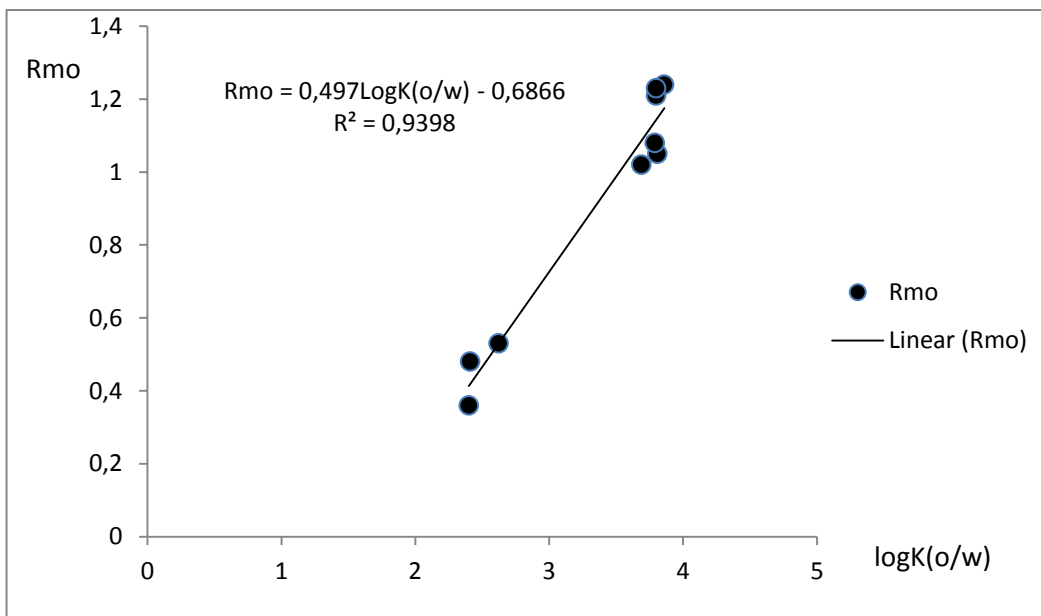
b vs. $\log P$	Jednačina	r^2	p
b -ClogP	$b=0,324ClogP-0,09$	0,95	$4,18 \times 10^{-6}$
$\log K_{(o/w)}$	$b=0,51 \log K_{(o/w)}-0,534$	0,924	$2,17 \times 10^{-5}$
ACDlogP	$b=0,266ACDlogP+0,113$	0,894	$7,245 \times 10^{-5}$
milogP	$b=0,5milogP+1,9$	0,985	$6,25 \times 10^{-8}$
SklogP	$b=0,98SKlogP+0,481$	0,98	$2,282 \times 10^{-7}$

Tabela 4.4.3. Zavisnost retencionog parametra b od softverski izračunatih $\log P$ pri čemu je korišćen toluen/butanol kao razvijajč

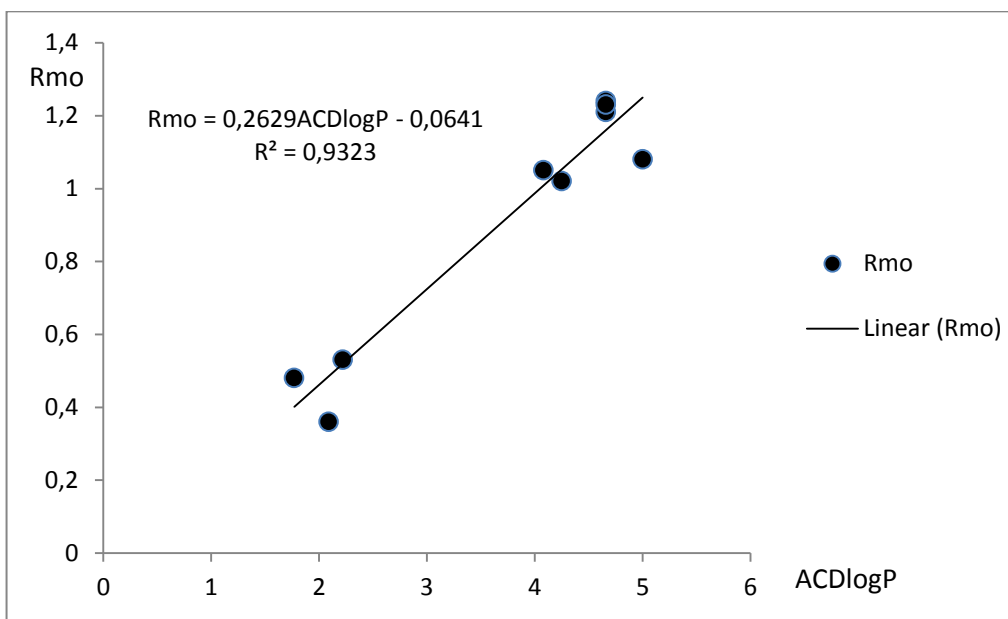
b vs. $\log P$	Jednačina	r^2	p
b -ClogP	$b=0,026-0,204ClogP$	0,96	$1,47 \times 10^{-6}$
b - $\log K_{(o/w)}$	$b=0,303-0,318 \log K_{(o/w)}$	0,93	$1,97 \times 10^{-5}$
b -ACDlogP	$b=-0,168ACDlogP-0,097$	0,91	$3,671 \times 10^{-5}$
b -milogP	$b=0,547-0,34milogP$	0,94	$1,06 \times 10^{-5}$
b -SklogP	$b=0,4-0,333SklogP$	0,94	$7,42 \times 10^{-6}$



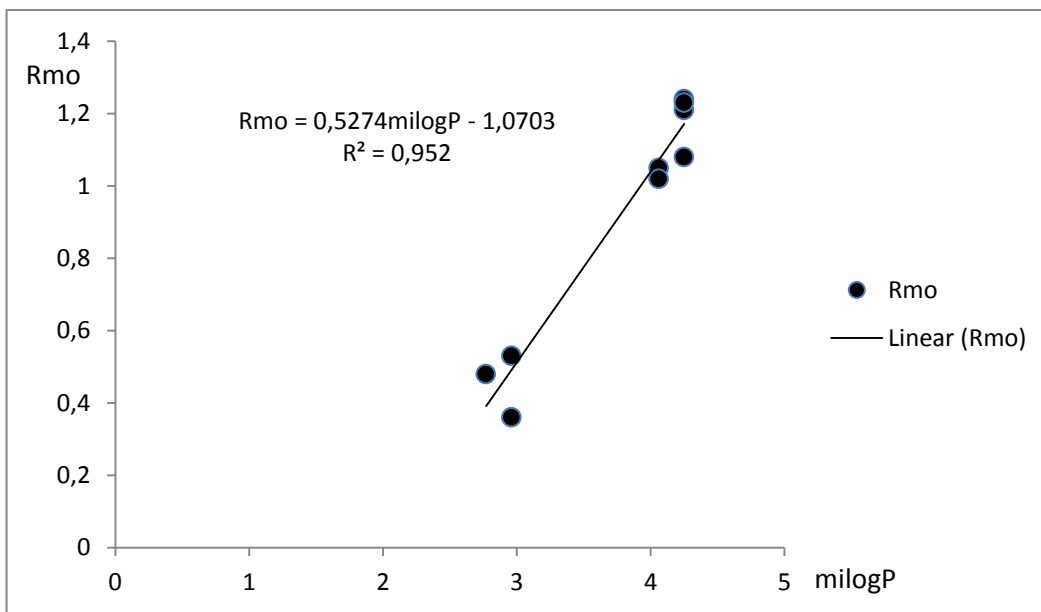
Slika 4.4.1. Korelacija između vrednosti retencione konstante R_m^0 (tol./et.) i ClogP



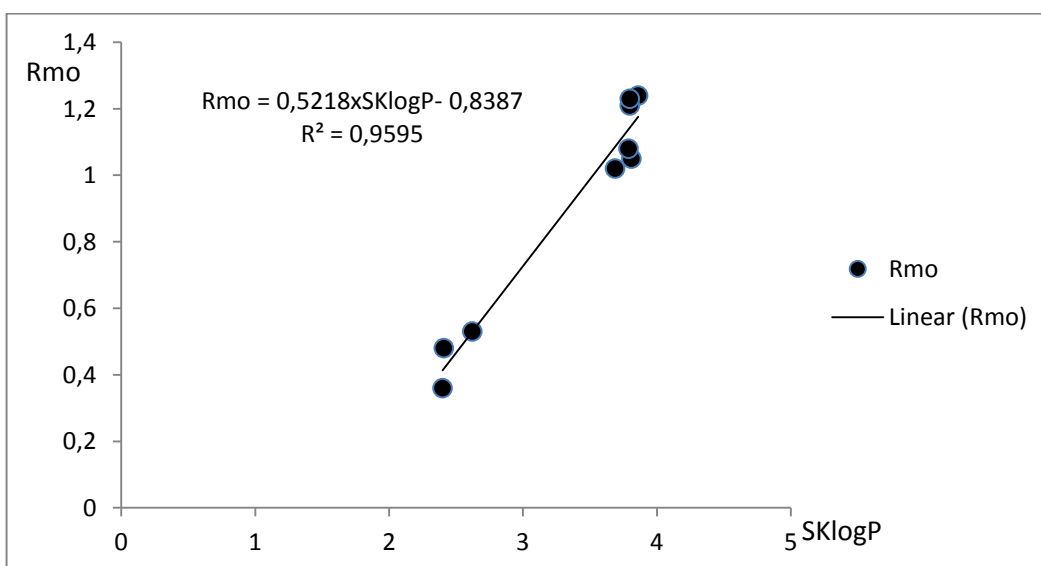
Slika 4.4.2. Korelacija između vrednosti retencione konstante $R_{m0}^{(tol./et.)}$ i $\log K_{(o/w)}$



Slika 4.4.3. Korelacija između vrednosti retencione konstante $R_{m0}^{(tol./et.)}$ i $ACDlogP$



Slika 4.4.4. Korelacija između vrednosti retencione konstante R_{m0} (tol./et.) i $\text{milog}P$



Slika 4.4.5. Korelacija između vrednosti retencione konstante R_{m0} (tol./et.) i $\text{SKlog}P$

4.5. Određivanje vrednosti parametara pravila po Lipinskom

Pravilo Lipinskog ili "Pravilo pet" se odnosi na utvrđivanje svojstava lekova koja su neophodna da bi dotični molekuli mogli da se primene *per os* i pri tome ispune svoje farmakološko delovanje. Ispitivana supstanca treba da ispunjava minimalno tri kriterijuma ustanovljenih pravilom po Lipinskom da bi došlo do adekvatne apsorpcije, distribucije, ekskrecije, kao i adekvatnog metabolizma (Ghose et al., 1999):

1. da ne sadrži više od 5 donora vodonika (izražava se kao suma OH- i NH-grupa);
2. da nema više od 10 akceptora vodonika (izražava se kao suma N i O);
3. da ima molekulsku masu ispod 500 D;
4. da je izračunato $\log P$ manje od 5
5. ako se kao deskriptor lipofilnosti koristi $M\log P$ onda treba da je $M\log P < 4,15$

Prilikom utvrđivanja parametara ustanovljenih po Lipinskom na ispitivanjih 9 molekula žučnih kiselina i njihovih derivata ustanovljeno je da ni jedan molekul ne odstupa od ovog pravila.

4.6. Vrednosti farmakokinetičkih deskriptora utvrđenih *in silico* i njihova korelacija sa retencionim parametrima

Tabela 4.6.1. Vrednosti farmakokinetičkih parametara dobijene primenom različitih softvera

Jedinjenje	logBB	HIA%	MDCK	PPB%	SP	PE jejunum (cm/s) pH=6,5	Vd(l/kg)
1	-0,89	92.972705	0.294094	100.000000	-2.675	4.67×10^{-4}	0,39
2	-0,88	92.972705	0.294094	100.000000	-2.675	4.72×10^{-4}	0,39
3	-0,61	96.127093	0.284594	99.724290	-2.255	$6,29 \times 10^{-4}$	0,37
4	-0,6	96.127093	0.330546	96.790734	-2.430	$6,32 \times 10^{-4}$	0,38
5	-0,63	93.903841	0.44108	88.144062	-2.921	$5,38 \times 10^{-4}$	0,35
6	-0,62	93.903801	0.667141	86.596872	-3.199	$5,46 \times 10^{-4}$	0,35
7	-0,62	95.900496	0.711512	86.418210	-2.970	5.82×10^{-4}	0,33
8	-0,88	92.972770	0.0724351	100.000000	-2.735	$4,72 \times 10^{-4}$	0,39
9	-0,88	92.9792	0.294094	100.000000	-2.675	$4,72 \times 10^{-4}$	0,39

In silico određeni parametri primenom softvera:

PreADMET(HIA-Human intestinal absorption, MDCK- in vitro MDCK cell permeability (Mandin Darby Canine Kidney),PPB- Plasma Protein Binding,SP-Skin Permeability)

ACD/I-lab(LogBB-logaritam prolaska kroz krvno-moždanu barijeru, PE jejunum-prolazak u jejunum, Vd-volumen distribucije

Računarskim putem dobijene vrednosti farmakokinetičkih parametara su dalje korelirane sa vrednostima retencionih konstanti R_m^0 i b primenom višestruke regresione analize. Pri tome su ustanovljene visoke vrednosti korelacije ispitivanih parametara i opisane nizom dobijenih jednačina koje govore u prilog tome.

$$\text{LogBB} = -0,515R_m^0(\text{tol/et}) - 0,017\text{TPSA} - 0,014\text{Mw} + 6,879 \quad (r^2=0,792, F=11,17, p=0,012)$$

(Jednačina 4.6.1.)

$$\text{MDCK} = 0,252R_m^0(\text{tol/et}) + 0,028\text{TPSA} - 0,036V + 11,95 \quad (r^2=0,684, F=6,785, p=0,0326)$$

(Jednačina 4.6.2.)

$$\text{HIA}\% = -2,05R_m^0(\text{tol/et}) - 0,155\text{TPSA} - 0,356\text{Mw} + 249,355 \quad (r^2=0,961, F=67,844, p=1,797 \times 10^{-4})$$

(Jednačina 4.6.3.)

$$\text{SP} = 0,236R_m^0(\text{tol/et}) - 0,03\text{TPSA} - 0,032\text{Mw} = 12,19 \quad (r^2=0,79, F=11,064, p=0,012)$$

(Jednačina 4.6.4.)

$$\text{PPB} = 5,086R_m^0(\text{tol/et}) - 0,52\text{TPSA} + 0,452\text{Mw} - 45,56 \quad (r^2=0,98, F=114,24, p=4,025 \times 10^{-5})$$

(Jednačina 4.6.5.)

$$\text{PPB} = 3,77R_m^0(\text{tol/bu}) + 3,383\text{TPSA} - 4,75\text{Mw} + 1696,05 \quad (r^2=0,975, F=107,315, p=5,86 \times 10^{-5})$$

(Jednačina 4.6.6.)

$$\text{PPB} = -25,95b(\text{tol/et}) - 0,013\text{TPSA} + 90,89 \quad (r^2=0,96, F=92,19, p=3,13 \times 10^{-5})$$

(Jednačina 4.6.7.)

$$\text{PPB} = -20,045b(\text{tol/bu}) - 0,246\text{TPSA} + 100,912 \quad (r^2=0,952, F=80,182, P=4,691 \times 10^{-5})$$

(Jednačina 4.6.8.)

$$\text{Vd} = -0,011R_m^0(\text{tol/et}) + 0,032\text{TPSA} - 0,042\text{Mw} + 14,302 \quad (r^2=0,979, F=125,776, p=3,966 \times 10^{-5})$$

(Jednačina 4.6.9.)

$$Vd = -0,07R_m^0(\text{tol/bu}) + 0,031TPSA - 0,04Mw + 13,833 \quad (r^2=0,978, F=119,29, p=4,518 \times 10^{-5})$$

(Jednačina 4.6.10.)

$$Vd = -0,135R_m^0(\text{tol/et}) + 0,001TPSA + 0,212 \quad (r^2=0,827, F=20,096, p=0,002)$$

(Jednačina 4.6.11.)

$$Vd = -0,109R_m^0(\text{tol/bu}) + 5,314 \times 10^{-4} + 0,25 \quad (r^2=0,84, F=21,59, p=0,002) \quad (\text{Jednačina 4.6.12.})$$

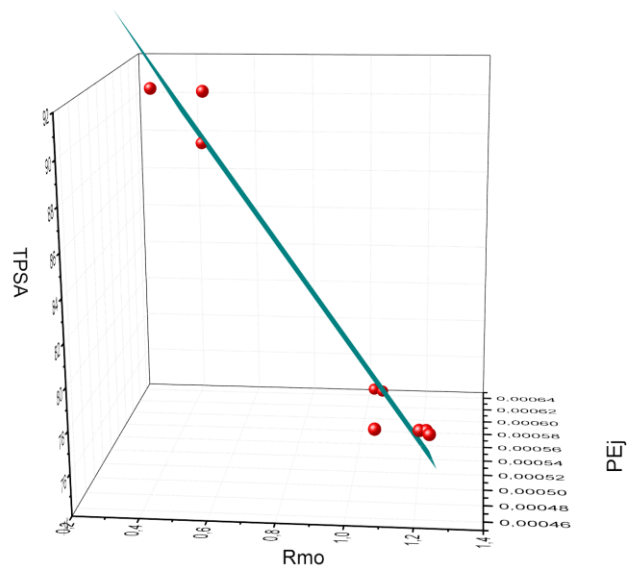
$$Pe_{\text{jejunum}} = -2,367R_m^0 - 9,441TPSA + 9,89 \times 10^{-5}Mw - 0,031 \quad (r^2=0,831, F=14,165, p=0,007)$$

(Jednačina 4.6.13.)

Gde su TPSA-total polar surface area, Mw-molecular weight i V-volume of molecule. Ove vrednosti su prikazane tabelarno, a izračunate su primenom Molinspiration softvera.

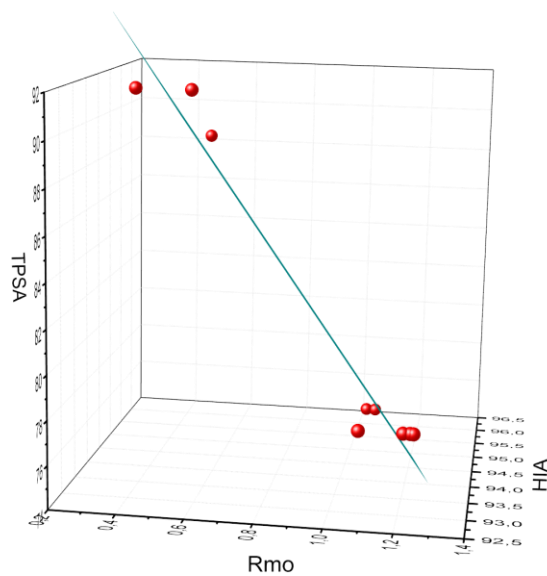
Tabela 4.6.2. Predstavljene su *in silico* dobijene vrednosti TPSA, Mw i V

Jedinjenje	TPSA	Mw	V
1	77,75	392,58	397,63
2	77,75	392,58	397,63
3	74,6	390,56	391,77
4	74,6	390,56	391,77
5	91,67	404,55	393,95
6	91,67	404,55	393,95
7	88,51	402,53	388,09
8	77,75	392,58	397,63
9	77,75	392,58	397,63



Slika4.6.1. Model višestruke regresione analize PE jejunum sa TPSA i R_m^0 (tol/et)

(Izvor OriginPro 2016)



Slika4.6.2. Model višestruke regresione analize HIA sa TPSA i R_m^0 (tol/et)

(Izvor OriginPro 2016)

4.7. Vrednosti nivoa eritromicina u krvi nakon *intra-arterijske* aplikacije leka

Prilikom i.a. aplikacije eritromicina uzorci krvi su uzimani iz *v. jugularis* u sledećim vremenskim intervalima: neposredno nakon same aplikacije leka, 30s nakon uzimanja prvog uzorka, 60s, 150s i 240 s nakon uzimanja prvog uzorka krvi. Vrednosti koncentracije leka u dotičnim vremenimskim intervalima su prikazane tabelarno.

Tabela 4.7.1. Vrednosti eritromicina u krvi nakon *i.a.* aplikacije izražene u mcg/ml

Neposredno nakon aplikacije leka	30s od momenta aplikacije	60s od momenta aplikacije	150s od momenta aplikacije	240 sekundi od momenta aplikacije	
1,367	50,280	16,096	11,660	12,402	
1,819	2,614	4,160	3,526	2,643	
1,070	6,443	4,268	4,197	3,818	
1,319	1,906	3,747	8,015	4,753	
3,391	4,001	4,568	3,185	2,898	
1,233	4,703	3,211	3,220	2,863	
1,700	11,658	6,008	5,634	4,896	Prosečna vrednost

Tabela 4.7.2. Vrednosti eritromicina u krvi nakon prethodne primene natrijumove soli TKA kiseline izražene u mcg/ml

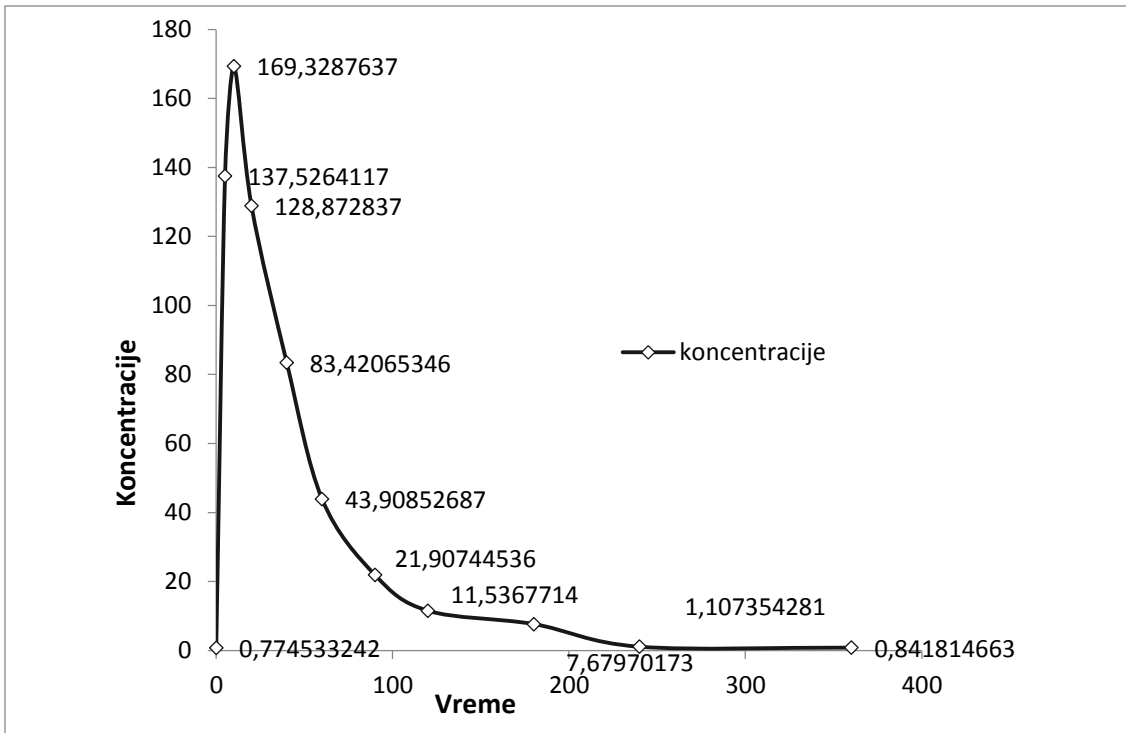
Neposredno nakon aplikacije leka	30s od momenta aplikacije	60s od momenta aplikacije	150s od momenta aplikacije	240 sekundi od momenta aplikacije	
1,362	3,470	7,615	5,281	5,693	
1,857	19,068	17,235	6,325	6,660	
1,735	3,866	4,947	4,124	4,221	
2,747	11,579	26,285	12,374	9,322	
2,639	4,223	3,166	3,028	3,113	
3,721	4,486	5,693	7,374	3,954	
2,343	7,782	10,823	6,418	5,494	Prosečna vrednost

Tabela 4.7.3. Vrednosti eritromicina u krvi nakon prethodne primene natrijumove soli 12MKH kiseline izražene u mcg/ml

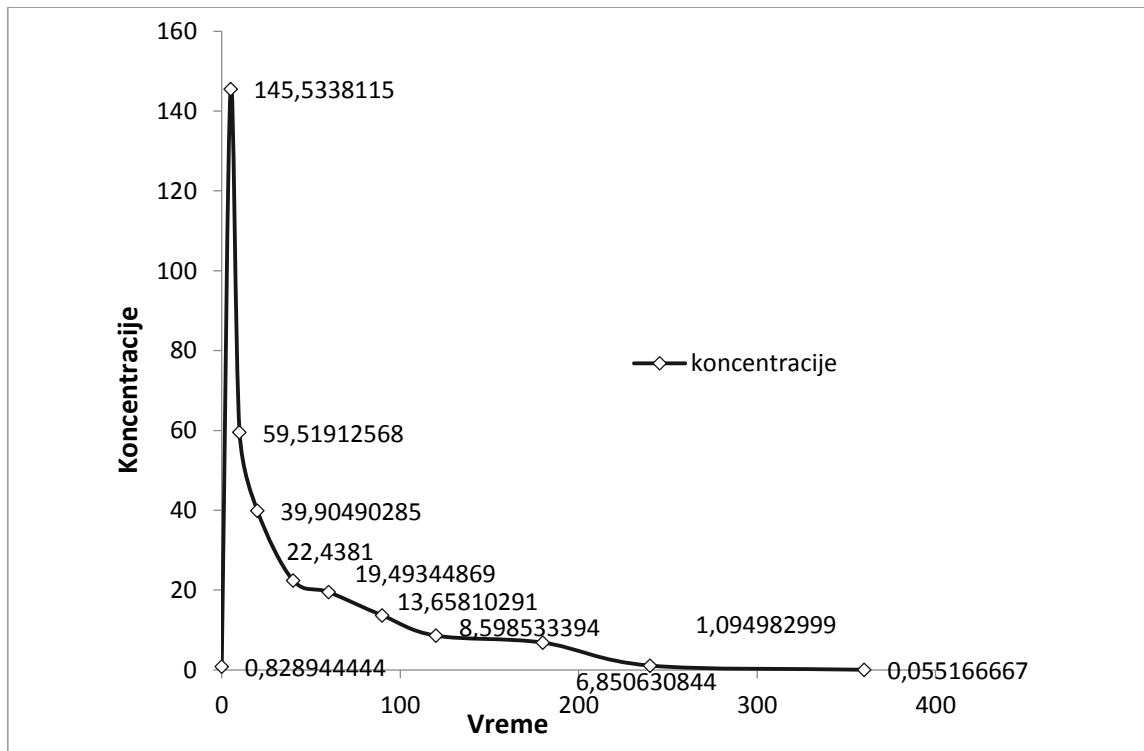
Neposredno nakon aplikacije leka	30s od momenta aplikacije	60s od momenta aplikacije	150s od momenta aplikacije	240 sekundi od momenta aplikacije	
4,271	5,645	4,889	9,204	7,490	
2,541	4,490	5,615	6,144	2,917	
1,797	25,936	28,036	36,302	10,479	
0,864	5,572	14,702	-	8,723	
-	80,251	59,816	33,124	26,798	
3,977	6,784	6,708	5,654	4,447	
2,690	21,446	19,961	18,086	10,142	Prosečna vrednost

4.8. Vrednosti nivoa eritromicina u krvi nakon *intra-venske* aplikacije leka

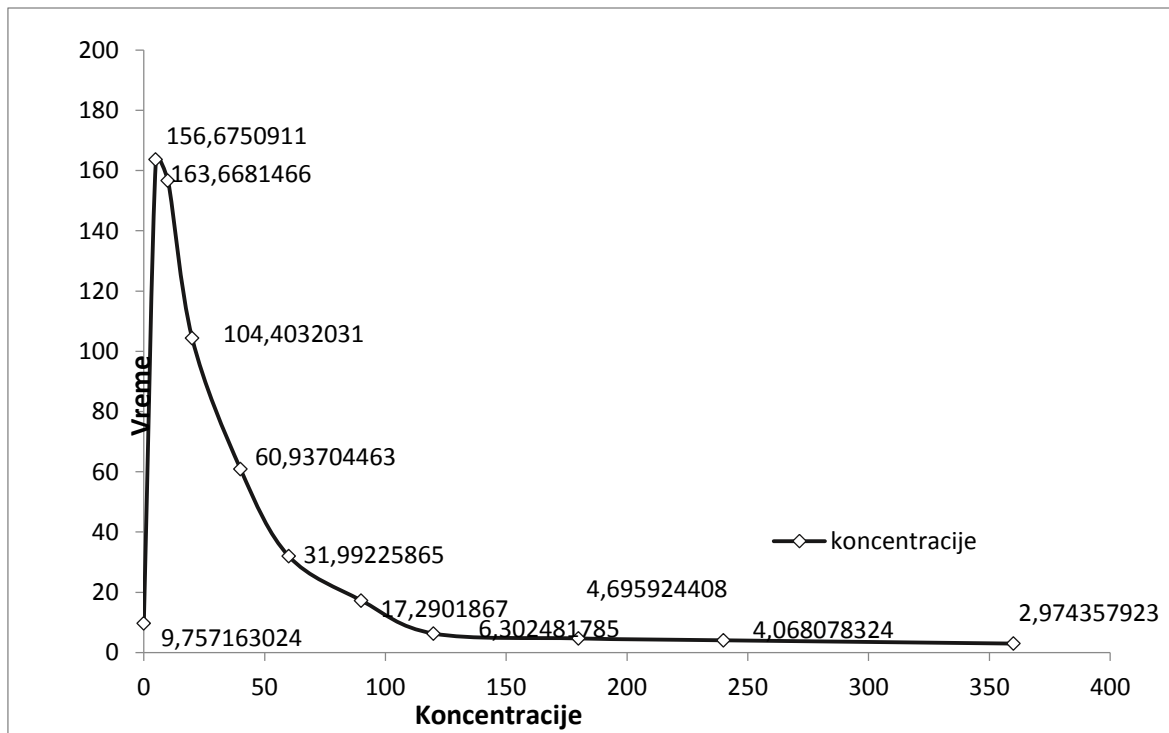
Nakon i.v. administracije eritromicina uzimani su uzorci krvi u sledećim vremenskim intervalima: neposredno nakon aplikacije leka, u 5 min, 10 min, 20 min, 40 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min, 240 min i 360 min od momenta primene leka. Vrednosti koncentracija eritromicina u uzorcima krvi su predstavljene tabelarno u zavisnosti od trenutka primene leka kao i u zavisnosti od primenjene žučne kiseline.



Slika 4.8.1. Promene koncentracija eritromicina u krvi prilikom *i.v.* aplikacije eritromicina



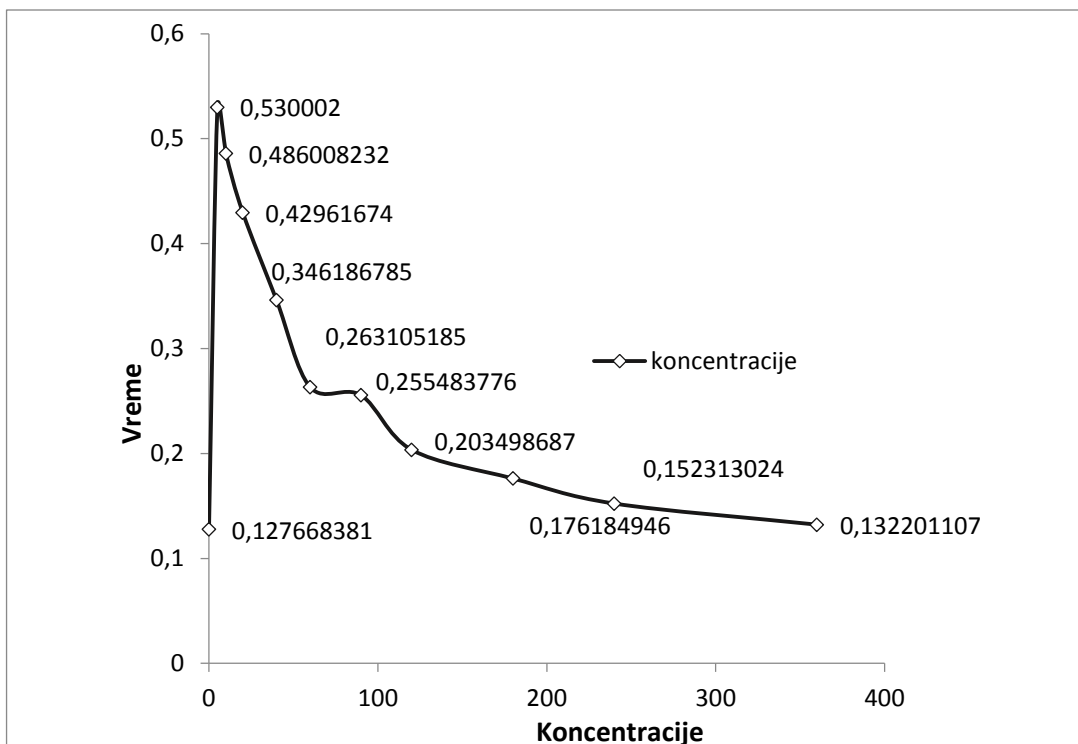
Slika 4.8.2. Promene koncentracija eritromicina u krvi prilikom *i.v.* aplikacije eritromicina nakon prethodne *s.c.* administracije natrijumove soli TKA



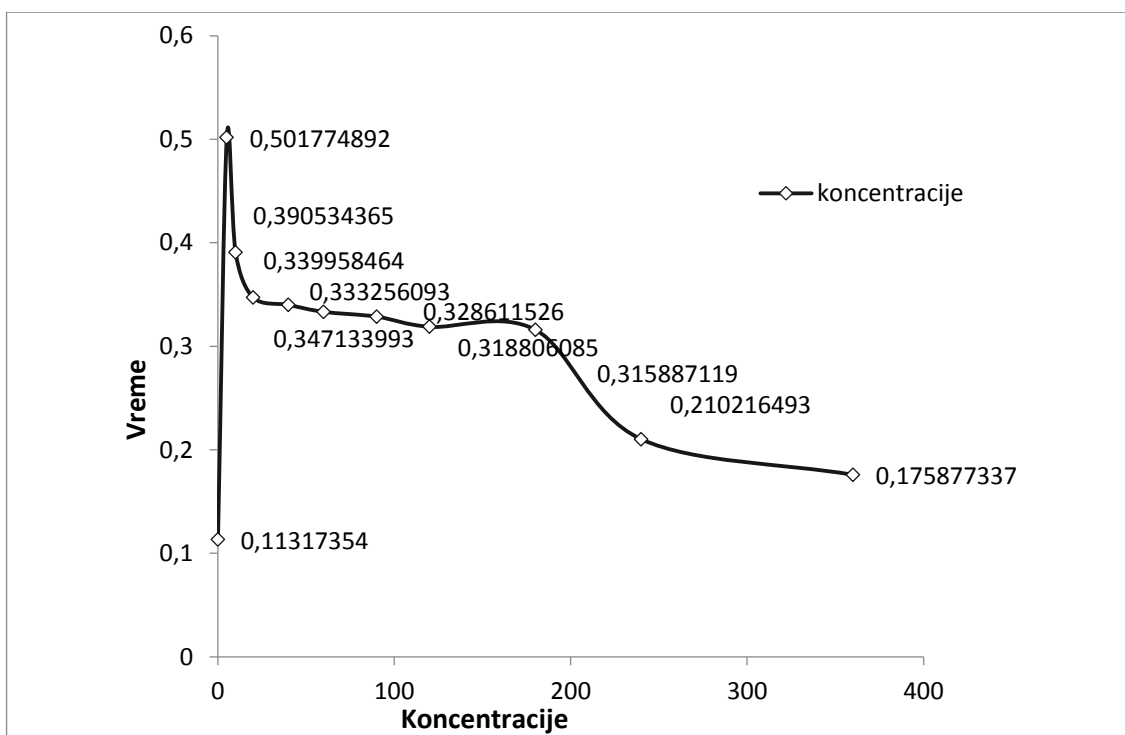
Slika 4.8.3. Promene koncentracija eritromicina u krvi prilikom *i.v.* aplikacije eritromicina nakon prethodne *s.c.* administracije natrijumove soli 12MKH

4.9. Vrednosti nivoa eritromicina u krvi nakon *per os* primene leka

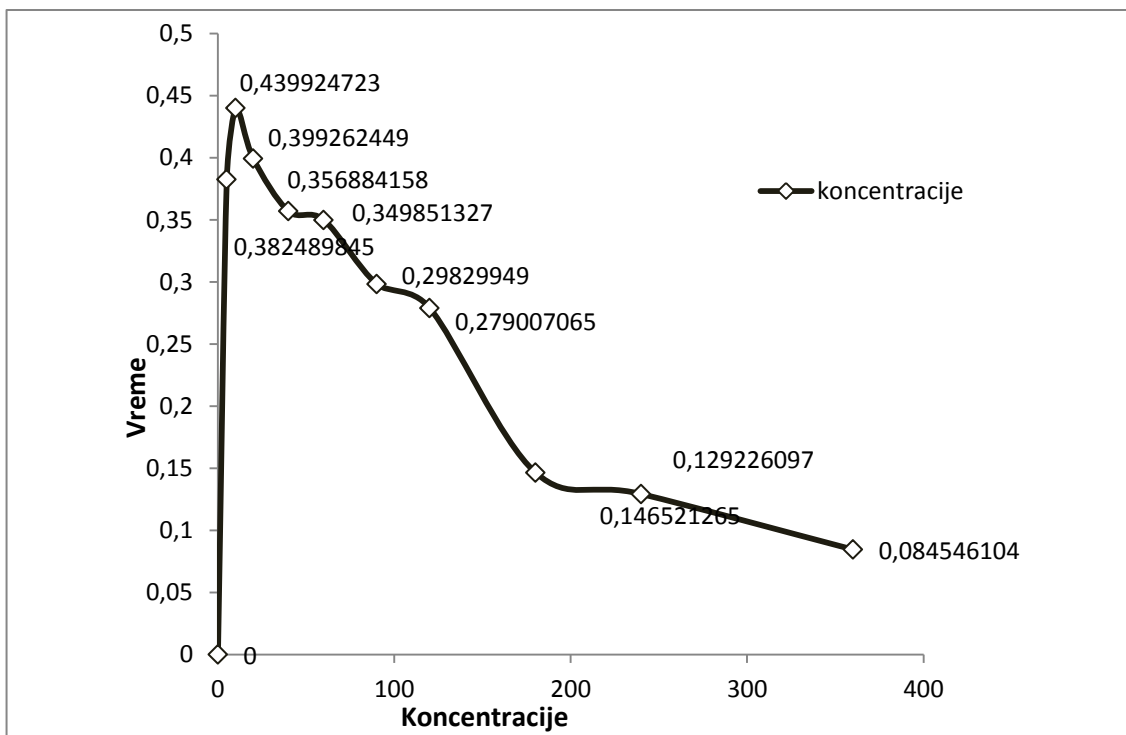
Najvećim delom apsorpcija žučnih kiselina u intestinumu se odvija zahvaljujući aktivnom transport putem apikalnog natrijum zavisnog transportera za žučne kiseline (SLC10A2), putem ilealnog vezujućeg proteina za žučne kiseline (IBABP) i organskih žučnih transportera (OST α/β). Mutacije kod SLC10A2 gena dovode do malapsorpcije žučnih kiselina kod čoveka. Porde toga što imaju ulogu u varenju masti i apsorpciji liposolubilnih vitamin, poslednje studije ukazuju da žučne kiseline ostvaruju značajan uticaj kao signalni molekuli i kao transporteri za pojedine lekove i ksenobiotike (M. Miyata, 2011).



Slika 4.9.1. Promene koncentracija eritromicina u krvi prilikom *per os* aplikacije eritromicina



Slika 4.9.2. Promene koncentracija eritromicina u krvi prilikom *per os* aplikacije eritromicina nakon prethodne *s.c.* administracije natrijumove soli TKA



Slika 4.9.3. Promene koncentracija eritromicina u krvi prilikom *per os* aplikacije eritromicina nakon prethodne *s.c.* administracije natrijumove soli 12 MKH

4.10. Vrednosti nivoa klindamicin u krvi nakon *intra-arterijske* primene leka

Tabela 4.10.1. Vrednosti klindamicina u arterijskoj krvi izražene u mcg/ml

Neposredno nakon aplikacije leka	30s od momenta aplikacije	60s od momenta aplikacije	150s od momenta aplikacije	240 sekundi od momenta aplikacije	
0,724	6,240	3,123	2,402	2,534	
0,240	2,704	1,814	1,693	1,092	
0,331	2,848	5,995	2,527	1,840	
0,471	2,889	5,832	4,774	3,271	
0,718	1,949	1,028	2,218	1,235	
-	-	-	-	-	
0,497	3,326	3,558	2,723	1,994	Prosečna vrednost

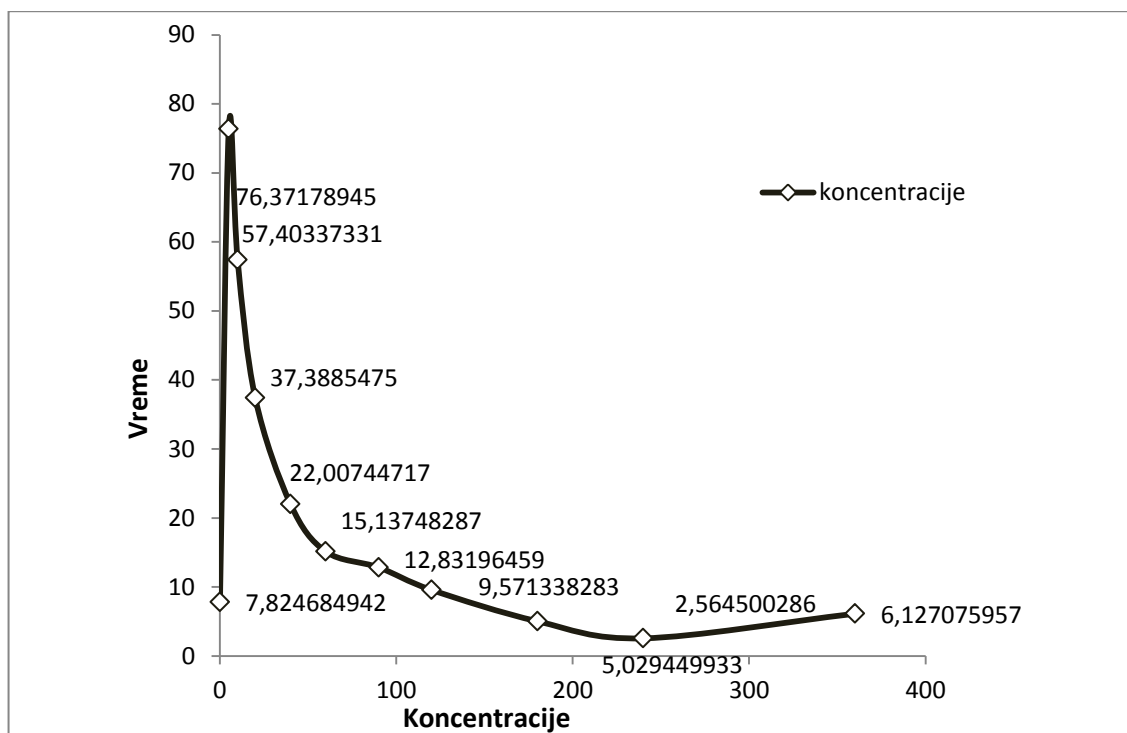
Tabela 4.10.2. Vrednosti klindamicina u krvi nakon prethodne primene natrijumove soli TKA kiseline izražene u mcg/ml

Neposredno nakon aplikacije leka	30s od momenta aplikacije	60s od momenta aplikacije	150s od momenta aplikacije	240 sekundi od momenta aplikacije	
0,772	1,117	0,391	1,310	3,895	
0,111	0,065	0,392	0,871	0,054	
1,588	1,933	2,564	2,203	1,814	
0,027	0,057	0,065	0,049	0,273	
0,816	0,670	0,554	0,350	0,442	
0,989	0,528	0,468	0,646	0,995	
0,717	0,728	0,739	0,905	1,246	Prosečna vrednost

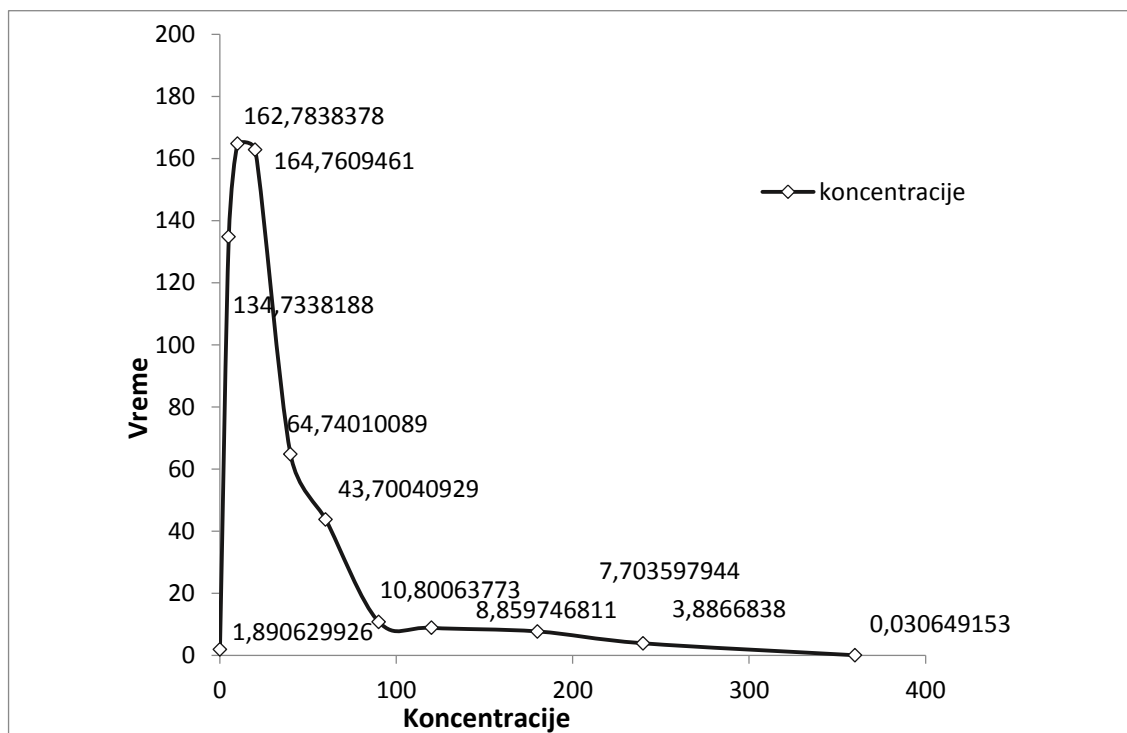
Tabela 4.10.3. Vrednosti klindamicina u krvi nakon prethodne primene natrijumove soli MKH kiseline izražene u mcg/ml

Neposredno nakon aplikacije leka	30s od momenta aplikacije	60s od momenta aplikacije	150s od momenta aplikacije	240 sekundi od momenta aplikacije	
-	-	-	-	-	
-	1,146	3,203	-	3,086	
0,572	-	-	-	-	
2,113	0,896	1,662	3,812	2,991	
-	0,791	3,788	1,339	1,705	
-	2,197	1,644	3,172	6,015	
1,342	1,257	2,574	2,774	3,449	Prosečna vrednost

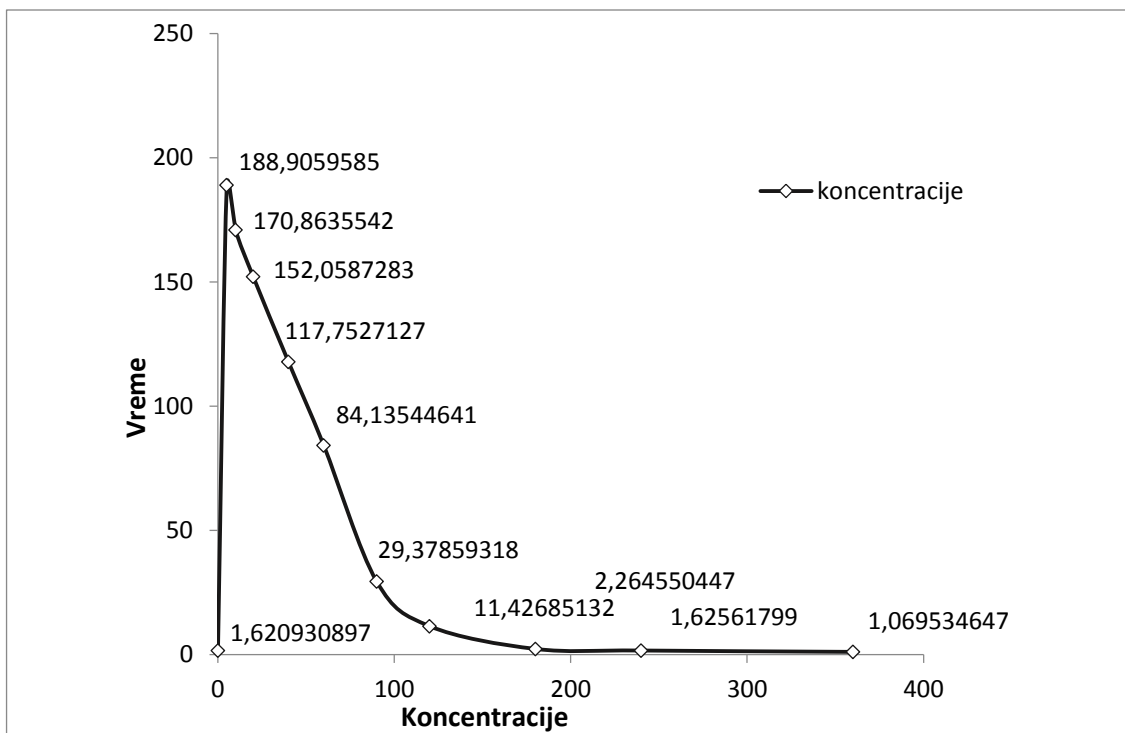
4.11. Vrednosti nivoa klindamicina u krvi nakon *intra-venske* primene leka



Slika 4.11.1. Promene koncentracija klindamicina u krvi prilikom *i.v.* aplikacije eritromicina

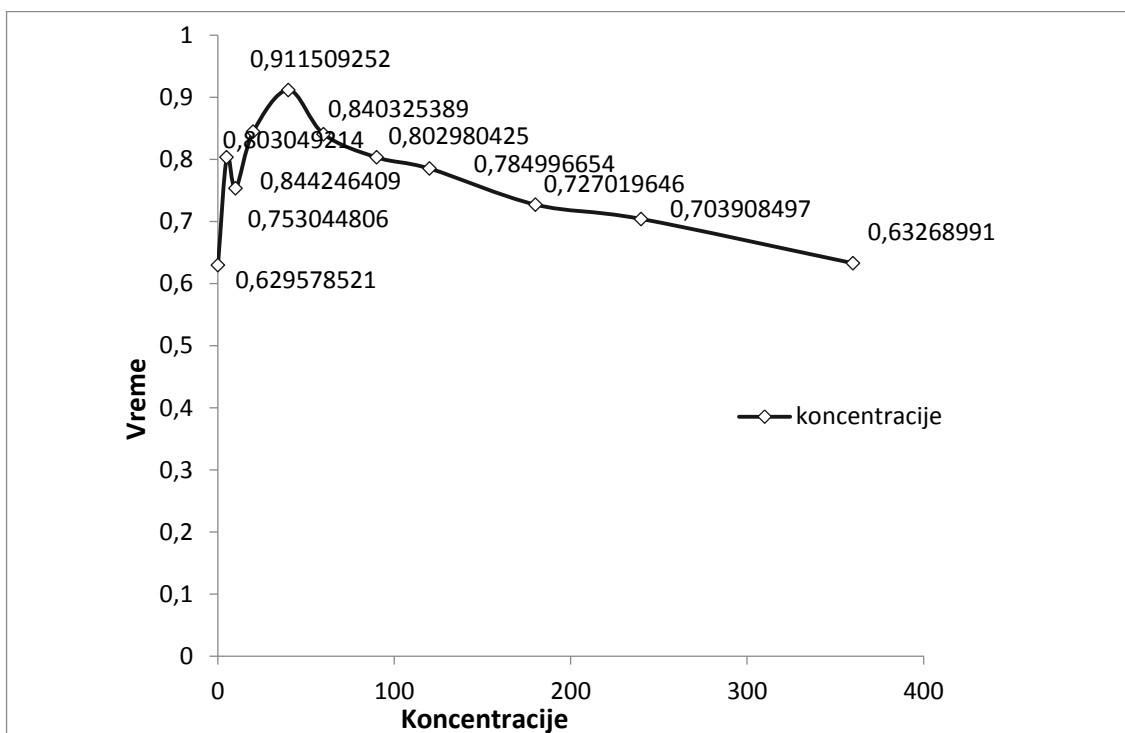


Slika 4.11.2. Promene koncentracija klindamicin u krvi prilikom *i.v.* aplikacije klindamicina nakon prethodne *s.c.* administracije natrijumove soli TKA

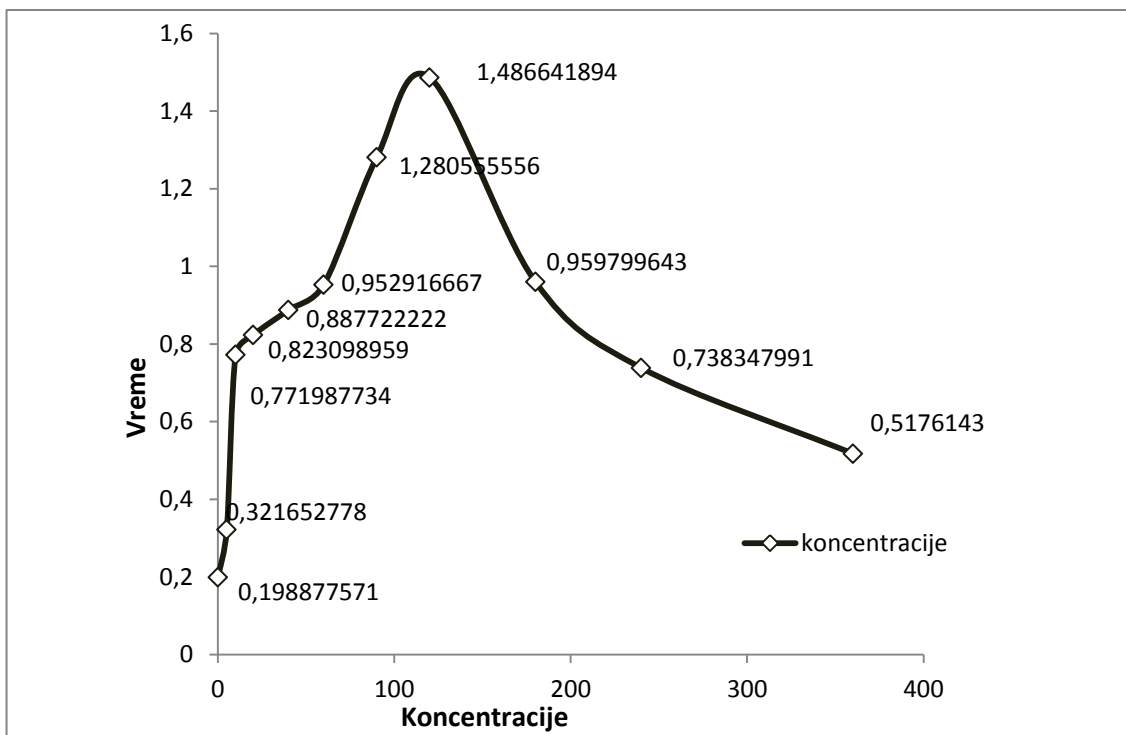


Slika 4.11.3. Promene koncentracija klindamicina u krvi prilikom *i.v.* aplikacije klindamicina nakon prethodne *s.c.* administracije natrijumove soli 12MKH

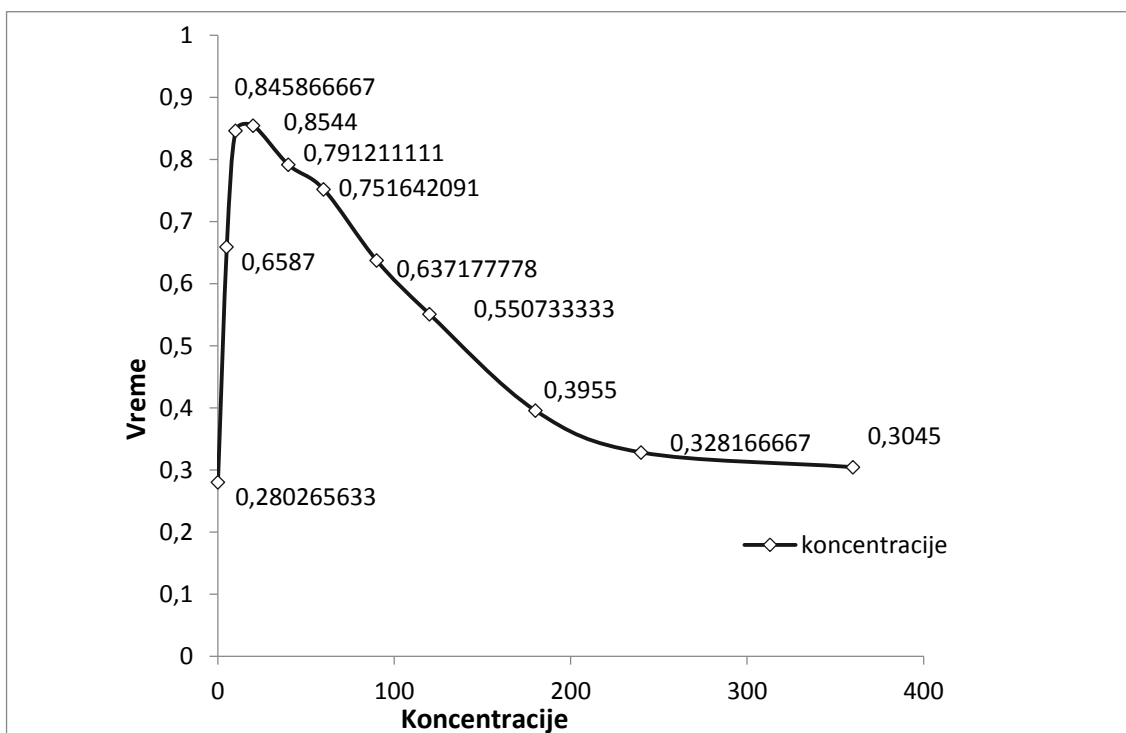
4.12. Vrednosti nivoa klindamicina u krvi nakon *per os* primene leka



Slika 4.12.1. Promene koncentracija klindamicina u krvi prilikom *per os* aplikacije klindamicina



Slika 4.12.2.Promene koncentracija klindamicina u krvi prilikom *per os* aplikacije klindamicina nakon prethodne s.c. administracije natrijumove soli TKA



Slika 4.12.3.Promene koncentracija klindamicina u krvi prilikom *per os* aplikacije klindamicina nakon prethodne s.c. administracije natrijumove soli 12MKH

4.13. Koncentracije eritromicina u moždanom tkivu nakon intra-arterijske primene leka

Tokom poslednje dekade ispitivanja uticaja žučnih kiselina na transportne procese u čovekovom organizmu došlo je do značajnih konstatacija u pogledu njihovog uticaja na krvno-moždanu barijeru. Zapaženo je da pojedine ispitivane žučne kiseline ostvaruju ulogu u povećanju prokrvljenosti krvnih sudova mozga i imaju izvesnu neoroprotektivnu ulogu. U vezi sa time otvoreno je novo poglavlje ispitivanja uticaja žučnih kiselina na promenu permeabilnosti krvno-moždane barijere što bi omogućilo i transport lekova sa ograničenom moći prolaska kroz ovu kompleksnu barijeru čovekovog organizma (*Cho et al., 2015*)

Tabela 4.13.1. Vrednosti eritromicina u delovima mozga nakon *i.a.* primene eritromicina izražene u mcg/ml

Leva hemisfera	Desna hemisfera	Moždano stablo	Mali mozak	
3,219	2,56	7,024	7,714	
1,650	1,82	1,122	1,910	
2,300	1,536	1,231	1,482	
2,241	1,795	1,642	1,882	
1,362	1,224	1,389	0,952	
0,965	0,622	0,89	1,320	
3,219	2,56	7,024	7,714	
1,956	1,593	2,216	2,543	Prosečna vrednost
0,644686	0,421869	5,610974	6,545895	Varijansa
0,802924	0,649514	2,368749	2,558495	Standardna devijacija

Tabela 4.13.2.Vrednosti eritromicina u delovima mozga nakon *i.a.* primene eritromicina 20 min nakon *s.c.* administracije TKA izražene u mcg/ml

Leva hemisfera	Desna hemisfera	Moždano stablo	Mali mozak	
4,58	4,103	4,666	3,987	
12,364	10,887	9,334	12,331	
7,299	10,372	6,546	3,155	
11,432	6,754	5,556	6,142	
0,659	0,216	0,222	0,213	
6,184	3,155	4,337	1,510	
4,58	4,103	4,666	3,987	
7,086	5,915	5,110	4,556	Prosečna vrednost
19,037	17,734	8,958	18,678	Varijansa
4,363162	4,211133	2,993032	4,321788	Standardna devijacija

Tabela 4.13.3.Vrednosti eritromicina u delovima mozga nakon *i.a.* primene eritromicina 20 min nakon *s.c.* administracije 12MKH izražene u mcg/ml

Leva hemisfera	Desna hemisfera	Moždano stablo	Mali mozak	
1,565	1,170	0,944	0,914	
1,997	2,133	2,651	2,443	
2,776	1,495	2,553	2,527	
3,157	1,245	1,830	3,127	
-	-	-	-	
-	-	-	-	
2,185	1,768	1,706	2,511	Prosečna vrednost
0,471791	0,314197	0,584195	1,644614	Varijansa
0,68687	0,560533	0,764327	1,282425	Standardna devijacija

4.14. Koncentracije eritromicina u moždanom tkivu nakon intravenske primene leka

Tabela 4.14.1. Vrednosti eritromicina u delovima mozga nakon *i.v.* primene izražene u mcg/ml

Leva hemisfera	Desna hemisfera	Moždano stablo	Mali mozak	
0,293	0,264	0,355	0,283	
0,215	0,193	0,324	0,176	
0,163	0,142	-	0,267	
0,157	0,199	0,276	0,165	
0,414	0,320	0,428	0,308	
0,387	0,290	0,388	-	
0,293	0,264	0,355	0,283	
0,272	0,235	0,354	0,240	Prosečna vrednost
0,012375	0,004568	0,003427	0,004237	Varijansa
0,111244	0,06759	0,058538	0,06509	Standardna devijacija

Tabela 4.14.2. Vrednosti eritromicina u delovima mozga nakon *i.v.* primene (izražene u mcg/ml) 20 min nakon *s.c.* administracije TKA

Leva hemisfera	Desna hemisfera	Moždano stablo	Mali mozak	
0,591	0,379	-	0,302	
0,449	0,412	0,364	0,298	
0,467	0,552	0,448	0,490	
	0,656	0,587	0,510	
0,498	0,361	0,402	0,497	
0,556	0,534	0,502	0,708	
0,591	0,379	-	0,302	
0,512	0,482	0,461	0,467	Prosečna vrednost
0,003581	0,013591	0,007654	0,023459	Varijansa
0,059844	0,116581	0,087486	0,153164	Standardna devijacija

Tabela 4.14.3.Vrednosti eritromicina u delovima mozga nakon *i.v.* primene (izražene u mcg/ml) 20 min nakon *s.c.* administracije 12MKH

Leva hemisfera	Desna hemisfera	Moždano stablo	Mali mozak	
0,295	0,257	0,319	0,205	
0,266	0,189	0,296	0,198	
0,329	0,236	0,376	0,316	
0,286	0,279	0,326	0,277	
0,241	0,245	0,378	0,342	
0,222	0,214	0,298	0,201	
0,295	0,257	0,319	0,205	
0,273	0,237	0,332	0,256	Prosečna vrednost
0,001489	0,001022	0,001341	0,004063	Varijansa
0,038588	0,031961	0,036624	0,063742	Standardna devijacija

4.15.Koncentracije eritromicina u moždanom tkivu nakon *per os* primene leka

Tabela 4.15.1.Vrednosti eritromicina u delovima mozga nakon *per os* primene izražene u mcg/ml

Leva hemisfera	Desna hemisfera	Moždano stablo	Mali mozak	
0,522	0,505	0,649	0,555	
0,574	0,633	0,591	0,673	
0,546	0,573	0,499	0,578	
0,626	0,656	0,576	0,583	
0,565	0,613	0,624	0,683	
0,649	0,668	0,653	0,662	
0,522	0,505	0,649	0,555	
0,580	0,608	0,599	0,622	Prosečna vrednost
0,002318	0,003689	0,003331	0,003185	Varijansa
0,04815	0,060741	0,057711	0,056435	Standardna devijacija

Tabela 4.15.2.Vrednosti eritromicina (izražene u mcg/ml) u delovima mozga nakon *per os* primene uz predhodnu administraciju TKA s.c.

Leva hemisfera	Desna hemisfera	Moždano stablo	Mali mozak	
0,686	0,593	0,638	0,635	
0,639	0,541	0,619	0,600	
0,613	0,565	0,537	0,553	
0,577	0,546	0,612	0,552	
0,621	0,619	0,525	0,553	
0,592	0,680	0,693	0,756	
0,686	0,593	0,638	0,635	
0,621	0,591	0,604	0,608	Prosečna vrednost
0,001489	0,002773	0,004016	0,006406	Varijansa
0,038581	0,052663	0,06337	0,080038	Standardna devijacija

Tabela 4.14.1.Vrednosti eritromicina (izražene u mcg/ml) u delovima mozga nakon *per os* primene uz predhodnu administraciju 12MKH s.c.

Leva hemisfera	Desna hemisfera	Moždano stablo	Mali mozak	
0,538	0,557	0,563	0,564	
0,531	0,553	0,631	0,522	
0,548	0,610	0,555	0,696	
0,630	0,695	0,656	0,662	
0,547	0,564	0,568	0,626	
0,589	0,599	0,596	0,611	
0,538	0,557	0,563	0,564	
0,564	0,596	0,595	0,613	Prosečna vrednost
0,001469	0,002903	0,001677	0,004055	Varijansa
0,038328	0,053883	0,040946	0,063682	Standardna devijacija

4.16. Koncentracije klindamicina u moždanom tkivu nakon intra-arterijske primene leka

Tabela 4.16.1. Vrednosti klindamicina u mozgu nakon *i.a.* primene izražene u mcg/ml

Leva hemisfera	Desna hemisfera	Moždano stablo	Mali mozak	
0,080	0,073	0,077	0,033	
0,208	0,190	1,010	0,110	
3,330	0,650	0,560	0,172	
1,220	4,420	0,420	0,110	
2,110	5,410	0,440	0,220	
0,000	0,000	0,000	0,000	
1,390	2,149	0,501	0,129	Prosečna vrednost
1,806483	6,006682	0,132473	0,00678	Varijansa
1,344055	2,450853	0,363969	0,082342	Standardna devijacija

Tabela 4.16.2. Vrednosti klindamicina u delovima mozga nakon *i.a.* primene klindamicina 20 min nakon *s.c.* administracije TKA izražene u mcg/ml

Leva hemisfera	Desna hemisfera	Moždano stablo	Mali mozak	
-	4,216	3,003	0,129	
8,231	4,113	0,316	1,091	
0,452	0,022	0,011	-	
0,045	5,221	7,621	0,637	
7,111	6,805	15,390	1,296	
0,348	5,123	5,090	1,226	
-	4,216	3,003	0,129	
3,238	4,250	5,238	0,730	Prosečna vrednost
16,55983	5,226102	33,06036	0,319909	Varijansa
3,872308	2,286067	5,749814	0,565605	Standardna devijacija

Tabela 4.16.3.Vrednosti klindamicina u delovima mozga nakon *i.a.* primene klindamicina 20 min nakon *s.c.* administracije 12MKH izražene u mcg/ml

Leva hemisfera	Desna hemisfera	Moždano stablo	Mali mozak	
6,791	0,810	4,126	0,334	
1,104	6,214	3,879	0,778	
0,679	6,322	1,540	1,012	
4,343	4,332	5,634	3,241	
6,791	0,810	4,126	0,334	
1,104	6,214	3,879	0,778	
0,679	6,322	1,540	1,012	
3,229	4,420	3,795	1,341	Prosečna vrednost
8,314907	6,625412	2,861337	1,683385	Varijansa
2,883558	2,573988	1,691549	1,297453	Standardna devijacija

4.17.Koncentracije klindamicina u moždanom tkivu nakon intravenske primene leka

Tabela 4.17.1.Vrednosti klindamicina u mozgu nakon *i.v.* primene izražene u mcg/ml

Leva hemisfera	Desna hemisfera	Moždano stablo	Mali mozak	
-	-	-	0,001	
0,538	0,469	0,389	0,122	
0,328	0,335	0,321	0,142	
-	-	-	-	
-	-	-	-	
-	-	-	0,001	
0,433	0,402	0,355	0,088	Prosečna vrednost
0,022056	0,008952	0,002318	0,005777	Varijansa
0,233242	0,225094	0,195996	0,068267	Standardna devijacija

Tabela 4.17.2.Vrednosti klindamicina u delovima mozga nakon *i.v.* primene (izražene u mcg/ml) 20 min nakon *s.c.* administracije TKA

Leva hemisfera	Desna hemisfera	Moždano stablo	Mali mozak	
5,540	6,669	0,740	0,171	
6,662	5,551	0,341	0,081	
7,214	6,005	5,337	0,576	
6,331	5,632	4,261	1,482	
7,332	6,019	5,515	1,514	
-	-	-	-	
6,550	5,021	2,701	0,640	Prosečna vrednost
0,448517	5,62269	6,791662	0,480054	Varijansa
0,669714	2,371221	2,606082	0,692859	Standardna devijacija

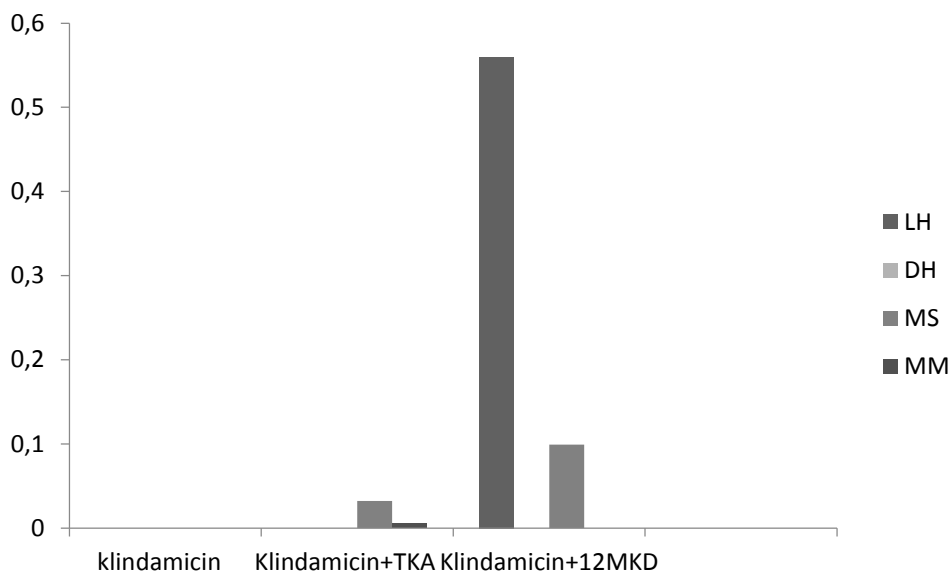
Tabela 4.17.3.Vrednosti klindamicina u delovima mozga nakon *i.v.* primene (izražene u mcg/ml) 20 min nakon *s.c.* administracije 12MKH

Leva hemisfera	Desna hemisfera	Moždano stablo	Mali mozak	
5,832	5,021	-	-	
7,441	6,889	5,112	0,776	
6,998	8,266	2,131	0,340	
5,771	4,449	4,998	0,446	
6,111	5,333	9,583	1,112	
5,668	0,262	0,439	0,399	
5,832	5,021	-	-	
6,304	5,037	4,452	0,615	Prosečna vrednost
0,544604	7,418216	12,13886	0,105988	Varijansa
0,737973	2,72364	3,607657	0,384359	Standardna devijacija

4.18.Koncentracije klindamicina u moždanom tkivu nakon *per os* primene leka

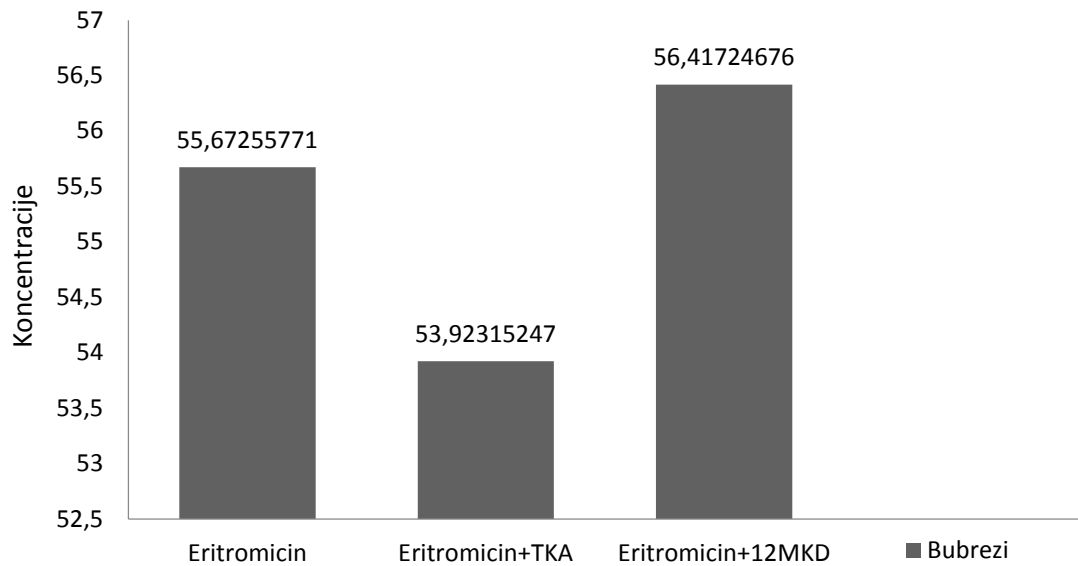
Prilikom analize vrednosti koncentracija klindamicina u moždanom tkivu nakon *per os* administracije leka uočeno je da nema promene propustljivosti krvno-moždane barijere prema ovom molekulu u pojedine kompartmane mozga što je i u skladu sa ranije publikovanim rezultatima (*Nau et al., 2010*). Nakon *s.c.* administracije TKA uoceno je da se propustljivost hematoencefalne barijere za ovaj lek izmenila i to za sledeće delove: levu hemisferu,

moždano stablo i mali mozak. Pri čemu su detektovane koncentracije imale najvišu vrednost za levu moždanu hemisferu. Nakon *s.c.* primene 12 MKH takođe je uočeno prisustvo izvesnih koncentracija ovog antibiotika i to u levoj hemisferi i moždanom stablu kao kompartmanima. Najviše vrednosti koncentracija postignute su u moždanom stablu.



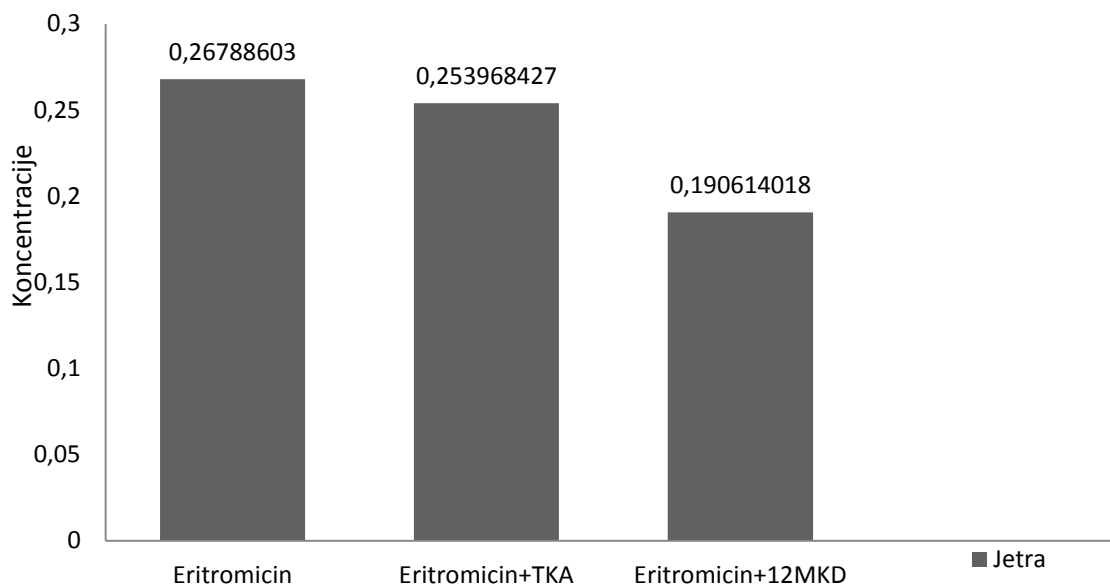
Grafikon 4.18.1 Vrednosti koncentracije klindamicina u moždanom tkivu nakon *per os* primene leka

4.19. Koncentracije eritromicina u tkivu bubrega nakon *intra-arterijske* aplikacije leka



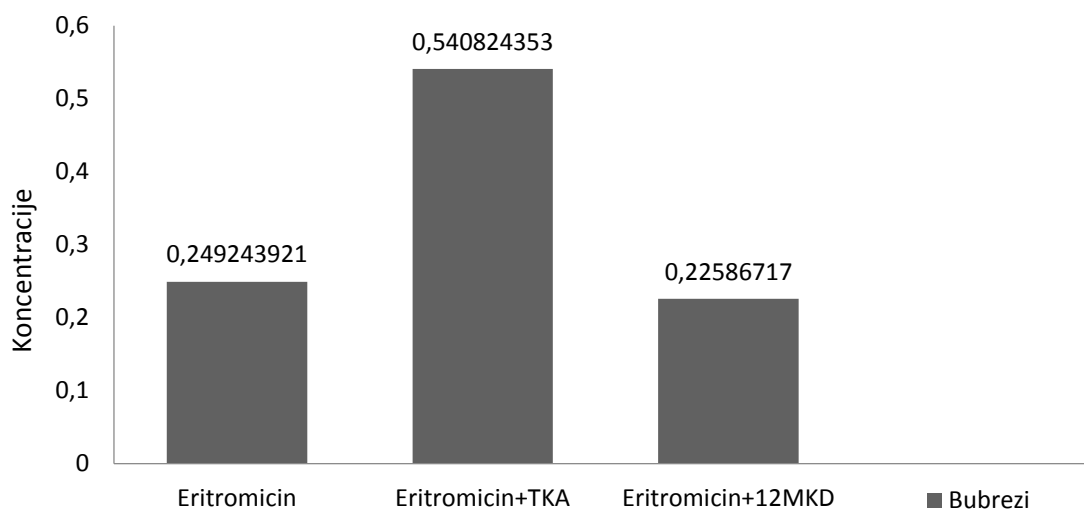
Grafikon 4.19.1 Vrednosti koncentracije eritromicina u tkivu bubrega nakon *i.a.* primene leka

4.20. Koncentracije eritromicina u tkivu bubrega nakon *intra-venske* aplikacije leka



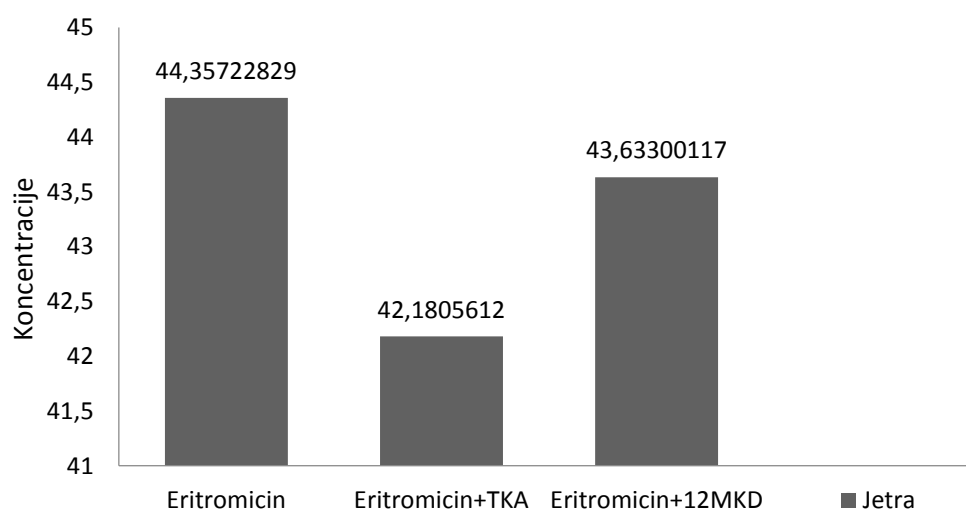
Grafikon 4.20.1. Vrednosti koncentracije eritromicina u tkivu bubrega nakon *i.v.* primene leka

4.21. Koncentracije eritromicina u tkivu bubrega nakon *per os* aplikacije leka



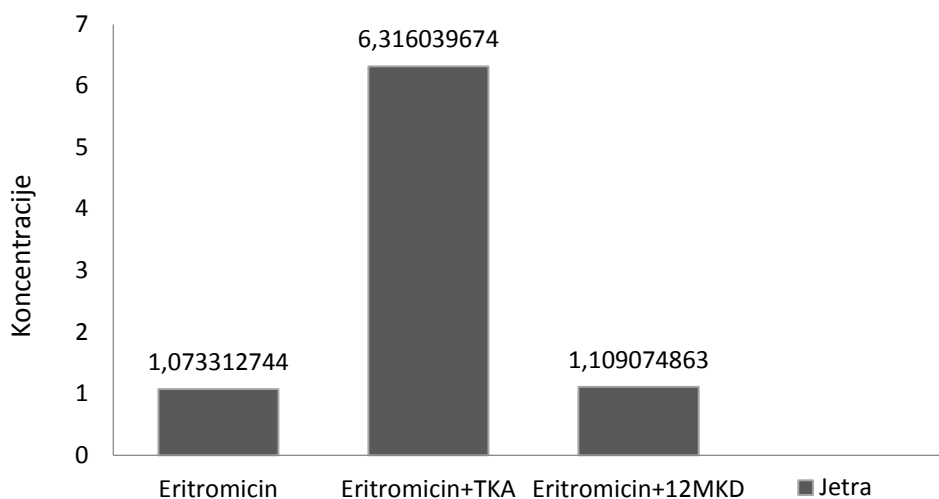
Grafikon 4.21.1 Vrednosti koncentracije eritromicina u tkivu bubrega nakon *per os* primene leka

4.22. Koncentracije eritromicina u tkivu jetre nakon *intra-arterijske* aplikacije leka



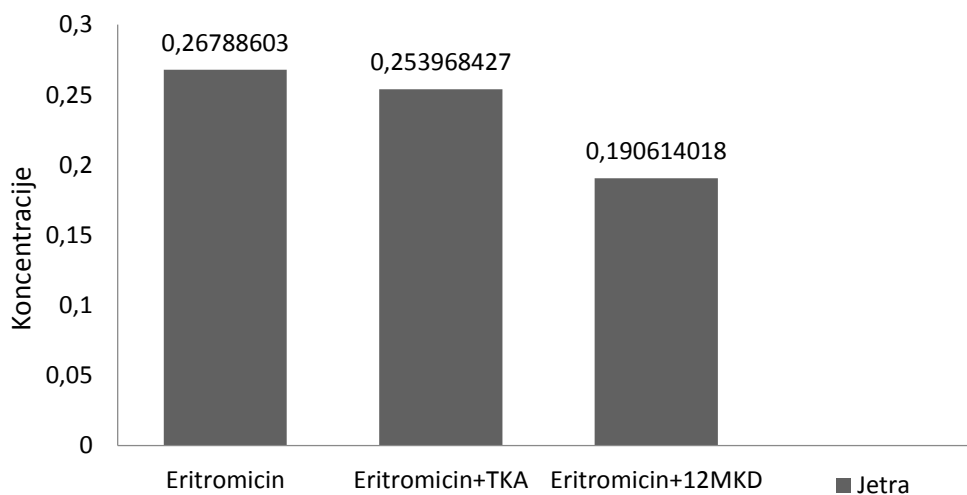
Grafikon 4.22.1 Vrednosti koncentracije eritromicina u tkivu jetre nakon *i.a.* primene leka

4.23. Koncentracije eritromicina u tkivu jetre nakon *intra-venske* aplikacije leka



Grafikon 4.23.1. Vrednosti koncentracije eritromicina u tkivu jetre nakon *i.v.* primene leka

4.24. Koncentracije eritromicina u tkivu jetre nakon *per os* aplikacije leka



Grafikon 4.24.1. Vrednosti koncentracije eritromicina u tkivu jetre nakon *per os* primene leka

5. DISKUSIJA

5.1. Interakcija makrolidnih antibiotika sa žučnim solima ispitivana u *in vitro* eksperimentalnim uslovima

Prilikom proučavanja sposobnosti interakcije žučnih kiselina sa makrolidnim antibioticima korišćena je dvodimenzionalna NMR tehnika. Ovom tehnikom se podaci predstavljaju u prostoru definisani sa dve frekvencijske ose umesto jedne. Dvodimenzionalne NMR tehnike su posebno korisne u radu sa strukturama komplikovanih molekula kod kojih se jednodimenzionalne tehnike ne mogu tako uspešno koristiti. Prilikom praćenja interakcije makrolidnih antibiotika sa micelama žučnih soli zabeleženo je značajno hemijsko pomeranje signala u spektru slobodnog azitromicina u odnosu na azitromicin u prisustvu micela žučnih soli što ukazuje na postojanje vezivanja molekula makrolidnih antibiotika sa nagrađenim micelama žučnih soli. Kod azitromicin aglikona postoji zabeleženo hemijsko pomeranje unutar spektra a da pri tome sam oblik signala nije značajno promenjen što govori u prilog tome da u ovom slučaju interakcija odnosno vezivanje molekula makrolida za micide žučnih soli nije toliko jako.

Informacije o intenzitetu veze između makrolidnih antibiotika i micela žučnih soli su kvantifikovane na osnovu merenja difuzionog koeficijenta. Koeficijent difuzije je proporcionalan faktoru D prema Fikovom zakonu kojim supstanca mase dm difundujući u vremenu dt kroz površinu dF normalnu na pravac difuzije direktno zavisi od koncentracijskog gradijenta c dotične supstance prema jednačini: $dm = -D \text{ grad } c \, dF \, dt$.

Jednačine bazirane na Fikovom zakonu često se koriste prilikom modelovanja transportnih procesa mnogih lekova prilikom *in vitro* testiranja, za analizu transportnih procesa unutar neurona, kao i prilikom testiranja biopolimera i poluprovodnika.

Vrednosti koeficijenta difuzije zavise od sledećih parametara:

- temperature na kojoj se vrši difuzija
- vrste kristalne strukture rešetke rastvarača
- vrste kristalnih grešaka koje postoje
- koncentracija vrste atoma koja vrši difuziju

Pasivna difuzija prema Fikovom zakonu se odvija u smeru gradijenta odnosno od mesta veće koncentracije ka mestu niže koncentracije do izjednačavanja njihovih vrednosti. Ovaj vid difuzije može da se ostvari na dva načina: transcelularnim putem kroz ćelije ili paracelularnim putem između ćelijskih prostora. Pasivna difuzija kroz ćelijsku membranu je određena pomoću nekoliko faktora kao što su: lipofilnost molekula, veličina čestica, rastvorljivost kao i koncentracija molekula sa suprotne strane ćelijske membrane.

Određeni difuzioni koeficijenti makrolidnih antibiotika ukazuju da postoji značajna razlika u njihovoj interakciji sa ispitivanim žučnim kiselinama. Najveće vrednosti su zabeležene u pogledu interakcije klaritromicina i azitromicina sa natrijum holatom i natrijum deoksiholatom (Tabela 4.2.4). Klaritromicin pokazuje više vrednosti molarnog particionog koeficijenta prilikom interakcije sa natrijumovom soli holne kiseline dok azitromicin pokazuje najznačajnije rezultate u pogledu interakcije sa natrijum deoksiholatom. Najniže vrednosti interakcije svi ispitivani makrolidi su pokazali prilikom merenja ovih vrednosti u slučaju sa natrijum tauroholatom (Grafikon 4.2.3). Niže vrednosti difuzionih koeficijenata su ostvarene prilikom ispitivanja vezivanja azitromicin aglikona i dekladinozil azitromicina sa svim ispitivanim žučnim solima, što može biti objašnjeno činjenicom da ovi molekuli imaju veću polarnost u odnosu na druge ispitane makrolidne antibiotike (Grafikon 4.2.1. i Grafikon 4.2.2). Takođe, se može zapaziti i da su vrednosti difuzionog koeficijenta kod dekladinozil azitromicina oko dva do tri puta više u odnosu na aglikon pri čemu se može izvesti zaključak da je polarnost ovog molekula znatno smanjena uvođenjem samo jedne šećerne komponente u molekul. U slučaju eritromicina i azahomoeritromicina vrednosti koeficijenta difuzije se nalaze u opsegu prosečnih vrednosti što je i razumljivo kada se uzme u obzir njihova hemijska struktura i polarnost samog molekula (Grafikon 4.2.5). U odnosu na eritromicin azahomoeritromicin pokazuje značajniju interakciju sa žučnim solima jer je polarnost same strukture eritromicina smanjena uvođenjem šećerne komponente. Prilikom izvođenja ovog eksperimentalnog dela zaključeno je na osnovu rezultata da postoji značajna interakcija ispitivanih makrolida sa svim žučnim kiselinama dok je jačina interakcije kvantifikovana na osnovu snimljenih DOSY spektara kao mera vrednosti difuzionih parametara.

Micelle žučnih soli su ispitivane u različitim farmaceutskim formulacijama gde je njihova funkcija bila da solubilizuju slabo rastvorljive lekove. Sposobnost žučnih soli da postignu ovaj efekat zavisi pre svega od njihove hidrofobnosti. Žučne kiseline sa većom hidrofobnom površinom unutar micelle imaju veću sposobnost da prihvate hidrofobne molekule.

Solubilizacioni kapacitet micelnog sistema može biti povećan kroz hemijsku modifikaciju steroidne strukture žučnih kiselina. Druga mogućnost za poboljšanje micelnih sposobnosti žučnih kiselina je njihovo kombinovanje sa drugim surfaktantima koji poseduju odgovarajuća svojstva sa ciljem da se nagrade mešane micle koje bi imale najidealnije karakteristike solubilizatora za željeni lek. Osim toga intermolekulske hidrofилne interakcije između polarnih grupa unutar mešanih micela određenih žučnih soli su značajne po tome što dodatno povećavaju stabilnost ovih binarnih sistema. U farmaceutskoj delatnosti različiti nejonski kosurfaktanti su korišćeni za poboljšanje svojstava mešanih micela žučnih soli kao i za bolju solubilizaciju slabo rastvorljivih lekova.

5.2. Određivanje farmakokinetičkih parametara odabranih žučnih kiselina *In silico* metodama

Danas se dizajniranje lekova zasniva na racionalnom pristupu koji podrazumeva da se na osnovu predloženih struktura sa očekivanim terapijskim delovanjem izdvoje one koje daju zadovoljavajuće fizičko-hemijske, farmakokinetičke i toksikološke osobine predviđene *in silico* metodama. Ove metode, na osnovu baze eksperimentalno dobijenih podataka za već poznate molekule, kvantifikuju uočene veze između bioloških osobina potencijalnih lekova i njihovih strukturnih karakteristika, vrste i prostornog rasporeda atoma od kojih su načinjeni. Na taj način, značajne informacije bivaju obezbeđene već tokom rane faze istraživanja, pružajući mogućnost ciljne sinteze molekula kandidata za lek ili, pak, izdvajanje vodećeg molekula iz serije strukturno sličnih jedinjenja. Moguće je, takođe, *in silico* predviđanje veličine promene farmakološkog odgovora u zavisnosti od modifikacije strukture potencijalnog leka bez njegove prethodne sinteze, čime se redukuje broj jedinjenja koji moraju da budu sintetisani, skraćuje se vreme pronalaska novog leka, a, istovremeno, eliminišu se dodatni testovi bioraspoloživosti na životinjama.

Da bi se sa zadovoljavajućom tačnošću predvidela kompleksna biološka svojstva kao što su ADME, upotrebljava se više različitih tehnika. Kombinovanjem dva ili više modela za istu osobinu, ali zasnovanih na različitim principima, dolazi se do validnijih podataka, jer se na ovaj način dobijaju polja sigurnosti za rezultate koji se poklapaju i polja nesigurnosti za rezultate koji se razlikuju. Osim QSAR tehnike modelovanja koja je široko rasprostranjena, koriste se modeli zasnovani na atomskom pristupu koji uzima u obzir činjenicu da je osnova

mehanizma procesa ADME u strukturi molekula, te na osnovu opštih principa fizike daje kvantitativna predviđanja svojstva molekula.

Lipofilnost predstavlja jednu od fizičko-hemijskih osobina supstance od koje zavisi prolazak leka kroz biološke membrane pasivnom difuzijom, vezivanje za proteine krvne plazme tj. distribucija leka u organizmu, kao i interakcija leka sa strukturno komplementarnim receptorima preko kojih ispoljavaju farmakološko dejstvo. Molekuli veće lipofilnosti se bolje apsorbuju, bolje prodiru u tkiva i imaju veći stepen raspodele u odnosu na manje lipofilne molekule sličnih osobina. Osim toga, lipofilnost produžava dejstvo lekovitih supstanci i utiče na puteve eliminacije – slabo lipofilni molekuli se dobro eliminišu putem urina, dok veoma lipofilni često imaju i hepatični put eliminacije. U skladu sa tim, lipofilnost predstavlja ključni deskriptor zavisnosti biološke aktivnosti od strukture u QSAR metodama. Ipak, kada je u pitanju permeacija leka u mozak, sugerisano je da lipofilnost ima manji uticaj u odnosu na polarnost jedinjenja. Velike vrednosti podeonog koeficijenta ukazuju na lipofilni karakter ispitivanog jedinjenja, dok male vrednosti podeonog koeficijenta govore da se radi o supstanci hidrofилnih osobina. Sa porastom lipofilnosti, vrednosti logP se kreću od negativnih ka pozitivnim. Supstance čije su vrednosti logP veće od 5, visoko su lipofilne i, sledstveno, toksične.

Prilikom in silico testiranja odabranih jedinjenja žučnih kiselina i njihovih rezultata radi validacije ovog modela korelirane su vrednosti parametara R_{m0} koji su eksperimentalno dobijeni sa vrednostima podeonog koeficijenta koji su izračunati korišćenjem različitih softverskih paketa. Na osnovu dosadašnjih rezultata, glavni mehanizmi retencije u hromatografskim uslovima se baziraju na raspodeli između polarne i nepolarne faze (T. Braumann et al., 1986). Stoga, retenciona konstanta, R_m može da se posmatra kao logP. Osim R_{m0} , za izražavanje hidrofobnosti jedinjenja mogu se koristiti i hidrofobne površine b (na osnovu jednačine $R_m = R_{m0} + b \cdot \phi$, gde je R_m retenciona konstanta, a ϕ udeo organskog modifikatora), a prema istraživanjima koji su dobili Cserhatija i saradnici (T. Cserhati et al., 1993). Između parametra R_m i udela organskog rastvarača u mobilnoj fazi, postoji linerana zavisnost. Ekstrapolacijom ove linearne funkcije dobija se odsečak R_{m0} koji odgovara retenciji rastvorka u čistoj vodi (0% udeo organskog rastvarača) i nagib prave b , koji reflektuje retenciju rastvorka u organskom rastvaraču pri datim hromatografskim uslovima. Između retencionih konstanti R_{m0} i b postoji visoko značajna linearana zavisnost. Izračunate vrednosti za logP i b (Tabela 4.4.2. i Tabela 4.4.3.) korelirane sa eksperimentalnim

vrednostima pri čemu su dobijeni vrlo visoki regresioni koeficijenti (u svim slučajevima vrednosti $r^2 > 0,89$). To znači da je formirani matematički model visoko pouzdan u predviđanjima vezanim za molekularnu lipofilnost ispitivanih jedinjenja. Na osnovu dobijenih vrednosti particionog koeficijenta može da se zaključi da su ispitivanja jedinjenja umereno polarna i da ispunjavaju sve zahteve pravila po Lipinskom. Radi daljeg utvrđivanja ADME karakteristika odabranih žučnih kiselina vrednosti ovih parametara su izračunate korišćenjem nabrojanih softvera, pri čemu su dobijene vrednosti za logBB, HIA%, MDCK, PPB%, SP, PEjejunum i Vd (Tabela 4.6.1). Volume distribucije Vd ima vrednost manju od 1 l/kg što ukazuje da ispitivana jedinjenja nemaju visoku raspodelu u masnom tkivu. Dobijena je linearna zavisnost volumena distribucije u odnosu na Rm0 vrednosti, TPSA i Mw, što i potvrđuje tačnost datih rezultata. Najnižu vrednost volumena distribucije pokazuje TKA što je i razumljivo s obzirom na njenu hemijsku strukturu i tri keto grupe u sklopu molekula koje povećavaju polarnost ovog jedinjenja. Vd ispitivanih jedinjenja imaju vrednosti manje od 11-kg jer su u pitanju kiseline. U skladu sa činjenicom da Vd reflektuje raspodelu leka između plazme i tkiva, očekivano je da zavisi od lipofilnosti jedinjenja. Data hipoteza je potvrđena za ispitivana jedinjenja koreliranjem Vd i sa retencionim parametarima Rm0 i b, pri čemu su dobijene statistički značajne linearne regresije.

Sva ispitivana jedinjenja se u visokom procentu vezuju za proteine plazme, na to ukazuju veoma visoke vrednosti PPB. Kako je za delovanje leka važna samo slobodna frakcija ovi rezultati ukazuju da bi u krvi postojao depo ovih molekula. To je značajno jer vezivanje za proteine plazme sugeriše da kompleksi koje molekuli leka grade predstavljaju jednu vrstu depoa, iz koje se lek postepeno oslobađa kada se njegova koncentracija u plazmi smanji. Iz tog razloga, PPB posmatramo kao faktor koji je od značaja ne samo za farmakokinetiku, nego i za farmakodinamiku nekog leka. Budući da je i vezivanje za proteine plazme, raspodela između polarne faze (krvne plazme koja 90% čini voda), i manje stacionarne faze (proteina), i sposobnost vezivanja za proteine plazme može da zavisi, kod strukturno sličnih jedinjenja, od lipofilnosti. Kada su u pitanju jedinjenja koja se u pogledu hemijskih struktura dosta razlikuju, drugi činioci postaju odlučujući kod vezivanja za proteine plazme. S obzirom da su sva ispitivana jedinjenja žučnih kiselina strukturno veoma slična predominantan faktor koji utiče na njihovo vezivanje za proteine plazme je pre svega lipofilnost molekula.

Krvno-moždana barijera predstavlja veoma kompleksnu barijeru koja reguliše razmenu molekula između krvi i mozga i ima glavnu ulogu u ostvarivanju pravilne funkcije neurona i

potpornih-glija ćelija. Hemato-encefalna barijera je specifična, selektivna prepreka koju formiraju endotelne ćelije i cerebralni kapilari sa perivaskularnim elementima. Strukturno, krvno-moždanu barijeru čini niz specijalizovanih, nefenestriranih, mikrovaskularnih endotelnih ćelija koje su međusobno spojene čvrstim vezama i lišene transcelularnih pora. Oko ovog kontinuiranog sloja kapilara nalazi se bazalna membrana i sloj pericita koji svojim produžecima obavijaju kapilare. Duž endotelnih ćelija moždanih kapilara pozicionirane su i perivaskularne ćelije za koje je u jednoj studiji pokazano da se ponašaju slično makrofazima, jer poseduju sposobnost fagocitoze i prezentacije antigena. Usled toga je moguće da perivaskularne ćelije u blizini bazalne lamine endotelnih ćelija hematoencefalne barijere predstavljaju prvu liniju odbrane CNS-a od potencijalno štetnih ksenobiotika. U čvrstom kontaktu sa spoljašnjom površinom moždanog endotela nalazi se protoplazmatski tip astrocita. Endotelne ćelije krvno-moždane barijere, fenotipski različite od perifernih, pokazuju dve karakteristične osobine: izuzetno mali broj endocitnih vezikula i postojanje čvrstih veza između ćelija, čime se limitira i transcelularni i paracelularni transport. Pri fiziološkim uslovima endotelne ćelije imaju sposobnost efikasnog ograničavanja ulaska jona, proteina i drugih polarnih molekula u CNS. Poznato je da *In silico* modeli preliminarno procenjuju permeabilnost kandidata za lek kroz krvno-moždanu barijeru (Cecchelli et al., 2007). Kao jedna od mogućnosti da se proceni permeabilnost ispitivanog jedinjenja kroz hemato-encefalnu barijeru je fizičko-hemijska karakterizacija ispitivanih molekula, koja prezentuje određene uslove na osnovu kojih se procenjuje njihova sposobnost da prolaze kroz krvno-moždanu barijeru. Za prikazane molekule, prema Klarkovom pravilu, se javlja veći broj odstupanja, što sugeriše da ispitivana jedinjenja imaju slab prolazak u mozak. Sve supstance iz grupe odstupaju od preporučenih vrednosti za logD pri pH krvi (7,4) i sva analizirana jedinjenja imaju negativne vrednosti za logBB što ukazuje da prolazak kroz krvno-moždanu barijeru može biti otežan iako se sama hemato-encefalna barijera smatra prilično kompleksnom i nedovoljno dobro istraženom strukturom do današnjih dana.

Da bi lekovita supstanca mogla da se aplikuje oralno, potrebno je da poseduje osobine definisane prema Pravilu Lipinskog. Uočeno je da ispitivana jedinjenja žučnih kiselina i njihovih derivata u pogledu svoje hemijske strukture i fizičko-hemijskih svojstava ispunjavaju sve zahtevane kriterijume datog pravila, te je dobra apsorpcija nakon per os primene u ovom slučaju očekivana. Kada se priča o apsorpciji, neizostavno je definisanje i poznavanje brzine samog procesa. Brzina prolaska leka kroz membrane zavisi od veličine molekula, od polarnosti i od lipofilnosti. Najmanje vrednosti HIA očekivane su dobijena za deoksiholnu,

henodeoksiholnu i ursodeoksiholnu kiselinu, koje kao sadrže isključivo po dve hidroksilne grupe koje su pričvršćene za steroidno jezgro. Uočeno je, međutim, da sva ispitivana jedinjenja imaju veoma visoke vrednosti HIA, te da na brzinu apsorpcije žučnih kiselina i njihovih derivata voluminozno lipofilno jezgro molekula ima dominantan uticaj, dok je uticaj malih polarnih funkcionalnih grupa zanemarljiv. Da bi se potvrdila zavisnost HIA od lipofilnosti analiziranih jedinjenja, izračunate HIA vrednosti korelirane su sa hromatografskim parametrima R_M^0 i b , Uzimajući u obzir i dodatne parametre kao što su TPSA i M_w , a dobijeni rezultati su prikazani putem Jednačine 4.6.1. i Slike 4.6.2.

5.3. Uticaj odabranih derivata žučnih soli na transport eritromicina i klindamicina u *In vivo* eksperimentalnim uslovima

Primena žučnih kiselina u medicini datira još od tridesetih godina dvadesetog veka. Do sada je dokazano da žučne kiseline poboljšavaju apsorpciju, biorasploživost i farmakodinamske karakteristike nekih lekova. Žučne kiseline formiraju micle koje povećavaju permeabilnost mukozne membrane. One su takođe sposobne da povećaju prolazak lekova kroz biološke membrane putem interakcije sa membranskim proteinima i lipidima. Efekat koji žučne kiseline ostvaruju na ćelijske membrane može se uporediti sa efektom koji izazivaju deterdženti, stoga se žučne kiseline i razmatraju kao promotori lekovitih supstanci preko intestinalne, transdermalne, bukalne, rektalne, okularne i pulmonalne barijere. Morfin je tipičan opioidni analgetik koji ispoljava svoje delovanje putem interakcije sa sva tri tipa opioidnih receptora. S obzirom da poseduje tri polarne grupe koje otežavaju prolazak morfina kroz KMB Vasović i saradnici su ispitivali uticaj natrijumove soli 12MKH i estra 12MKH na prolazak morfina kroz ovu barijeru. Eksperimentalnim putem je dokazano da metil ester 12MKH produžuje analgetsko delovanje morfina kada se morfin aplikuje i.m. (Vasović et al. 2014). Takođe, tokom poslednje decenije zabeležena su intenzivnija istraživanja derivata žučnih kiselina koji u svom sastavu poseduju keto grupe umesto hidroksilne jer ovakva jedinjenja pokazuju manji membranolički potencijal. Prilikom ispitivanja interakcije dva derivata žučnih kiselina koji u svom molekulu poseduju keto grupe sa molekulom verapamila, došlo je do konstatacije da u *in vitro* eksperimentalnim uslovima prikazanog modela ćelijske membrane dolazi do stvaranja vodoničnih veza molekula verapamila preko hidroksilnih grupa molekula žučne kiseline i da su ove interakcije važne za transport ovog molekula kroz biološke membrane. Tom prilikom je ustanovljeno da $3\alpha,12\alpha$ -dihidroksi-7-okso- 5β -

holanoična kiselina ostvaruje značajniji uticaj na prolazak verapamila kroz ćelijske membrane u in vitro uslovima u odnosu na 3,7,12-triokso-5 β -holanoičnu kiselinu koja u sklopu svog molekula ne poseduje ni jednu hidrosilnu grupu. Kako je dokazano da okso derivati žučnih kiselina pokazuju niži stepen toksičnosti nego primarne i sekundarne žučne kiseline oni danas predstavljaju predmete opsežnih ispitivanja kroz interakciju sa pojedinim lekovima (Posa et al., 2010). U rezultatima istraživanja prikazanim u ovom radu prilikom i.a. aplikacije eritromicina zapaženo je da postoji razlika u koncentracijama eritromicina u serumu u zavisnosti od primenjene soli žučne kiseline. U slučaju primene 12MKH nije uočeno da postoje razlike u odnosu na aplikaciju samo čistog eritromicina, dok u slučaju primene TKA neposredno pre i.a. primene leka postoji značajno povišenje vrednosti koncentracija eritromicina u serumu. Kada je reč o intra-venskoj primeni leka i odabranih soli žučnih kiselina zapaženo je da nema značajnijeg uticaja pojedinih derivata žučnih kiselina na bioraspoloživost eritromicina i vrednosti koncentracija ovog antibiotika u serumu. Takođe, u slučaju per os primene eritromicina sa ili bez prisustva pomenutih soli žučnih kiselina nije zabeležen uticaj primenjenih derivata na vrednosti eritromicina u uzorcima seruma. Za razliku od eritromicina u slučaju primene klindamicina i.a. zapaženo je da ovde ispitivane žučne soli ne utiču na povišenje koncentracija ovog leka u serumu, odnosno koncentracije klindamicina u serumu u slučajevima bez i uz predhodnu primenu žučnih soli su veoma sličnih vrednosti. Prilikom i.v. primene leka primećeno je da ispitivani derivati žučnih soli ostvaruju značajan uticaj na vrednosti koncentracija ovog antibiotika u serumu. Ove razlike u koncentracijama izabranih antibiotika u zavisnosti od načine primene leka mogu biti objašnjene razlikama u njihovoj hemijskoj strukturi i molekularnoj masi što svakako utiče na njihovu distribuciju i prolazak kroz biološke membrane. U slučaju per os primene uočen je izvestan uticaj TKA na vrednosti klindamicina u serumu, naime došlo je do povećanja koncentracije ovog antibiotika za 64% u odnosu na vrednost bez primene TKA.

5.4.Uticaj odabranih derivata žučnih soli na vrednosti eritromicina i klindamicina u moždanom tkivu, bubrezima i jetri

Krvno-moždana barijera, kao dinamička struktura, održava optimalne uslove za funkcionisanje neurona i ćelija glije tako što reguliše razmenu supstanci između krvi i mozga. Zbog prisustva velikog broja efluksnih transportnih proteina kao što je P-glikoprotein i multi-drug resistance protein (MRP), endotel ograničava i transcelularnu permeaciju. Dinamici

barijere doprinose i intracelularni i ekstracelularni enzimi kao što su monoamino oksidaza (MAO), γ -glutamil transpeptidaza (γ -GT), alkalna fosfataza, specifične peptidaze, nukleotidaze i nekoliko citohrom P450 enzima. Endotelne ćelije moždanih kapilara su specifične po tome što formiraju dodatne čvrste veze pomoću transmembranskih proteina, i na taj način onemogućuju paracelularni transport supstanci. Iako su kapilari ljudskog mozga oko 650 km dugi i imaju ukupnu površinu između 10 i 20 m², tesne veze njihovih endotelnih ćelija potpuno onemogućuju prolaz polarnim molekulima, ukoliko za njih ne postoji specifičan nosač u okviru same krvno-moždane barijere. Na taj način krvno-moždana barijera čini primarni sistem zaštite mozga od potencijalno štetnih ksenobiotika (Pardridge et al., 1990; Ghersi-Egea et al., 1994; El-Bacha et al., 2002; van de Waterbeemd et al., 1998)

U neonatalnom periodu povišene vrednosti i dugoročno izlaganje visokim koncentracijama nekonjugovanog bilirubina može da prouzrokuje neurološke disfunkcije (Cohen et al., 2010). Iako su mehanizmi koji dovode do bilirubin zavisne neurotoksičnosti još uvek nerazjašnjeni, u poslednjih niz godina rezultati upućuju da postoji pomak u razjašnjenju ovog mehanizma (Brites and Brito, 2012). U pogledu korisnih efekata žučnih kiselina na endotelne ćelije mozga malo se zna. Ipak, dokazano je da tauroursodeoksiholna kiselina pokazuje protektivna svojstva protiv amiloid- β -indukovane apoptoze (Viana et al., 2009) i adheziju leukocita za endotelijum uzrokovanu produktima lipidne peroksidacije (Vladykovskaya et al., 2012) kao i reparaciju krvnih sudova (Cho et al., 2015). Interesantno je takođe to što je dokazano da se žučne kiseline mogu koristiti kao terapijski molekuli kod ne hepatičkih patoloških stanja uključujući tumore, hemoragične moždane udare, kod neurodegenerativnih poremećaja poput amiotrofične lateralne skleroze, Hantingtonove, Alchajmerove i Parkinsonove bolesti (Duan et al., 2002).

Prilikom analize uticaja odabranih derivata žučnih soli na prolazak eritromicina i klindamicina kroz biološke membrane uočena je razlika u uticaju ovih derivata na prolazak ispitivanih antibiotika do pojedinih organa u zavisnosti od njihove hemijske strukture. Zapaženo je da najveći uticaj ostvaruje TKA na prolazak eritromicina u mozak. Povećanje vrednosti koncentracije ovog antibiotika je zabeleženo u svim kompartmanima mozga, a najizraženije vrednosti su uočene prilikom analize leve hemisfere što je bilo i očekivano s obzirom da razlike u koncentraciji mogu biti posledica metodologije davanja leka i regionalnih karakteristika krvnih sudova kod hemato-encefalne barijere (Vasović, 1998; Ilić, 1993). Studije sprovedene na Katedri za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju

tokom 2012. godine govore u prilog uticaja žučnih kiselina na propustljivost krvno-moždane barijere. Tom prilikom je ispitan uticaj koji deoksiholna kiselina ostvaruje na prolazak gliklazida kroz ćelijske membrane i kakav uticaj ima ispitivana žučna kiselina na regulaciju nivoa glukoze u krvi eksperimentalnih životinja. Zabeleženo je da deoksiholna kiselina snižava nivo šećera kako kod dijabetičnih tako i kod zdravih životinja, takođe pokazuje i značajnu ulogu na promenu permeabilnosti krvno-moždane barijere za gliklazid, što je od posebnog interesa za izučavanje dijabetesa. Prilikom i.v. primene eritromicina zabeležen je uticaj obe žučne soli na propustljivost hemato-encefalne barijere i vrednosti koncentracija eritromicina u moždanom tkivu. U vezi sa tim uočeno je da 12MKH u ovom slučaju ostvaruje veći uticaj na propustljivost krvno-moždane barijere, a povećanje koncentracija ovog antibiotika zabeleženo je u svim kompartmanima mozga, dok prilikom analize ova dva derivata žučnih soli na permeabilnost eritromicina u delove mozga značajniji uticaj nije zabeležen. Analiza uticaja 12MKH i TKA na prolazak klindamicina u delove mozga je takođe izvršena pri čemu je dobijena direktna potvrda uticaja ispitivanih žučnih soli na propustljivost hemato-encefalne barijere kako u slučaju i.a. primene gde su zabeležene povišene vrednosti ovog antibiotika u svim delovima mozga kako pod uticajem 12MKH tako i pod uticajem TKA. U slučaju i.v. primene dobijene su takođe, povišene vrednosti klindamicina u svim kompartmanima mozga u slučaju oba derivata, a naročito u slučaju primene soli 12MKH. Kod per os primene leka uočen je uticaj oba derivata žučne soli na distribuciju ovog antibiotika u mozak, ali je primećeno da 12MKH ostvaruje veći uticaj naročito na koncentracije ovog antibiotika u levoj i desnoj hemisferi. U slučajevima analize uticaja pomenutih derivata žučnih soli na distribuciju ova dva antibiotika u tkivo bubrega i jetre zabeleženi su sledeći rezultati: kod i.a. aplikacije eritromicina zabeleženo je da kod životinja kojima je davan 12MKH derivat u tkivu bubrega postoji povišenje koncentracije eritromicina u odnosu na primenu bez žučne soli kao i kada je primenjena TKA dok kod i.v. primene pomenutog makrolidnog antibiotika nije zabeležena promena koncentracije eritromicina u tkivu bubrega. Prilikom per os primene eritromicina zabeležen je uticaj TKA na distribuciju ovog antibiotika u tkivo bubrega. U tkivu jetre nisu zabeležene značajne promene koncentracije ovog makrolida u zavisnosti od primene žučne soli dok su vrednosti koncentracije ovog makrolida povišene u tkivu jetre nakon i.v. primene leka uz istovremenu primenu TKA.

Ovakava zapažanja i rezultati su u skladu sa sadašnjim istraživanjima koja govore u prilog tome da hidrofilne žučne kiseline poseduju neuroprotektivna svojstva i značajno utiču

na prokrvljenost krvnih sudova mozga, takođe pokazuju i antioksidativni, antiimflatorni i antiapoptični potencijal što je potvrđeno nedavnim studijama (Cho et al., 2015.).

6. ZAKLJUČCI

- Na osnovu rezultata rada možemo da zaključimo da se retencioni parametri R_M^0 i b , dobijeni primenom NP-TLC, usled visoko značajne linearne korelacije sa $\log P$ vrednostima, mogu koristiti kao alternativna mera lipofilnosti ispitivanih jedinjenja.
- Imajući u vidu da sve analizirane supstance ispunjavaju kriterijume definisane Pravilom Lipinskog, očekuje se da će se one dobro apsorbovati. Visoke vrednosti $HIA\%$ ukazuju na visok stepen apsorpcije ispitivanih jedinjenja u gastrointestinalnom traktu.
- Statistički značajni parametri regresija između retencionih konstanti R_M^0 i b i volumena distribucije, V_d , ukazuju da navedeni farmakokinetički deskriptor upravo proporcionalno zavisi od lipofilnosti ispitivanih supstanci
- Zaključeno je, takođe, da je afinitet vezivanja leka za proteine plazme, PPB u direktnoj vezi sa lipofilnosti jedinjenja ukoliko su ona strukturno slična
- Na osnovu dobijenih rezultata uočeno je da postoji snažna interakcija ispitivanih makrolidnih antibiotika sa micelama natrijum tauroholata, natrijum holata i natrijum deoksiholata.
- Kod veoma čvrstog vezivanja antibiotika za micide žučnih soli difuzioni koeficijent D_e ima vrednost veoma blisku D_{mic}
- Od ispitivanih makrolidnih antibiotika azitromicin i klaritromicin se najintenzivnije vezuju za žučne soli
- U ovom radu je zaključeno da intraarterijska primena leka u *a. carotis communis dextra* može da posluži kao metoda za praćenje prolaska lekova kroz krvno-moždanu barijeru.
- Razlike u koncentracijama dva primenjena antibiotika u pojedinim delovima mozga ukazuje na postojanje dva kompartmana u mozgu. Jedan kompartman čine moždano stablo i mali mozak dok drugi kompartman čine leva i desna moždana hemisfera.

- Koncentracije eritromicina i klindamicina u mozgu i pojedinim njegovim delovima zavise od načina primene leka, njegove hemijske strukture i primenjene soli žučne kiseline
- Zapaženo je da oba ispitivana derivata žučne soli utiču na prolazak eritromicina i klindamicina u moždano tkivo, tkivo bubrega i jetre.
- U slučaju *i.a.* primene eritromicina uočeno je da TKA utiče na povišenje vrednosti eritromicina u krvi kao i u pojedinim delovima mozga dok je u slučaju *i.v.* primene leka registrovan uticaj oba derivata žučnih soli na povišenje vrednosti koncentracije eritromicina u moždanom tkivu.
- Prilikom analize uticaja primenjivanih derivata žučnih kiselina na vrednosti klindamicina u pojedinim kompartmanima mozga zabeležena je značajna uloga 12MKH i TKA na povišenje koncentracije ovog antibiotika u moždanom tkivu prilikom *i.a.*, *i.v.* i *per os* primene klindamicina.
- Uočeno je da 12MKH derivat žučne soli najviše doprinosi povećanju vrednosti nivoa klindamicina u mozgu kod *i.v.* i *per os* primene leka

7. LITERATURA

Arancibia F, Ewig S, Martinez JA, et al. Antimicrobial treatment failures in patients with community-acquired pneumonia: causes and prognostic implications. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(1):154–60

Asadi L, Eurich DT, Gamble JM, Minhas-Sandhu JK, Marrie TJ, Majumdar SR. Guideline adherence and macrolides reduced mortality in outpatients with pneumonia. *Respir Med.* 2012;106(3):451–458.

Avdeef A. pH-metric LogP.1. Difference plots for determining ion-pair octanol-water partition coefficients of multiprotic substances. *Quant. Struct. Act. Relat.* 1992;11:510-517.

Bajorath J. Selected Concepts and Investigations in Compound Classification, Molecular Descriptor Analysis, and Virtual Screening. *J Chem Inf Comput Sci* 2001;41(2):233-45

Balakrishnan A. and E Polli J. Apical Sodium Dependent Bile Acid Transporter (ASBT, SLC10A2): A Potential Prodrug Target. *Mol Pharm* 2006; 3(3): 223–230

Bodo A., Bakos E., Szeri F., Varadi A., Sarkadi B. Differential modulation of the human liver conjugate transporters MRP2 and MRP3 by bile acids and organic anions. *J. Biol. Chem.* 2003;278(26):23529-37

Braumann T. Determination of hydrophobic parameters by reversed-phase liquid chromatography: theory, experimental techniques, and application in studies on quantitative structure-activity relationships. *J Chromatogr.* 1986;373:191-225.

Brites, D., and Brito, M. A. “Bilirubin toxicity,” in *Care of The Jaundiced Neonate*, eds D. K. Stevenson, M. J. Maisels and J. F. Watchko (New York, NY: Mc-Graw-Hill Companies, Inc.), 2012;115–143.

Butina D, Segall MD, Frankcombe K. Predicting ADME properties in silico: methods and models. *Drug Discovery Today* 2002;7(11):S83-88.

Canu A. and Leclercq R. Macrolides and Lincosamides. *Microb Drug Resist* 2012;3: 211-221

Cho, J. G., Lee, J. H., Hong, S. H., Lee, H. N., Kim, C. M., Kim, S. Y.. Tauroursodeoxycholic acid, a bile acid, promotes blood vessel repair by recruiting vasculogenic progenitor cells. *Stem Cells*. 2015;3,792–805.

Clark DE. In silico prediction of blood-brain permeation. *Drug Discov Today*. 2003;8:927-933.

Clark DE. Prediction of intestinal absorption and blood-brain barrier permeation by computational methods. *Comb. Chem. High Throughput Screen*. 2001;4: 477–496.

Cohen R. S., Wong R. J., and Stevenson D. K.. Understanding neonatal jaundice: a perspective on causation. *Pediatr. Neonatol*. 2010;51:143–148.

Collander R. The partition of organic compounds between higher alcohols and water. *Acta. Chem. Scand*. 1951;5:774-780.

Cserhati T. Lipophilicity determination of some monoamine oxidase inhibitors: the effect of methanol and ammonium chloride. *J. Liq. Chromatogr*. 1993;16:1805-17.

Duan, W. M., Rodrigues, C. M. P., Zhao, L. R., Steer, C. J., and Low, W. C. Tauroursodeoxycholic acid improves the survival and function of nigral transplants in a rat model of Parkinson's disease. *Cell Transplant*. 2002;11:195–205.

Đaković-Sekulić T, Acanski M, Perišić-Janjić N. Evaluation of the predictive power of calculation procedure for molecular hydrophobicity of some estradiol derivates. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002;766(1):67-75.

El-Bacha RS, Minn A. Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain. *Cell. Mol. Biol*. 1999;45:15–23.

Norinder U, Haeberlein M. Computational approaches to the prediction of blood-brain distribution. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2002;54: 291–313.

Ferydoun A., Ali RA., Nameh M. Study on QSPR method for theoretical calculation of heat of formation for some organic compounds. *AJPAC* 2008;2(1):6-9.

Fieser LF, Rajagopalan S., Oxidation of Steroids III. Selective oxidations and acylations in bile acid series, *J. Am. Chem. Soc*. 1950;72: 5530–5536.

Franklin E, Richard M, Stenly G, Raymond W. Physicochemical-activity relations in practice. 1. Rational and self-consistent data bank. *J Med Chem* 1975;18(6):604-7.

Geyer J, Wilke T, Petzinger E. The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn Schmiedebergs archives of pharmacology* 2006;372(6)413-431

Gherzi-Egea JF, Leninger-Muller B, Suleman G, Siest G, Minn A. Localisation of drug-metabolizing enzyme activities to blood-brain interfaces and circumventricular organs. *J. Neurochem.* 1994;62:1089–1096.

Glanzer S., Pulido S., Tutz S., Wagner G., Kriechbaum M., Gubernsack N., Trifunovic J., Dorn M., Fabian W., Novak P., Reidl J. and Zangger K. Structural and functional implications of the interaction between macrolide antibiotics and bile acids. *Chemistry-A European Journal*, 2015;21(11): 4165–4464

Gleeson MP, Hersey A, Hannongbua S. In silico ADME models: a general assessment of their utility in drug discovery applications. *Curr. Top. Med. Chem.* 2011;11(4):358–381.

Hackel M, Lascols C, Bouchillon S, Hilton B, Morgenstern D, Purdy J. Serotype prevalence and antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates among global populations. *Vaccine.* 2013;31(42):4881–4887

Hansch LA. and Uses C. T. Partition coefficients and their uses, *Chem. Rev.* 1971;71:525-616.

Haslewood G.A.D., *Bile Salts*, Methuen, London, 1967.

Ghose A.K, Viswanadhan V.N, Wendoloski J.J. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. *J. Comb. Chem.* 1999;1:55-68.

Juliano R, Daud S, Karuse H, Grant C. Membrane-to-membrane transfer of lipophilic drugs used against cancer or infectious diseases. *Annals of New York Academy of Science* 1987; 507:89-103

Kaliszan R. In: Ph. Brown R, Hartwick RA (Eds.). *High Performance Liquid Chromatography*. New York: John Wiley & Sons. 1989. str. 563-99.

Kelder J, Grootenhuis PD, Bayada DM, Delbressine LP, Ploemen JP. Polar molecular surface area as a dominating determinant for oral absorption and brainpermeation of drugs. *Pharm. Res.*1999;16: 1514–1519.

Kellogg GE, Joshi GS, Abraham DJ. New tools for modeling and understanding hydrophobicity and hydrophobic interactions. *Med Chem Res* 1992;1:444-53.

Kimura N, Masuda S, Tanihara Y, Ueo H, Okuda M, Katsura T, and Inui K. Metformin is a superior substrate for renal organic cation transporter OCT2 rather than hepatic OCT1. *Drug Metab Pharmacokinet* 2005;20:379–386

Klopman G, Wang S, Balthasar DM. Estimation of aqueous solubility of organic molecules by the group contribution approach. Application to the study of biodegradation. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 1992;32:474–482.

Koop I, Shindler M, Bosshammer A, et al. Physiological control of cholecystokinin release and pancreatic enzyme secretion by intraduodenal bile acids. *Gut* 1996;39:661-667.

Kratochwil NA, Huber W, Müller F, Kansy M, Gerber PR. Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach. *Biochem. Pharmacology* 2002;64:1355–1374.

Krueger-Thiemer E, Buenger P. The role of the therapeutic regimen in dosage design. *Chemotherapia* 1965;10:61-73, 129-44.

Kubitz R., Droge C., Kluge S., Stindt, D. Haussinger Genetic variations of bile salt Transporters. *Drug Discovery Today* 2014;12:55-67

Kuhajda K. , Kevresan S. , Kandrak J. , Fawcett J. P. , Mikov M. Chemical and metabolic transformations of selected bile acids. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2006; 31(3): 179-235

Kuwada S., Furushiro S., Kawashima M., Partial oxidation of methyl cholate, An. Rep. Takeda Res. Lab., 1949;8: 50–61.

Lambert W. Modeling oil-water partitioning and membrane permeation using reversed-phase chromatography. J. Chromatogr. A 1993;656:469-84.

Laznicek M, Laznickova A. The effect of lipophilicity on the protein binding and blood cell uptake of some acidic drugs. J. Pharm. Biomed. Anal. 1995;13:823-28.

Li AP. Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. Drug Discovery Today 2001;6:357–366

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Adv. Drug Deliv. Rev.2001;46:3–26.

Loeches M., Lisboa I., Rodriguez A, et al. Combination antibiotic therapy with macrolides improves survival in intubated patients with community-acquired pneumonia. Intensive Care Med. 2010;36(4):612–620.

Lombardo F, Shalaeva M.Y, Tupper K.A, Gao F. ElogD_{oct}: A tool for lipophilicity determination in drug discovery. 2. basic and neutral compounds. J. Med. Chem. 2001;44:2490-97.

Lombardo F, Shalaeva MY, Tupper KA, Gao F, Abraham MH. E LogP_{oct}: A tool for lipophilicity determination in drug discovery. J. Med. Chem. 2000;43:2922-2928.

Louis S. Fiser and Srinivasa Rajgopalan Oxidation of steroids III. Selective Oxidations and Acylations in the Bile Acid Series. J. Am. Chem 1950;70:5530-5536

Luis G, Valerio Jr. In silico toxicology for the pharmaceutical sciences. Toxicology and Applied Pharmacology. 2009;241(3):356-70.

Mahar D.K.M, Humphreys J.E, Webster L.O, Wring S.A, Shampine L.J, Serabjit-Singh CJ, et al. Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2002;303:1029-37.

Marjanović NI, Janković IF. Instrumentalne metode analize. Novi Sad: Tehnološki fakultet, Zavod za izdavanje udžbenika. 1983.

McFarlane A. and Sligl W., The Value of Macrolide-Based Regimens for Community-Acquired Pneumonia. *Curr Infect Dis Rep* 2015;17-50

Mikov M, Facwett JP, Kuhajda K, et al. Pharmacology of bile acids and their derivatives: Absorption promoters and therapeutic agents. *Eur J drug Metabol Pharmacokinet* 2006;31:237-251

Mikov M, Kevresan S, Kuhajda K, Jakovljevic V, Vasovic V. 3-Alpha, 7-Alpha-dihydroxy-12-oxo-5 beta-cholanate as blood-brain barrier permeator. *Pol J Pharmacol* 2004;56:367-371.

Mikov M., Facwet JP., Kevresan S., et al. Chemistry, biosynthesis, analysis, chemical and metabolic transformation and pharmacology, Mediset-Publisher, Geneva, Switzerland, 2007

Miller J.M. Chromatography: Concepts and Contrasts. New York: John Wiley & Sons. 1988.

Milojković – Opsenica D. Sorbenti u hromatografiji na tankom sloju. *Hemijski pregled*. 2000;41:38-43.

Miljković D., Kuhajda K., Hranisavljević J. Selective C-12 oxidation of cholic acid, *J. Chem. Res.*1996;2:106–107.

Misra A, Ganesh S., Shahiwala A. Drug delivery to the central nervous system: a review. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2003;6(2):252-273

Miyake K, Kitaura F, Mizuno N, Phosphatidylcholine-coated silica as a useful stationary phase for high-performance liquid chromatographic determination of partition coefficients between octanol and water. *J. Chromatogr.* 1987;389:47-56.

Miyata M., Enterobacteria Modulate Intestinal Bile Acid Transport and Homeostasis through Apical Sodium-Dependent Bile Acid Transporter (SLC10A2) Expression. *J Pharmacol Exp Ther.*2011;336:188-196

Modaa T.L, Montanarib C, Andricopuloa D. In Silico Prediction of Human Plasma Protein Binding Using Hologram QSAR, QSAR. Lett. Drug Des. Discov. 2007;4:502-9.

Nasal A, Siluk D, Kaliszan R. Chromatographic retention parameters in medicinal chemistry and molecular pharmacology. Curr. Med. Chem. 2003;10:381–426

Nasal A, Siluk D, Kaliszan R. Chromatographic retention parameters in medicinal chemistry and molecular pharmacology. Curr. Med. Chem. 2003;10:381-426.

Nau R., Sörgel,F. and Eiffert H. Penetration of Drugs through the Blood-Cerebrospinal Fluid/Blood-Brain Barrier for Treatment of Central Nervous System Infections, Clin Microbiol Rev. 2010; 23(4): 858–883.

Nie W, Li B, Xiu Q. Beta-lactam/macrolide dual therapy versus beta-lactam monotherapy for the treatment of communityacquired pneumonia in adults: a systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother. 2014;69(6):1441–1446.

Pardridge WM, Triguero D, Yang J, Cancilla PA. Comparison of in vitro and in vivo models of drug transcytosis through the blood– brain barrier. J. Pharmacol. Exp. Ther.1990;253:884–891.

Pearlman RS. Rapid generation of high quality approximate 3D molecular structures. Chem Des Autom News 1987;2:5-7.

Petrović SM, Perišić-Janjić N, Popović M, Kolarov Lj. Effect of the Organic Support on Chromatographic Retention. Journal of Planar Chromatography. 1990; 3:61-64.

Pidgeon C, Venkataram UV. Immobilized artificial membrane chromatography: supports composed of membrane lipids. Anal. Biochem. 1989;176:36-47

Posa M., Guzvany V., Mikov M., Canadi J., Effect of sodium salts of 3 α ,12 α -dihydroxy-7-oxo-5 β -cholanoic and 3,7,12-trioxo-5 β -cholanoic acids on verapamil hydrochloride in biophysical–chemical model experiments. J. Serb. Chem. Soc. 2011;76 (2):189–199

Posa M., Kuhajda K. and Raseta M., A contribution to the study of hydrophobicity (lipophilicity) of bile acids with an emphasis on oxo derivatives of 5 β -cholanoic acid, Hem. Ind. 2011;65 (2):115–121

Randić M. Generalized molecular descriptors. *J Math Chem* 1991;7(1):155-68.

Rekker RF., Mannhold R., Bijloo G., De Vries G., Dross K. The lipophilic behaviour of organic compounds: 2. The development of an aliphatic hydrocarbon/water fragmental system via interconnection with octanol-water partitioning data. *Quant Struct - Act Relat* 1998;17(6):537-48.

Roda A, Hofmann A.F., Mysels K.J. The influence of bile salt structure on self-association in aqueous solutions. *J. Biol. Chem.* 1983;258 :6362-6370.

Sabo A., Tomić Z., Rašković A., Stanulović M. *Antibakterijski lekovi*, Alfagraf, Novi Sad ,Srbija 2014

Scott R.P.W, Kucera P. Examination of five commercially available liquid chromatographic reversed phases (including the nature of the solute-solvent-stationary phase interactions associated with them). *J. Chromatography.* 1977;142:213-32.

Scott R.P.W, Kucera P. Solute interactions with the mobile and stationary phases in liquid – solid chromatography. *J. Chromatography.* 1975;112:425-42.

Scott R.P.W, Kucera P. Solute-solvent interactions on the surface of silica gel. II. *J. Chromatography.* 1979;171:37-48.

Scott R.P.W, Kucera P. The silica gel surface and its interaction with solvent and solute in liquid chromatography. *J. Chromatography.* 1980;18:297-306.

Skalsky K., Yahav D., Lador A., Eliakim-Raz N., Leibovici L., Paul M. Macrolides vs. quinolones for community-acquired pneumonia: meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(4):370–8.

Snyder LR. *Principles of Adsorption Chromatography*. New York: Marsel Dekker; 1968.

Todeschini R, Consonni V. *Handbook of Molecular Descriptors*. Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley-VCH; 2000.

Tullar B.F., Hemi-diethylene glycol adduct of 3,12-dihydroxy- 7-ketocholanic acid and preparation thereof. U.S. Patent 2,549,947, 1951

van de Waterbeemd H, Camenisch G, Folkers G, Chretien JR, Raevsky OA. Estimation of blood-brain barrier crossing of drugs using molecular size and shape, and H-bonding descriptors *J. Drug Target*, 1998;6: 151–165

van de Waterbeemd H, Gifford E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003;2:192–204.

Vasović V., Vukmirović S., Mikov M., Mikov I., Budakov Z., Stilinović N., Milijašević B. Influence of bile acid derivatives on morphine analgesic effect in mice, *Vojnosanit .Pregl.* 2014; 71(8): 767–771

Viana, R. J., Nunes, A. F., Castro, R. E., Ramalho, R. M., Meyerson, J., Fossati, S., et al. Tauroursodeoxycholic acid prevents E22Q Alzheimer's Abeta toxicity in human cerebral endothelial cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009;66:1094–1104.

Vladykovskaya, E., Sithu, S. D., Haberzettl, P., Wickramasinghe, N. S., Merchant, M. L., Hill, B. G., et al. Lipid peroxidation product 4-hydroxy-trans-2-nonenal causes endothelial activation by inducing endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* 2012;287:11398–11409.

Wang D., Jonker JW., Kato Y., Kusuhara H., Schinkel A., and Sugiyama Y. Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302:510–515

Wieland H., Kishi S., Z. Isolation of some bile acids and sterols from the feces of healthy men *Physiol. Chem.* 1933;214: 47-48

Wildman SA, Crippen GM. Prediction of physicochemical parameters by atomic contributions. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 1999;39 868-873.

Winkler DA. The role of quantitative structure – activity relationships (QSAR) in biomolecular discovery. *Briefings in Bioinformatics* 2002;3(1):73-86.

Zelcer N., Saeki T., Bot I., Kuil A., Borst P. Transport of bile acids in multidrug-resistanceprotein 3-overexpressing cells co-transfected with the ileal Na⁺-dependent bile-acid transporter. *Biochem J* 2003; 369(Pt 1): 23–30.

Zollner G., Fickert P., Fuchsbichler A., Silbert D., Wagner M., Arbeiter S., Gonzalez FJ., Marschall HU., Zatloukal K., Denk H., Trauner M.. Role of nuclear bile acid receptor, FXR, in adaptive ABC transporter regulation by cholic and ursodeoxycholic acid in mouse liver, kidney and intestine. *J Hepatol.* 2003;39(4):480-8.