



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
DEPARTMAN ZA HEMIJU



*Mihalj Poša*

**UTICAJ ŽUČNIH KISELINA NA TRANSPORTNE  
PROCESE ODABRANIH LEKOVA U *in vitro*  
EKSPERIMENTIMA**

-DOKTORSKA DISERTACIJA-

NOVI SAD, 2008.

*Ova doktorska teza rađena je na Zavodu za farmaciju i Zavodu za farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, i na Departmanu za hemiju, Prirodno Matematičkog fakulteta u Novom Sadu.*

*Najiskrenije se zahvaljujem mentoru, dr Kseniji Kuhajdi, redovnom profesoru PMF u Novom Sadu, koja je predložila temu, rukovodila radom i ukazivala mi nesebičnu i dragocenu pomoć tokom izrade ovog rada. Takođe se zahvaljujem na strpljenju u toku pisanja rada kao i na uspešnoj saradnji koja je započeta 2002. godine u toku izrade diplomskog rada i koja je nastavljena u toku izrade magistarske teze i doktorske disertacije.*

*Isto tako, zahvaljujem se dr Slavko Kevrešanu, redovnom profesoru Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu na nesebičnoj pomoći i interesovanju kao i savetima u toku izrade i pisanja disertacije.*

*Dr Jovanu Popoviću, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, se zahvaljujem na savetima i podršci i interesovanju za ovaj rad.*

*Dr Veri Ćirin-Novti, redovnom profesoru PMF u Novom Sadu, takođe dugujem veliku zahvalnost na interesovanju za ovaj rad.*

*Zahvaljujem se dr Momiru Mikovu, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, na njegovoj velikoj pomoći i podršci kao i korisnim sugestijama u toku izrade ovog rada.*

*Veoma se zahvaljujem dr Nedi Mimici-Dukić, redovnom profesoru PMF u Novom Sadu, na korisnim primedbama u toku izrade ove disertacije.*

*Takođe se zahvaljujem dr Csanádi János-u, redovnom profesoru PMF u Novom Sadu i dr Guzsvány Valériji, docentu PMF u Novom Sadu na pružanju nesebične pomoći u NMR eksperimentima. Takođe se zahvaljujem dopisnom članu Vojvođanske akademije nauka i umetnosti dr Gaál Ferenc-u, redovnom profesoru PMF u Novom Sadu na pružanju moralne podrške u toku studiranja.*

*Zahvaljujem se svim svojim kolegama na interesovanju i razumevanju. Posebno se zahvaljujem asistentima mr Milici Atanacković, mr Vesni Tepavčević i mr sc Biljani Božin.*

*I na kraju se zahvaljujem svojim roditeljima na podršci i razumevanju koju su mi pružili tokom poslediplomskih studija.*

<b>1. Uvod</b>	.....9
<b>2. Opšti deo</b>	
<b>2.1. PREGLED PRIRODNIH KETO DERIVATA ŽUČNIH KISELINA</b>	.....13
<b>2.1.1. KETO DERIVATI HOLNE KISELINE</b>	.....13
2.1.1.1. <i>3<math>\alpha</math>,12<math>\alpha</math>-dihidroksi-7-keto-5<math>\beta</math>-holanska kiselina (7-monoketoholna kiselina)</i>	.....13
2.1.1.2. <i>3<math>\alpha</math>,7<math>\alpha</math>-dihidroksi-12-keto-5<math>\beta</math>-holanska kiselina (12-monoketoholna kiselina)</i>	.....14
2.1.1.3. <i>3<math>\alpha</math>,12<math>\alpha</math>-dihidroksi-3-keto-5<math>\beta</math>-holanska kiselina (3-monoketoholna kiselina)</i>	.....15
<b>2.1.2. KETO DERIVATI DEOKSIHOLNE I HENODEOKSIHOLNE KISELINE</b>	.....16
2.1.2.1. <i>3<math>\alpha</math>-hidroksi-7-keto-5<math>\beta</math>-holanska kiselina (7-monoketohenodeoksiholna kiselina)</i>	.....16
2.1.2.2. <i>7<math>\alpha</math>-hidroksi-3-keto-5<math>\beta</math>-holanska kiselina (3-monoketohenodeoksiholna kiselina)</i>	.....17
2.1.2.3. <i>3<math>\alpha</math>-hidroksi-12-keto-5<math>\beta</math>-holanska kiselina (12-monoketodeoksiholna kiselina)</i>	.....18
2.1.2.4. <i>12<math>\alpha</math>-hidroksi-3-keto-5<math>\beta</math>-holanska kiselina (3-monoketodeoksiholna kiselina)</i>	.....19
2.1.2.5. <i>3<math>\beta</math>-hidroksi-12-keto-5<math>\beta</math>-holanska kiselina</i>	.....20
2.1.2.6. <i>3,12-diketo-5<math>\beta</math>-holanska kiselina (3,12-diketodeoksiholna kiselina, dehidrodeoksiholna kiselina)</i>	.....21
<b>2.1.3. PROMENA PLANARNE POLARNOSTI KETO DERIVATA ŽUČNIH KISELINA</b>	.....22
<b>2.2. REAKCIJE OKSIDACIJE ŽUČNIH KISELINA</b>	.....24
<b>2.3. POVRŠINSKE OSOBINE ŽUČNIH KISELINA</b>	.....36
<b>2.3.1. INTERAKCIJE ŽUČNIH KISELINA SA BIOMOLEKULIMA U POVRŠINSKOM MONOSLOJU</b>	.....41
<b>2.4. ZNAČAJ VODONIČNE VEZE U AGREGACIJI ŽUČNIH KISELINA:</b>	
<b>HELIKALNI MODEL I REVERSNE MICELE</b>	.....45
<b>2.4.1. TRANSPORT POLARNIH MOLEKULA POMOĆU REVERSNIH MICELA</b>	.....47
2.4.1.1. <i>Reversne micelle kao kanali u ćelijskoj membrani</i>	.....47
2.4.1.2. <i>Uloga reversnih micela tipa <i>Oakenfull-Fisher</i> u transportu leka kroz ćelijsku membranu</i>	.....50

<b>2.5. METODA GLAVNIH KOMPONENTI U MEDICINSKOJ HEMIJI I BIOHEMIJI</b>	.....52
<b>2.5.1. GRAFIČKO PREDSTAVLJANJE METODE     GLAVNIH KOMPONENTI</b>	.....56
2.5.1.1. Grafičko predstavljanje matrice koeficijenta glavnih komponenti	.....57
2.5.1.2. Grafički prikaz vektora glavnih komponenti	.....58
<b>2.6. METODE GRUPISANJE MOLEKULA U VIŠEDIMENZIONALNOM PROSTORU U MEDICINSKOJ HEMIJI I BIOHEMIJI</b>	.....59
2.6.1. HIJERARHIJSKO GRUPISANJE	.....59
2.6.2. NEHIJERARHIJSKO GRUPISANJE	.....61
2.6.3. PRIMENA HIJERARHIJSKOG I NEHIJERARHIJSKOG GRUPISANJA KOD ŽUČNIH KISELINA	.....61

### **EKSPERIMENTALNI DEO**

## 3. Sinteza keto derivata deoksiholne i henodeoksiholne kiseline

<b>3.1. SINTEZA 3<math>\alpha</math>-HIDROKSI-12-KETO- 5<math>\beta</math>-HOLANSKE KISELINE</b>	.....68
3.1.1. ESTERIFIKACIJA DEOKSIHOLNE KISELINE (1)	.....68
3.1.2. ACETILOVANJE METIL ESTRA DEOKSIHOLNE KISELINE (2)	.....69
3.1.3. OKSIDACIJA METIL 3 $\alpha$ -ACETOKSI- 12 $\alpha$ -HIDROKSI -5 $\beta$ -HOLANATA (3)	.....71
3.1.4. HIDROLIZA METIL 3 $\alpha$ - ACETOKSI - 12-KETO -5 $\beta$ -HOLANATA (4)	.....73
<b>3.2. SINTEZA 3<math>\alpha</math>-HIDROKSI-7-KETO- 5<math>\beta</math>-HOLANSKE KISELINE (7-MONOKETOHENODEOKSIHOLNA KISELINA, 7 )</b>	.....75
<b>3.3. SINTEZA 3,12-DIKETO-5<math>\beta</math>-HOLANSKE KISELINE (DEHIDRODEOKSIHOLNA KISELINA, 8)</b>	.....77
<b>3.4. SINTEZA 3,7-DIKETO-5<math>\beta</math>-HOLANSKE KISELINE (DEHIDROHENODEOKSIHOLNA KISELINA, 10)</b>	.....80



## 4. Biofizička ispitivanja

### 4.1. Ispitivanje samoasocijacije odabranih žučnih kiselina

4.1.1A. UTICAJ TEMPERATURE NA KRITIČNU MICELARNU KONCENTRACIJU: TERMODINAMIČKE FUNKCIJE FORMIRANJA MICELE	.....85
4.1.1B. ISPITIVANJE SAMOASOCIJACIJE HOLNE I 7-MONOKETOHOLNE KISELINE <sup>1</sup> H NMR RELAKSACIONOM METODOM	.....87
4.1.2. MATERIJAL I METODA	.....88
4.1.2.1. UTICAJ TEMPERATURE NA KRITIČNU MICELARNU KONCENTRACIJU ODABRANIH ŽUČNIH KISELINA	.....88
4.1.2.1.1. Solubilizaciona metoda	.....88
4.1.2.1.2. Direktna spektrofotometrija	.....89
4.1.2.1.3. Obrada podataka	.....89
4.1.2.2. ODREĐIVANJE KRITIČNE MICELARNE KONCENTRACIJE 7-MONOKETOHOLNE I HOLNE KISELINE <sup>1</sup> H NMR RELAKSACIONOM METODOM	.....90
4.1.3. REZULTATI I DISKUSIJA	.....90
4.1.3.1. UTICAJ TEMPERATURE NA KRITIČNU MICELARNU KONCENTRACIJU ODABRANIH ŽUČNIH KISELINA	.....90
4.1.3.2. ISPITIVANJE SAMOASOCIJACIJE 7-MONOKETOHOLNE I HOLNE KISELINE <sup>1</sup> H NMR RELAKSACIONOM METODOM	.....104

### 4.2. Ispitivanje interakcija između žučnih kiselina i odabranih lekova

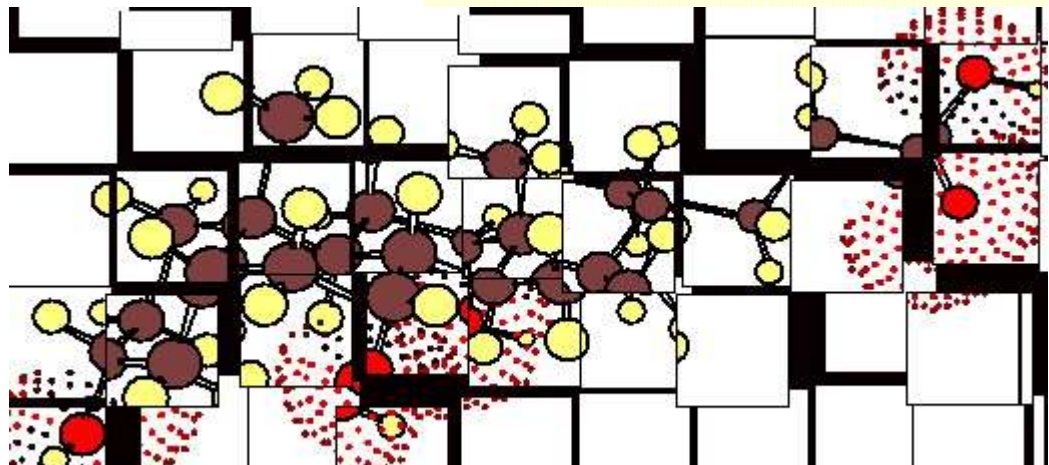
4.2.1A. ODREĐIVANJE KOMPLEKSA SA VODONIČNIM VEZAMA IZMEĐU ŽUČNIH KISELINA I LIDOKAINA U HLOROFORMU	.....113
4.2.1B. UTICAJ ŽUČNIH KISELINA NA TRANSPORT	

<b>ISPITIVANIH LEKOVA IZ VODENE FAZE I UTICAJ NA NJIHOVU ADSORPCIJU NA AKTIVNOM UGLJU</b>	.....115
<b>4.2.2. MATERIJAL I METODA</b>	.....116
<b>4.2.2.1. ODREĐIVANJE VODONIČNE VEZE IZMEĐU LIDOKAINA I ŽUČNIH KISELINA U HLOROFORMU</b>	.....116
<b>4.2.2.1.1. Određivanje ravnotežne konstante vodonične veze <sup>1</sup>H NMR metodom</b>	.....117
<b>4.2.2.2. UTICAJ ŽUČNIH KISELINA NA TRANSPORT ISPITIVANIH LEKOVA IZ VODENE FAZE U HLOROFORM I UTICAJ NA NJIHOVU ADSORPCIJU NA AKTIVNOM UGLJU</b>	.....117
<b>4.2.2.2.1. Određivanje brzine opadanja koncentracije lidokaina u vodenoj fazi</b>	.....117
<b>4.2.2.2.2. Model depo efekta lidokaina u hloroformu sa žučnim kiselinama</b>	.....118
<b>4.2.2.2.3. Određivanje uticaja ispitivanih žučnih kiselina na adsorpciju verapamila i lidokaina na aktivnom uglju</b>	.....119
<b>4.2.2.2.4. Obrada podataka</b>	.....120
<b>4.2.3. REZULTATI I DISKUSIJA</b>	.....120
<b>4.2.3.1. VODONIČNA VEZA IZMEĐU LIDOKAINA I ŽUČNIH KISELINA U HLOROFORMU</b>	.....120
<b>4.2.3.1.1. Ravnotežna konstanta vodonične veze između 3,7,12-triketoholne kiseline i lidokaina</b>	.....121
<b>4.2.3.1.2. Ravnotežna konstanta vodonične veze između 7-monoketoholne kiseline i lidokaina</b>	.....122
<b>4.2.3.1.3. Ravnotežna konstanta vodonične veze između 12-monoketodeoksiholne kiseline i lidokaina</b>	.....123
<b>4.2.3.1.4. Ravnotežna konstanta vodonične veze između 3,12-diketodeoksiholne kiseline i lidokaina</b>	.....124
<b>4.2.3.1.5. Ravnotežna konstanta vodonične veze između 7-monoketohenodeoksiholne kiseline i lidokaina</b>	.....125
<b>4.2.3.1.6. Ravnotežna konstanta vodonične veze između henodeoksiholne kiseline i lidokaina</b>	.....126
<b>4.2.3.1.7. Ravnotežna konstanta vodonične veze između 7,12-diketoholne kiseline i lidokaina</b>	.....127
<b>4.2.3.1.8. Ravnotežna konstanta vodonične veze</b>	

između 3 $\alpha$ -acetil-7,12-diketoholne kiseline i lidokaina	.....128
4.2.3.1.9. Ravnotežna konstanta vodonične veze između 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -diacetil-7-monoketoholne kiseline i lidokaina	.....129
4.2.3.1.10. Ravnotežna konstanta vodonične veze između metil estra 3 $\alpha$ -acetil-7- monoketoholne kiseline i lidokaina	.....130
4.2.3.1.11. Ravnotežna konstanta vodonične veze između metil estra 3,7,12-triketoholne kiseline i lidokaina	.....131
4.2.3.1.12. Korelacija strukture žučne kiseline sa vrednostima ravnotežne konstante nastajanja kompleksa sa vodoničnim vezama žučne kiseline i lidokaina	.....132
<b>4.2.3.2. UTICAJ ŽUČNIH KISELINA NA TRANSPORT ISPITIVANIH LEKOVA IZ VODENE FAZE I UTICAJ NA NJIHOVU ADSORPCIJU NA AKTIVNOM UGLJU</b>	.....144
4.2.3.2.1. Promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu žučnih kiselina u hloroformu	.....147
<u>4.2.3.2.1.1. Model I</u>	.....154
<u>4.2.3.2.1.2. Model II</u>	.....155
<u>4.2.3.2.1.3. Model III</u>	.....156
<u>4.2.3.2.1.4. Model IV</u>	.....158
4.2.3.2.2. Uticaj pH vrednosti vodene faze na kinetiku transfera lidokaina i verapamila u hloroform (žučne kiseline se nalaze u hloroformu)	.....160
4.2.3.2.3. Uticaj strukture žučne kiseline na kinetiku transfera lidokaina i verapamila	.....162
4.2.3.2.4. Hemometrijska analiza značaja konstante ravnoteže građenja kompleksa lidokaina i žučne kiseline na konstantu brzine opadanja koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5, kada se ispitivane žučne kiseline nalaze u hloroformu	.....163
4.2.3.2.5. Formiranje depo lidokaina sa žučnim kiselinama	.....165
4.2.3.2.6. Uticaj ispitivanih Na-soli žučnih kiselina na adsorpciju verapamila i lidokaina iz vodene sredine na aktivnom uglju	.....165

<b>5. Biohemijska ispitivanja</b>	
<b>5.1. MATERIJAL I METODA</b>	.....171
5.1.1. Određivanje ravnotežne submicelarne solubilizacije lecitina	.....171
5.1.2. Određivanje ravnotežne micelarne solubilizacije holesterola	.....172
5.1.3. Određivanje molekularne lipofilnosti na reversno faznoj tankoslojnoj hromatografiji	.....172
5.1.4. Određivanje osmotske rezistencije eritrocita i hemolitičkog potencijala	.....173
5.1.5. Određivanje uticaja Na-soli žučnih kiselina na resorpciju lidokaina i verapamila u tankom crevu <i>in vitro</i>	.....173
5.1.6. Obrada podataka	.....173
<b>5.2. REZULTATI I DISKUSIJA</b>	.....174
5.2.1. Povezanost ispitivanih žučnih kiselina u prostoru eksperimentalnih podataka	.....177
5.2.2. Submicelarna solubilizacija lecitina pomoću žučnih kiselina	.....181
5.2.3. Micelarna solubilizacija holesterola pomoću žučnih kiselina	.....190
5.2.4. Hemolitički potencijal i osmotska rezistencija žučnih kiselina	.....193
5.2.5. Određivanje uticaja Na-soli žučnih kiselina na resorpciju lidokaina i verapamila u tankom crevu <i>in vitro</i>	.....196
<b>6. Zaključak</b>	.....199
<b>7. Literatura</b>	.....206
<b>8. Prilog</b>	.....214
<b>9. Biografija</b>	.....253

# 1. Uvod



Sredinom devedesetih godina prošlog veka počela su proučavanja promotornog delovanja keto derivata holne kiseline u farmakološkim ispitivanjima [1-4]. U većini slučajeva keto derivati su ispoljili manji promotorni efekat od holne kiseline, međutim oni su ispoljili takođe i manju toksičnost u odnosu na holnu kiselinu [4,5].

Specifična geometrija molekula žučnih kiselina, posebno onih koji sa  $\alpha$ -strane steroidnog jezgra imaju dve ili više hidroksilne grupe (deoksiholna, henodeoksiholna i holna kiselina) uslovljava u vodenoj sredini nastajanje molekulskih agregata-micela elipsoidnog oblika sa hidrofobnim jezgrom i to onda, kada su žučne kiseline iznad kritične micelarne koncentracije (*CMC*) [5].

Poznavanje nastajanja molekulskih agregata žučnih kiselina u vodenoj sredini je važno zbog solubilizacije liposolubilnih supstanci kako u biološkim sistemima tako i u farmaceutskoj industriji [6-10]. Kritična micelarna koncentracija žučnih kiselina je važna karakteristika, pošto njena vrednost određuje sposobnost njihove samoasocijacije [11] i građenja mešovitih micela naročito sa hidrofobnim katjonskim lekovima [12].

Predpostavlja se da promotorni efekat žučnih kiselina na transport nekih lekova kroz ćelijsku membranu je uslovljen nastajanjem reversnih micela u lipidnoj fazi membrane [13]. Međutim, u literaturi je dat i model, gde žučne kiseline grade normalne micelle u membrani kao što ih grade i u vodenoj sredini, što se objašnjava time, da sa povećanjem hidrofobne površine žučnih kiselina povećava transport peptidnih lekova kroz ćelijsku membranu. [14].

Poznavanje temperaturne zavisnosti kritične micelarne koncentracije keto derivata holne kiseline pored fundamentalnog značaja neophodno je i za tumačenje farmakološkog delovanja kako samih žučnih kiselina tako i za njihove interakcije sa odgovarajućim lekovima, pošto se procesi u organizmu odvijaju u temperaturnom intervalu od 36-41 °C.

Stoga jedan od ciljeva ovog rada je da se odredi temperaturna zavisnost kritične micelarne koncentracije, odnosno standardne termodinamičke funkcije keto derivata holne, deoksiholne i henodeoksiholne kiseline koje do sada nisu poznate. Takođe, cilj ovog rada je i da se nađe zavisnost između standardnih termodinamičkih funkcija pre svega entropije i odgovarajućih molekulskih deskriptora ispitivanih žučnih kiselina pomoću višestruke regresije i metode glavnih komponenti.

Cilj je bio i određivanje što tačnije vrednosti kritične micelarne koncentracije holne i 7-monoketoholne kiseline. Naime, ove kiseline imaju najveće promotorno delovanje, a najmanju toksičnost. Stoga je bitno poznavanje tačne vrednosti *CMC* naročito kada se primenjuju in vivo, gde njihove koncentracije ne smeju biti veće od

CMC koje tada izazivaju solubilizaciju membrane. Za određivanje vrednosti CMC korišćena je  $^1\text{H}$  NMR relaksaciona metoda.

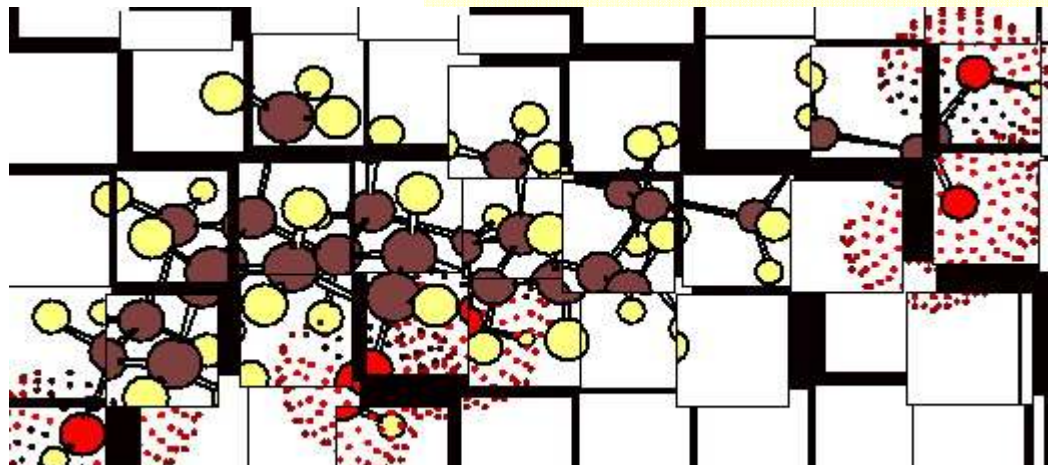
U našim ranijim ispitivanjima [4] uticaja žučnih kiselina na lokalno anestetičko delovanje lidokaina u infiltracionoj anesteziji repa pacova, utvrđeno je da holna kiselina i njeni monoketoderivati statistički značajno smanjuju latentno vreme anestezije (vreme od aplikacije leka do uspostavljanja potpune anestezije) odnosno produžuju vreme trajanja lokalne anestezije. Predložen je pri tome i mehanizam delovanja žučnih kiselina po kome u lipidnoj fazi membrane ili na površini membrane nastaje kompleks žučne kiseline i lidokaina pomoću vodoničnih veza. Stoga je bio cilj da se u ovom radu pomoću  $^1\text{H}$  NMR spektrometrijskih merenja potvrdi ranije predloženi mehanizam interakcija ispitivanih žučnih kiselina i lidokaina. Za kvantifikaciju ovih interakcija koristi se ravnotežna konstanta nastajanja vodonične veze između amidnog vodonika lidokaina i proton akceptora većeg broja strukturno različitih žučnih kiselina u  $\text{CDCl}_3$ .

Isto tako je bio cilj, da se odredi uticaj žučnih kiselina na transport lidokaina i verapamila iz vodene faze u organski rastvarač (koji modeluje membranu), kada se žučne kiseline nalaze u organskom rastvaraču. Pomoću ovih oglada se modeluje predtretman bioloških sistema sa žučnim kiselinama. Naime, u većini slučajeva kada se ispituje promotorno delovanje žučnih kiselina kod eksperimentalnih životinja, žučne kiseline se apliciraju pre ispitivanog leka [1-3]. Takođe, je bio cilj da se povežu promene kinetičkih parametara uzrokovane prisustvom žučnih kiselina sa konstantom ravnoteže građenja kompleksa sa vodoničnim vezama između žučnih kiselina i lidokaina, te da se postavi nov model (višestruka regresija i metoda glavnih komponenti) za interakciju lidokaina i žučnih kiselina.

Dalji cilj je bio da se odredi uticaj žučnih kiselina na adsorpciju lidokaina i verapamila na aktivnom uglju. Ovaj deo ispitivanja modeluje površinsko delovanje žučnih kiselina na graničnoj površini voda / ćelijska membrana, gde se žučne kiseline adsorbuju i tako modifikuju graničnu površinu voda / ćelijska membrana.

I kao poslednje, za ispitivane žučne kiseline je određen kapacitet solubilizacije lecitina i holesterola, što je važno pre svega sa toksikološkog aspekta (oštećenje ćelijske membrane), odnosno određena je osmotska rezistencija eritrocita.

# 2. Opšti deo

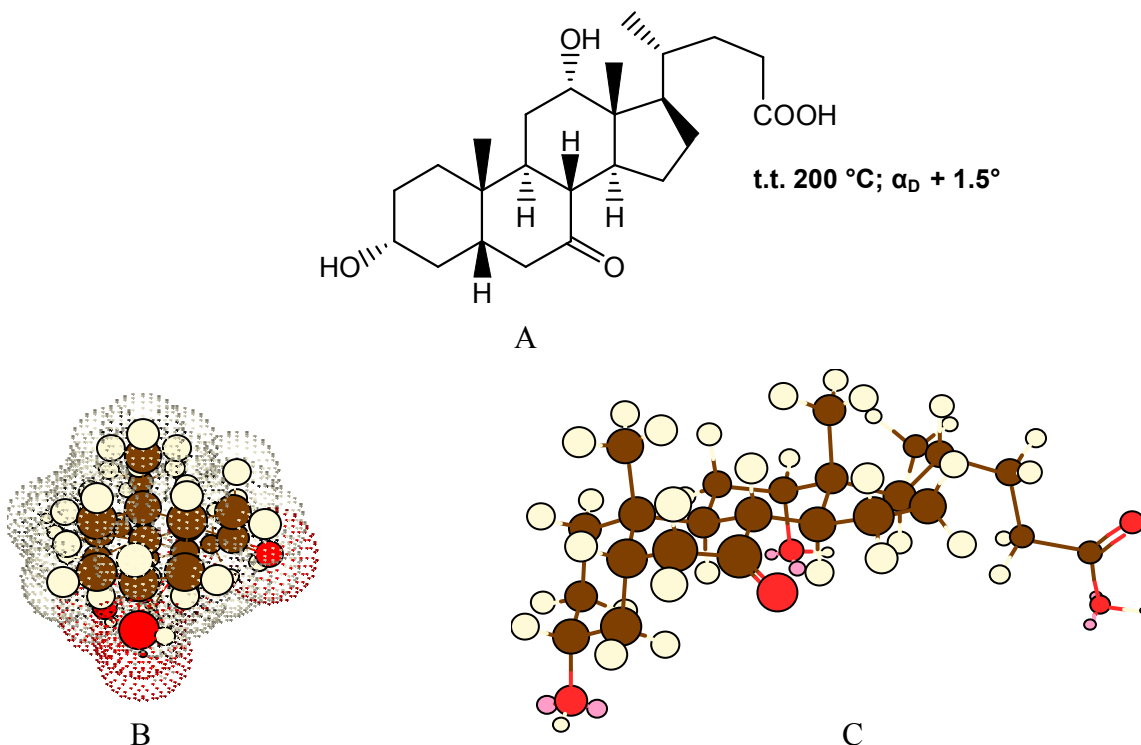




## 2.1. PREGLED PRIRODNIH KETO DERIVATA ŽUČNIH KISELINA

### 2.1.1. KETO DERIVATI HOLNE KISELINE

#### 2.1.1.1. 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroksi-7-keto-5 $\beta$ -holanska kiselina (7-monoketoholna kiselina)

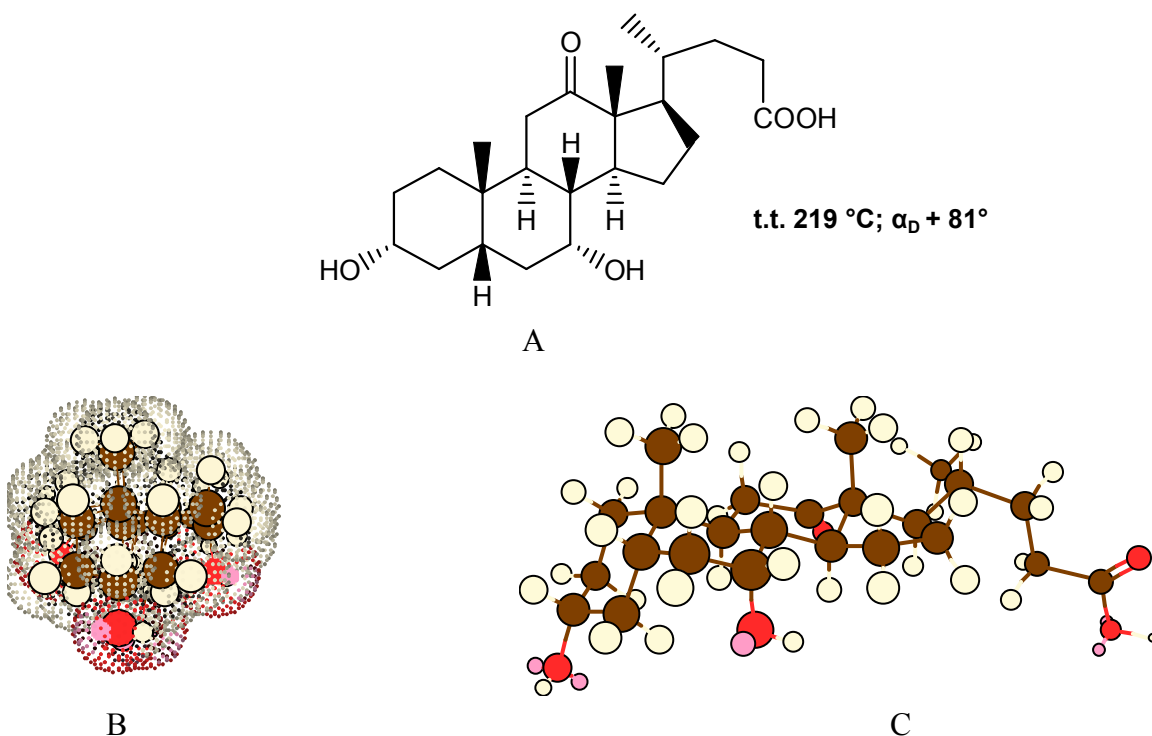


Slika 2.1. A: Strukturna formula 7-monoketoholne kiseline. B: "Ball and stick" model poprečnog preseka molekula zajedno sa Van der Wals-ovim radijusima atoma. C: "Ball and stick" model molekula gledan sa bočne strane.

Najrasprostranjenija žučna kiselina sa keto grupom u prirodi je 7-monoketoholna kiselina, koju je *Haslewood* izolovao iz žuči domaće mačke [15]. Takođe ova žučna kiselina je nađena u žuči zmijske, majmuna i pacova. Kasnije je 7-monoketoholna kiselina izolovana i iz fecesa čoveka, psa i pacova.

Poša i saradnici su zapazili u svojim farmakodinamičkim ispitivanjima da 7-monoketoholna kiselina smanjuje latentno vreme lidokaina u lokalnoj anesteziji odnosno, da produžava lokalno anestetičko delovanje lidokaina [4].

3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihidroksi-7-keto-5 $\beta$ -holanska kiselina se laboratorijski dobija selektivnom oksidacijom C7 OH grupe holne kiseline sa bromom u slabo alkalnoj sredini [1].

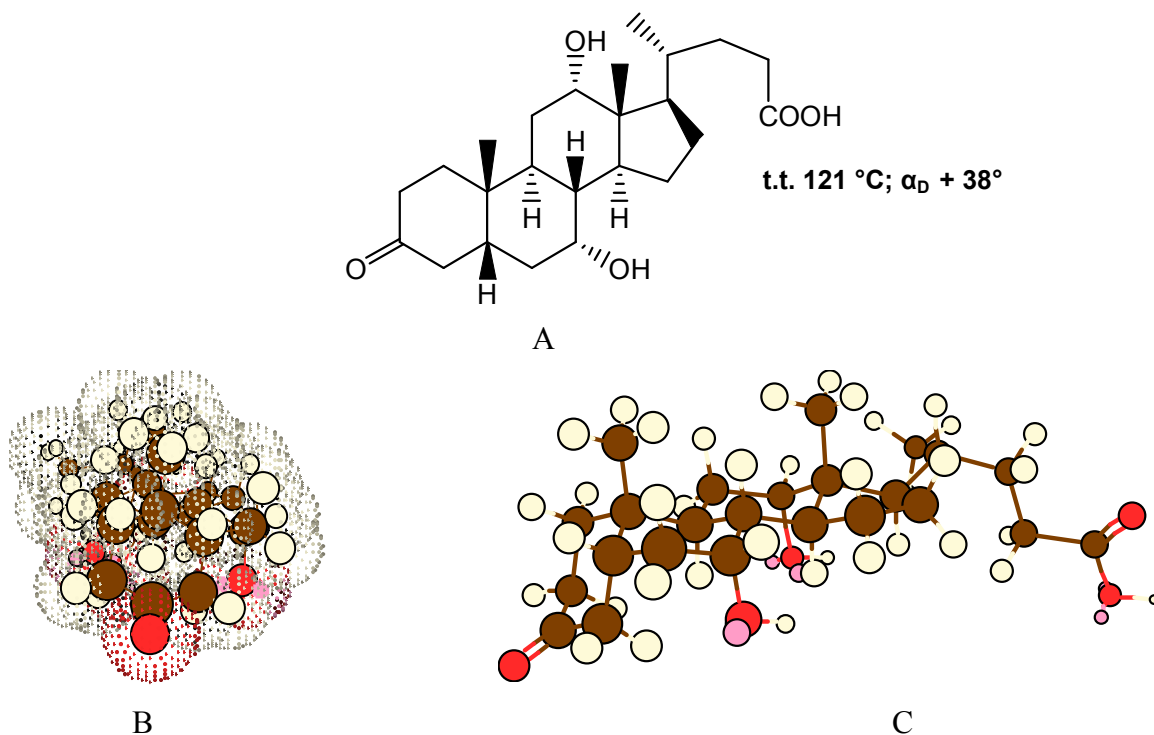
2.1.1.2. 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroksi-12-keto-5 $\beta$ -holanska kiselina (12-monoketoholna kiselina)

Slika 2.2. A: Strukturna formula 12-monoketoholne kiseline. B: "Ball and stick" model poprečnog preseka molekula zajedno sa Van der Wals-ovim radijusima atoma. C: "Ball and stick" model molekula gledan sa bočne strane.

*Eneroth* i saradnici su 1963. godine izolovali 12-monoketoholnu kiselinu iz humanog fecesa, koja dosada nije nađena u drugim prirodnim izvorima [16].

Međutim 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroksi-12-keto-5 $\beta$ -holanska kiselina je proučavana u velikom broju farmakodinamičkih oglada. *Rašković* i saradnici [3] su našli da 12-monoketoholna kiselina smanjuje koncentraciju glukoze u krvi pacova, dok je *Vasović* sa saradnicima [2] dokazao promotorno delovanje 12-monoketoholne kiseline u transportu nekih lekova (morfin, hinidin i acetilsalicilna kiselina) kroz kvno-moždanu barijeru. *Poša* i saradnici su našli da 12-monoketoholna kiselina, kao i 7-monoketoholna kiselina utiču na latentno vreme lidokaina kao i na produženo delovanje lokalne infiltracione anestezije kod pacova [4].

3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -Dihidroksi-12-keto-5 $\beta$ -holanska kiselina se laboratorijski dobija u višefaznoj sintezi, gde se prvo C3 i C7 OH grupe zaštićuju, dok se C12 OH grupa oksiduje sa CrO<sub>3</sub> ili K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> u dvofaznom sistemu etra (hloroform) i vode [1].

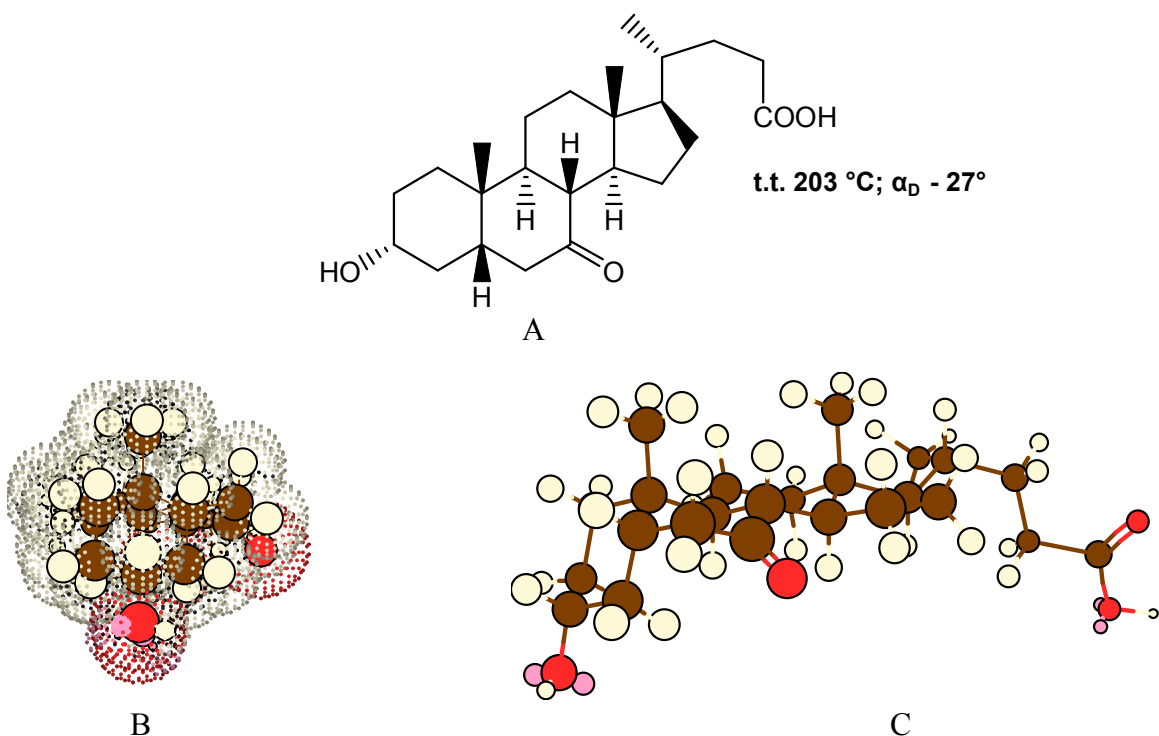
2.1.1.3.  $3\alpha,12\alpha$ -dihidroksi-3-keto- $5\beta$ -holanska kiselina (3-monoketoholna kiselina)

Slika 2.3. A: Strukturna formula 3-monoketoholne kiseline. B: "Ball and stick" model poprečnog preseka molekula zajedno sa Van der Wals-ovim radijusima atoma. C: "Ball and stick" model molekula gledan sa bočne strane.

*Haslewood* je iz žuči domaće mačke izolovao 3-monoketoholnu kiselinu 1946. godine, dok u drugim prirodnim izvorima nije dosada nađena [15].

*Sihn* (1938.) i *Haslewood* (1944.) su sintetisali  $3\alpha,12\alpha$ -dihidroksi-3-keto- $5\beta$ -holansku kiselinu *Oppenauer*-ovom oksidacijom metil estra holne kiseline [17,18].

## 2.1.2. KETO DERIVATI DEOKSIHOLNE I HENODEOKSIHOLNE KISELINE

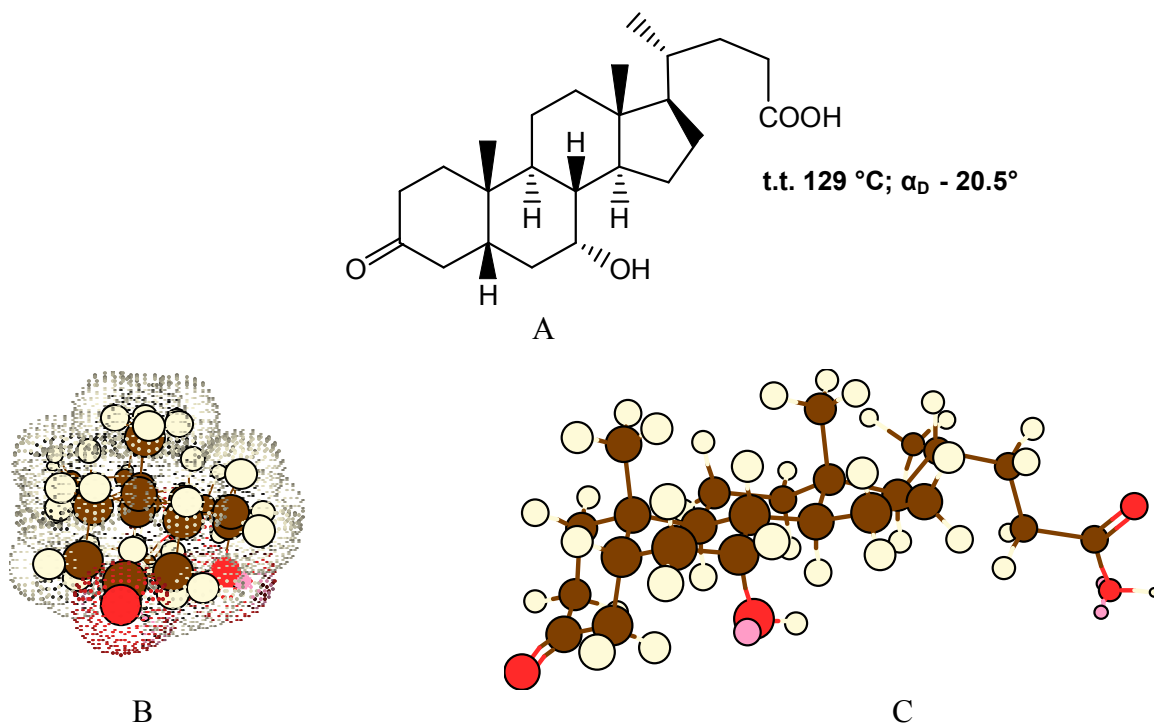
2.1.2.1. 3 $\alpha$ -hidroksi-7-keto-5 $\beta$ -holanska kiselina (7-monoketohenodeoksiholna kiselina)

Slika 2.4. A: Strukturna formula 7-monoketohenodeoksiholne kiseline. B: "Ball and stick" model poprečnog preseka molekula zajedno sa Van der Wals-ovim radijusima atoma. C: "Ball and stick" model molekula gledan sa bočne strane.

Pored 7-monoketoholne kiseline, 7-monoketohenodeoksiholna kiselina je najrasprostranjenija keto žučna kiselina. *Imai* je 1937. godine izolovao 7-monoketohenodeoksiholnu kiselinu iz žuči morskog praseta [19]. Dok je 1954. godine *Haslewood* izolovao 7-monoketohenodeoksiholnu kiselinu iz pileće žuči [20]. *Ali* i saradnici su 1960. godine dokazali prisustvo ove žučne kiseline u fecesu čoveka [21].

*Fieser* i *Rajagopalan* su 1950. godine sintetisali 3 $\alpha$ -hidroksi-7-keto-5 $\beta$ -holansku kiselinu selektivnom oksidacijom C7 OH grupe henodeoksiholne kiseline sa bromom u slabo alkalnoj sredini [22].

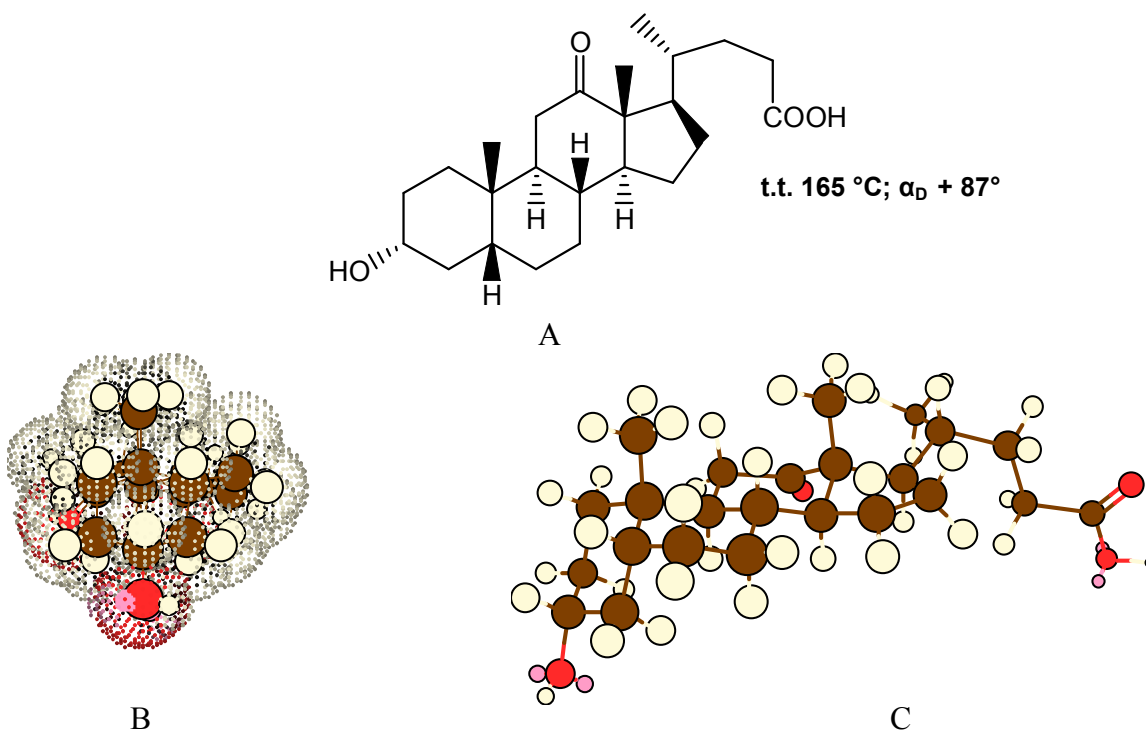
### 2.1.2.2. 7 $\alpha$ -hidroksi-3-keto-5 $\beta$ -holanska kiselina (3-monoketohenodeoksiholna kiselina)



Slika 2.5. A: Strukturna formula 3-monoketohenodeoksiholne kiseline. B: “Ball and stick” model poprečnog preseka molekula zajedno sa Van der Wals-ovim radijusima atoma. C: “Ball and stick” model molekula gledan sa bočne strane.

*Eneroth* sa saradnicima je 1966. godine dokazao prisustvo 3-monoketohenodeoksiholne kiseline u humanom fecesu [16]. Da sada ova žučna kiselina nije nađena u drugim prirodnim izvorima.

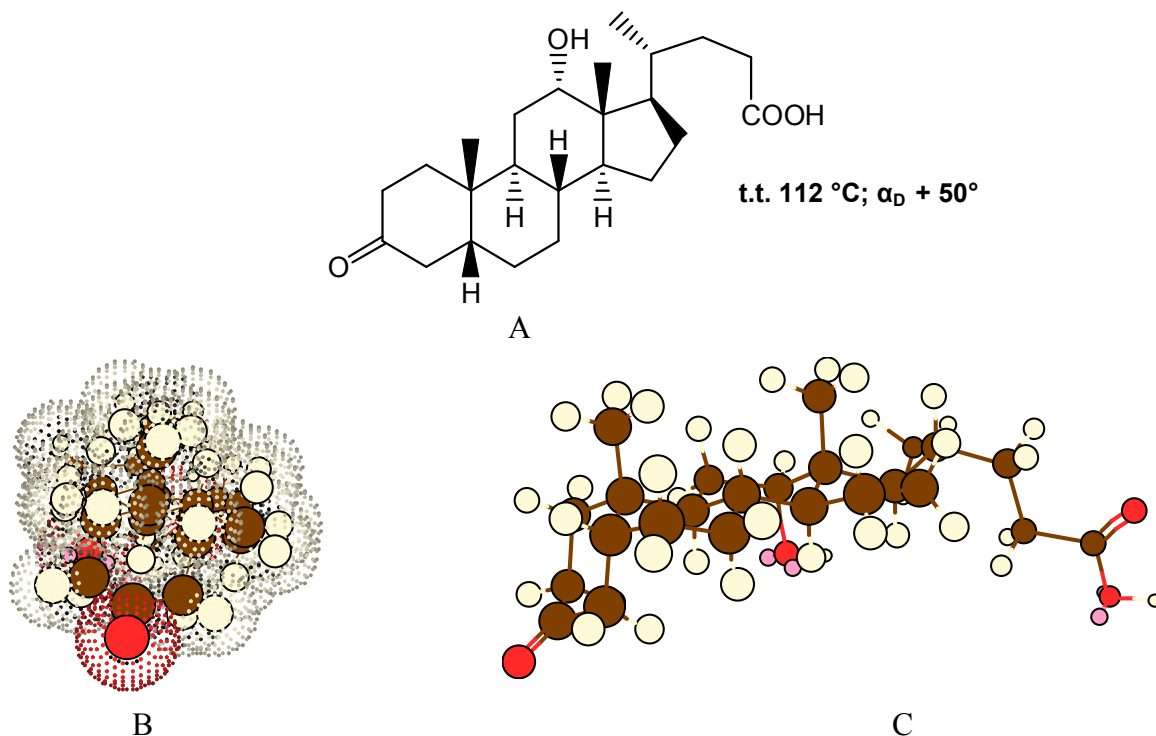
7 $\alpha$ -Hidroksi-3-keto-5 $\beta$ -holansku kiselinu su 1962. godine sintetizovali *Danielsson* i saradnici polazeći od henodeoksiholne kiseline (*Oppenauer*-ova oksidacija) [23].

2.1.2.3. 3 $\alpha$ -hidroksi-12-keto-5 $\beta$ -holanska kiselina (12-monoketodeoksiholna kiselina)

Slika 2.6. A: Strukturna formula 12-monoketodeoksiholne kiseline. B: “Ball and stick” model poprečnog preseka molekula zajedno sa Van der Wals-ovim radijusima atoma. C: “Ball and stick” model molekula gledan sa bočne strane.

*Weyland* je još 1920. godine dobio 12-monoketodeoksiholnu kiselinu kao molekularni kompleks sa henodeoksiholnom kiselinom [24]. Dok su *Wieland* i *Kishi* 1933. godine izolovali 12-monoketodeoksiholnu kiselinu u čistom obliku iz goveđe žuči [25]. *Haslewood* je 3 $\alpha$ -hidroksi-12-keto-5 $\beta$ -holansku kiselinu 1967. godine detektovao u fecesu različitih sisara [26].

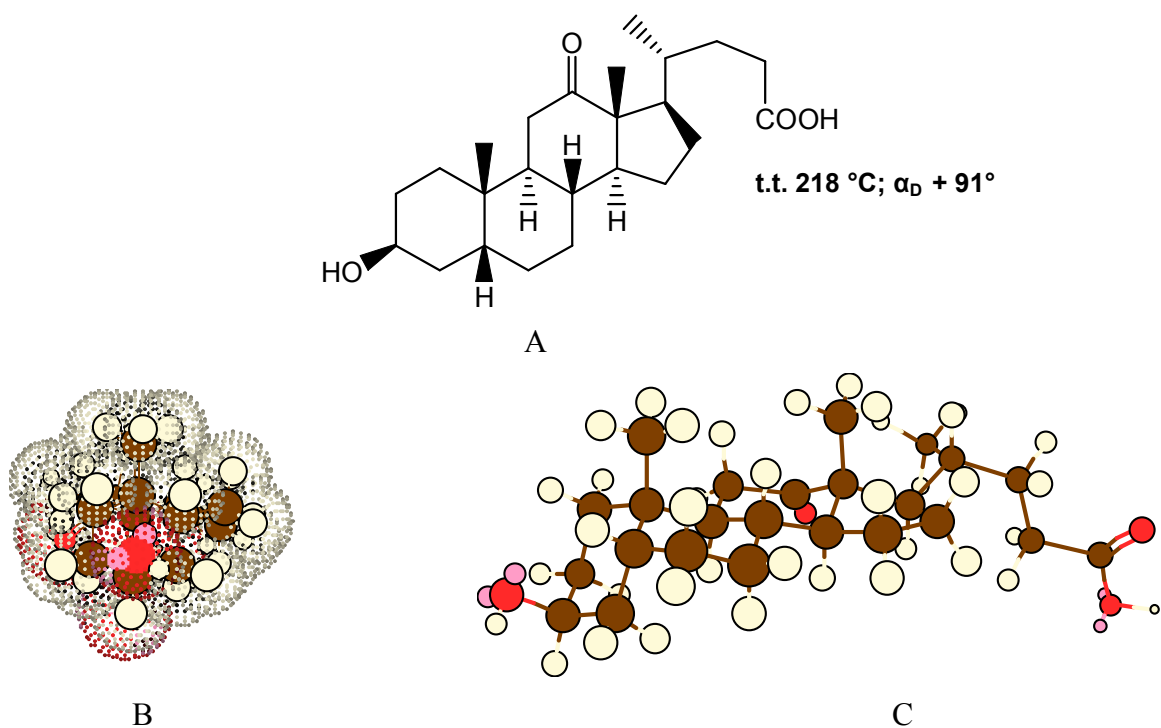
12-Monoketodeoksiholna kiselina se dobija ili direktinom oksidacijom deoksiholne kiseline ili oksidacijom deoksiholne kiseline gde je C3 OH grupa zaštićena [27].

2.1.2.4. 12 $\alpha$ -hidroksi-3-keto-5 $\beta$ -holanska kiselina (3-monoketodeoksiholna kiselina)

Slika 2.7. A: Strukturna formula 3-monoketodeoksiholne kiseline. B: "Ball and stick" model poprečnog preseka molekula zajedno sa Van der Wals-ovim radijusima atoma. C: "Ball and stick" model molekula gledan sa bočne strane.

3-Monoketodeoksiholnu kiselinu su detektovali u humanom fecesu 1966. godine nezavisno jedni od drugih *Ali* i saradnici [21] odnosno *Eneroth* i saradnici [16].

12 $\alpha$ -Hidroksi-3-keto-5 $\beta$ -holansku kiselinu su 1935. godine sintetizovali *Yamasaki* i *Kyogoku* u reakciji oksidacije 12 $\alpha$ -monoacetoksideoksiholne kiseline sa hrom(VI)-oksidom [30].

2.1.2.5. 3 $\beta$ -hidroksi-12-keto-5 $\beta$ -holanska kiselina

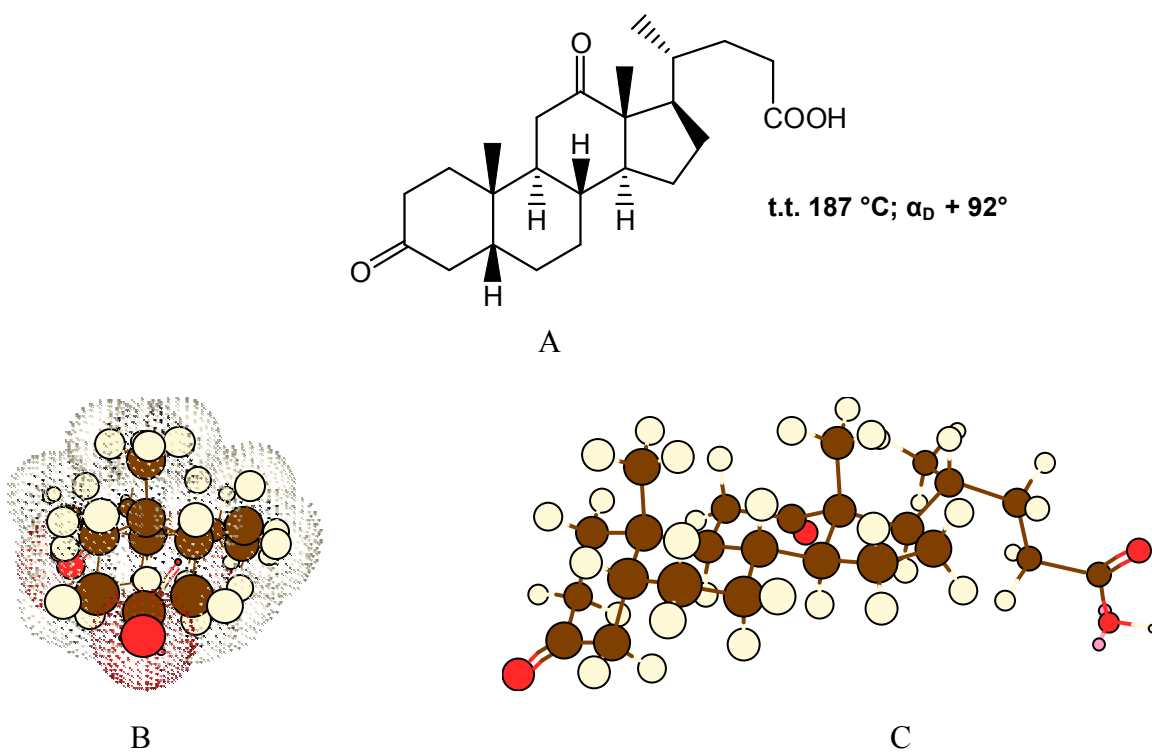
Slika 2.8. A: Strukturna formula 3 $\beta$ -hidroksi-12-keto-5 $\beta$ -holanske kiseline. B: “Ball and stick” model poprečnog preseka molekula zajedno sa Van der Wals-ovim radijusima atoma. C: “Ball and stick” model molekula gledan sa bočne strane.

*Danielsson* i saradnici su 1963. godine detektovali 3 $\beta$ -hidroksi-12-keto-5 $\beta$ -holansku kiselinu u fecesu čoveka i zeca [28]. Do sada nije nađena u drugim prirodnim izvorima.

*Danielsson* i saradnici su 1963. godine takođe i sintetizovali 3 $\beta$ -hidroksi-12-keto-5 $\beta$ -holansku kiselinu polazeći od dehidrodeoksiholne kiseline, kod koje su selektivno redukovali C3 keto grupu [29].



2.1.2.6. 3,12-diketo-5 $\beta$ -holanska kiselina (3,12-diketodeoksiholna kiselina, dehidrodeoksiholna kiselina)

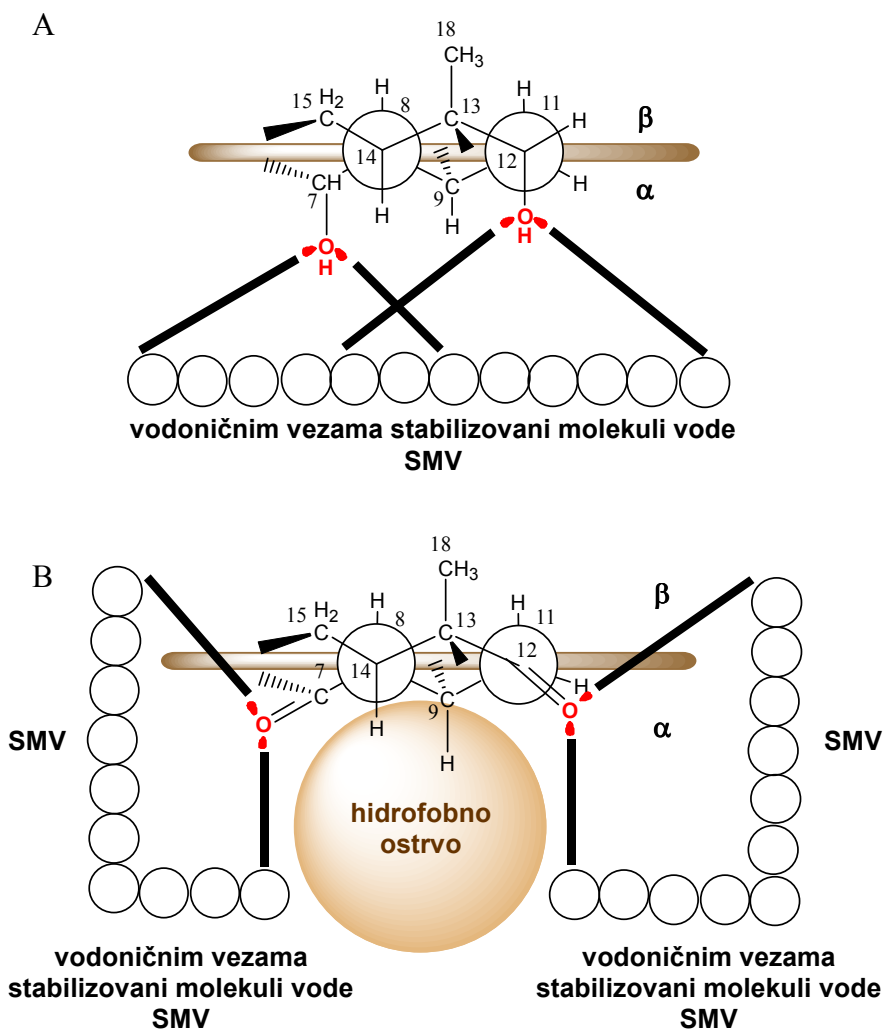


Slika 2.9. A: Strukturna formula 3,12-diketodeoksiholne kiseline. B: “Ball and stick” model poprečnog preseka molekula zajedno sa Van der Wals-ovim radijusima atoma. C: “Ball and stick” model molekula gledan sa bočne strane.

*Eneroth* je sa saradnicima 1966. godine detektovao prisustvo dehidrodeoksiholne kiseline u humanom fecesu [16], do sada u drugim prirodnim izvorima nije nađena.

*Wiland* i *Boersch* su 1919. godine sintetizovali 3,12-diketo-5 $\beta$ -holansku kiselinu koristeći reakciju oksidacije deoksiholne kiseline sa hrom(VI)-oksidom u glacijalnoj sirćetnoj kiselini [31].

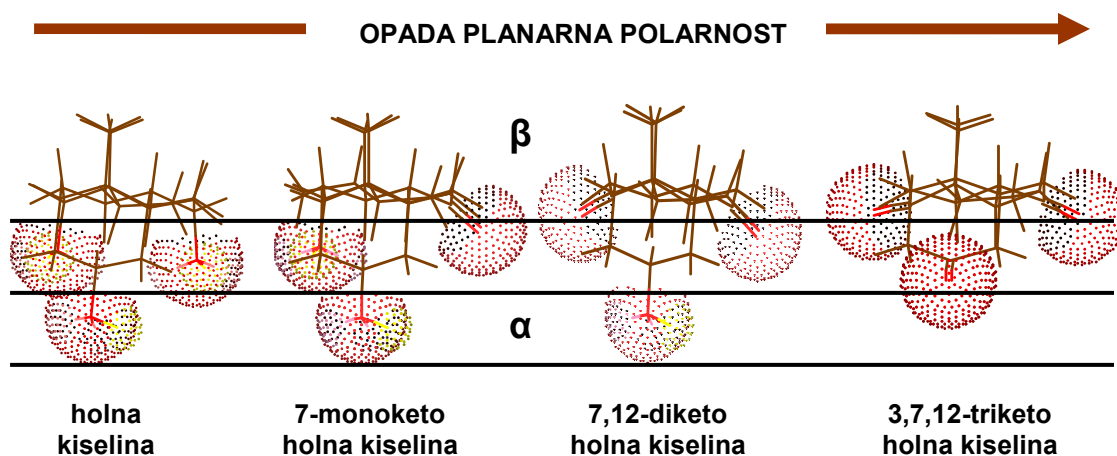
### 2.1.3. PROMENA PLANARNE POLARNOSTI KETO DERIVATA ŽUČNIH KISELINA



Slika 2.10. Promena planarne polarnosti. A: Holna kiselina (Newman-ovom projekcionom formulom prikazana je okolina C7 OH i C12 OH grupe). B: 7,12-diketoholna kiselina (Newman-ovom projekcionom formulom prikazana je okolina C7 keto i C12 keto grupe).

Početakom osamdesetih godina prošloga veka veliki broj istraživača (*Iida i Chang* [32], *Roda i saradnici* [5,6,33], *Carey i saradnici* [13,36], *Miyajima i saradnici* [34], *Dopico i saradnici* [35]) u hemiji žučnih kiselina koristi termin, planarna polarnost, koji se pre svega odnosi na deo molekula holne kiseline, gde su OH grupe  $\alpha$  orijentisane. Zbog toga su molekuli vode u solvatacionom omotaču holne kiseline stabilizovani vodoničnim vezama isključivo sa  $\alpha$  strane steroidnog jezgra (Slika 2.10. A), što znači da je ova strana ( $\alpha$ ) hidrofilni deo molekula, dok je  $\beta$  strana hidrofobni deo. Prema tome, planarna polarnost označava razdvajanje hidrofobnog i hidrofilnog dela molekula, pa je isključivo jedna strana molekula hidrofilna, dok je druga hidrofobna. *Armstrong i Carey*

su predložili [36] da se u opisivanju polarnosti odnosno lipofilnosti žučnih kiselina umesto termina hidrofilni koristi termin manje hidrofoban. Što znači, da je kod holne kiseline  $\beta$  strana steroidnog jezgra hidrofobna, dok je  $\alpha$  strana manje hidrofobna. Supstitucija OH grupe sa keto grupom kod holne kiseline narušava planarnu polarnost. Naime, kiseonik iz keto grupe ima orijentaciju između  $\alpha$  aksijalne i  $\beta$  ekvatorijalne OH grupe, odnosno kiseonik keto grupe je pomeren ka srednjoj ravni steroidnog skeleta. Stoga molekuli vode se stabilizuju sa vodoničnim vezama i sa  $\beta$  strane molekula kao i sa  $\alpha$  strane (Slika 2.10. B). Dalja supstitucija OH grupe sa keto grupom rezultuje i povećanje rastojanja između atoma kiseonika iz steroidnog skeleta. Ovo je predstavljeno na Slici 2.10. B koja prikazuje okolinu C7 i C12 keto grupe iz 7,12-diketoholne kiseline. Naime, rastojanje između kiseonika iz keto grupa kod ovog molekula je veće u odnosu na rastojanje između kiseonika OH grupe sa C7 i C12 ugljenika holne kiseline (Slika 2.10. A), što ima za posledicu formiranje dela solvacionog sloja sa  $\alpha$  strane steroidnog skeleta gde molekuli vode nisu stabilizovani vodoničnim vezama, i ova oblast se označava kao hidrofobno ostrvo (Slika 2.10. B). Prema tome, supstitucija OH grupe keto grupom uzrokuje opadanje planarne polarnosti pošto je  $\beta$  strana steroidnog jezgra manje hidrofobna u odnosu na holnu kiselinu, dok je  $\alpha$  strana molekula više hidrofobna u odnosu na polazni molekul (manje hidrofilna), međutim ukupan efekat supstitucije je da se povećava hidrofilna površina molekula [33,35]. Poša i saradnici [11] su ustanovili da zamena OH funkcije sa keto grupom kod holne kiseline uzrokuje porast kritične micelarne koncentracije, što je veći broj keto grupa to je vrednost kritične micelarne koncentracije veća. Ovo je u skladu sa narušavanjem planarne polarnosti to jest, smanjenje planarne polarnosti keto derivata holne kiseline je u korelaciji sa smanjenjem ukupne hidrofobne površine, odnosno smanjenjem težnje samoasocijacije (građenje micela) (Slika 2.11.).

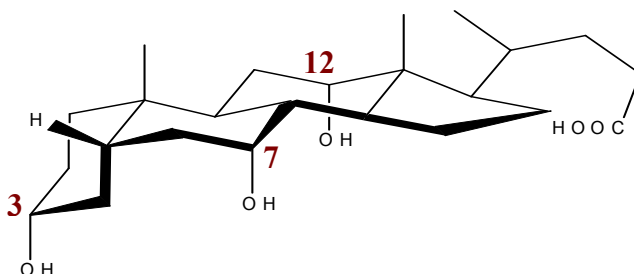


Slika 2.11. Promena planarne polarnosti keto derivata holne kiseline.

Bowe i saradnici su dokazali da smanjenje planarne polarnosti, odnosno povećanje vrednosti kritične micelarne koncentracije žučnih kiselina smanjuje njihovu toksičnost, pošto opada njihova sposobnost da grade mešane micela sa fosfolipidima ćelijske membrane [14]. Ovo su potvrdili Poša i saradnici kod keto derivata holne kiseline u eksperimentima sa pacovima [4].

## 2.2. REAKCIJE OKSIDACIJE ŽUČNIH KISELINA

Analizom konformacione strukture holne kiseline može se objasniti karakteristična reaktivnost hidroksidnih grupa u reakcijama oksidacije. Holna kiselina ( $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihidroksi- $5\beta$ -holanska kiselina) sadrži tri  $\alpha$  orijentisane OH grupe u položajima C3 (ekvatorijalna), C7 i C12 (aksijalne) (Slika 2.12.).



Slika 2.12. Konformaciona struktura holne kiseline.

Davno je primećena različita reaktivnost kod tri OH grupe holne kiseline u reakcijama oksidacije. Utvrđeni red reaktivnosti je:  $C7 > C12 > C3$ , ali isti ne važi za katalitičku oksidaciju, kao ni za oksidaciju po *Oppenauer*-u, pošto se u ovim slučajevima zbog promenjenog mehanizma prvo oksiduje hidroksilna grupa na C3.

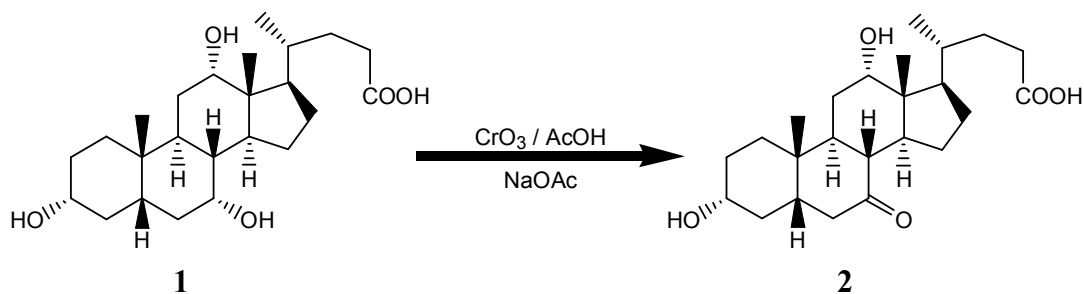
Brža oksidacija aksijalnih OH grupa od ekvatorijalnih OH grupa kod krutih cikloheksanovih derivata se objašnjava sa:

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

Za oksidacije hidroksilnih grupa žučnih kiselina najčešće se primenjuju sledeće reakcije:

- neselektivna oksidacija pomoću hrom(VI)-oksida ili  $K_2Cr_2O_7$  (podešavanjem količine oksidansa reakcija se može podesiti za selektivnu oksidaciju C7 OH grupe)
- regioselektivna oksidacija C3 OH grupe *Oppenauer*-ovom oksidacijom
- regioselektivna oksidacija C3 OH grupe uz katalizator  $Ag_2CO_3$  na celitnom adsorbensu
- regioselektivna oksidacija C3 i C7 OH grupa sa  $KMnO_4$
- regioselektivna oksidacija C12 OH grupe, gde se žučna kiselina prvo prevodi u amid, koji se onda oksidiše bromom u alkalnoj sredini
- regioselektivna oksidacija C7 OH grupe sa bromom u alkalnoj sredini.

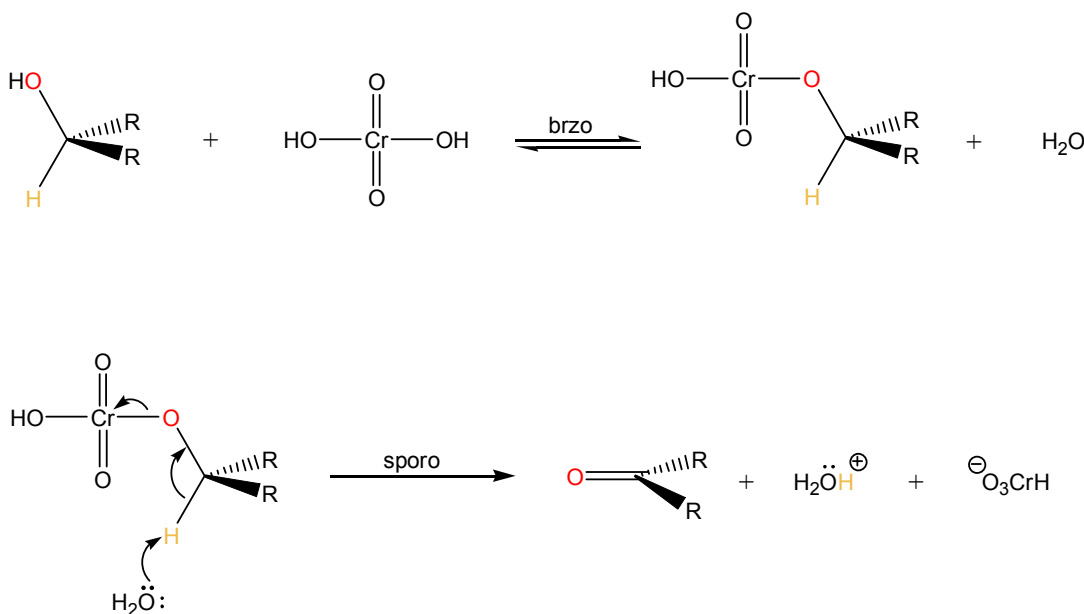
*Haslewood* [37] je prvi proučavao regioselektivnu oksidaciju holne kiseline (**1**) u  $3\alpha,12\alpha$ -7-monoketo- $5\beta$ -holansku kiselinu (**2**), odnosno oksidaciju hidroksilne grupe na C7. Selektivna oksidacija je izvršena sa vodenim rastvorom kalijum-dihromata u sirćetnoj kiselini u prisustvu natrijum-acetata (Slika 2.13.).



Slika 2.13. Selektivna oksidacija OH grupe C7 holne kiseline (1).

Hromna kiselina može oksidovati sve tri hidroksilne grupe holne kiseline, ali će se prvo oksidovati OH grupa na C7, potom na C12 i na kraju na C3. Isti je red reaktivnosti OH grupa i kod oksidacije sa bromom u baznoj sredini.

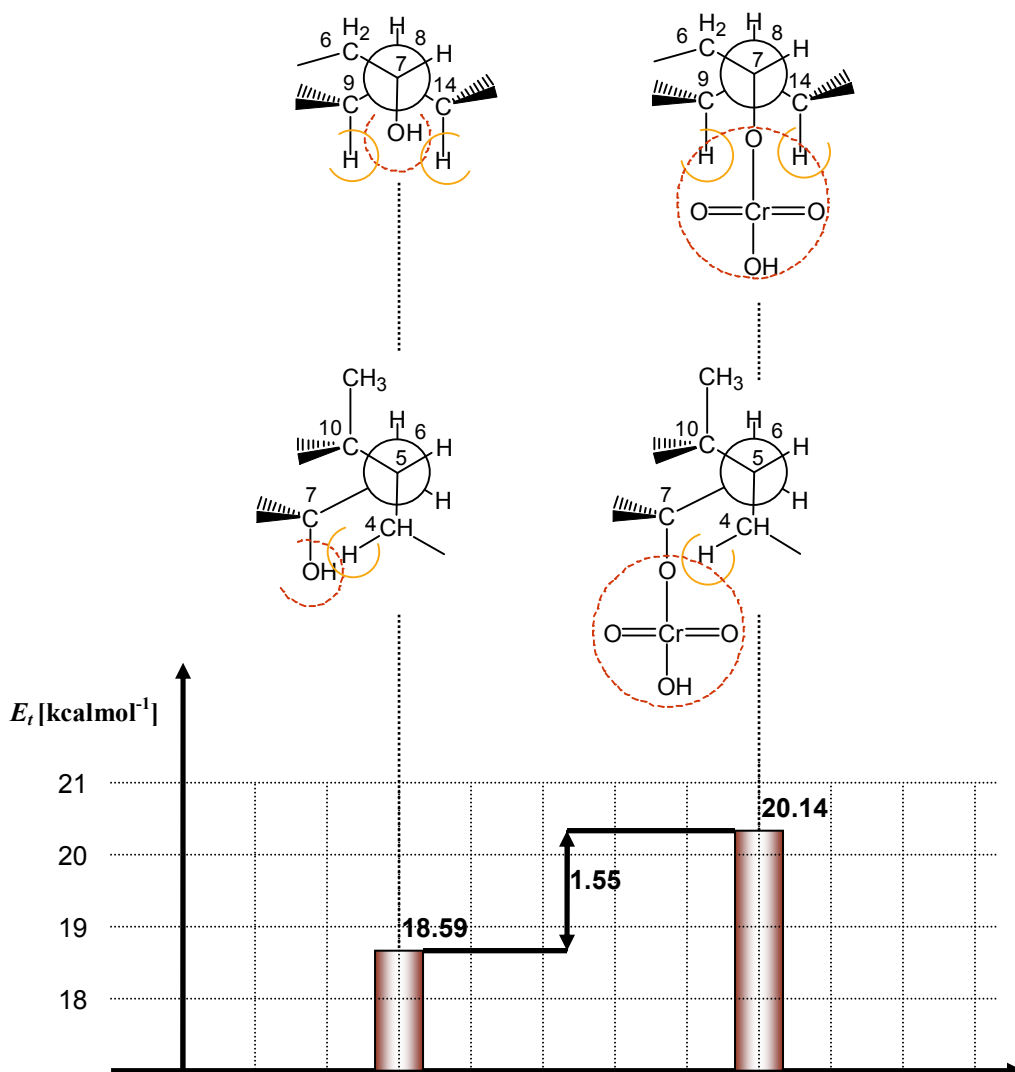
Prema *Westheimer*-u [38] mehanizam oksidacije sa hromnom kiselinom u vodenom rastvoru sirćetne kiseline je sledeći (Slika 2.14.):



Slika 2.14. Mehanizam oksidacije sa hromnom kiselinom.

Mehanizam je potvrđen pomoću izotopnog efekta i time je dokazano da je faza raskidanja C-H veze ta koja određuje brzinu oksidacije. Gore navedeni mehanizam potvrđen je i zapažanjima *Schreiber*-a i *Eschenmoser*-a [39], prema kojima promena tetragonalnog C atoma ( $sp^3$ ) alkoholne grupe u trigonalni C atom ( $sp^2$ ) keto grupe eliminuje repulzivne interakcije koje su destabilisale polazni molekul (holnu kiselinu) i još više destabilisali hromatni estar holne kiseline. Brzina oksidacije će zavistiti od veličine smanjenja repulzivnih interakcija. Repulzivne interakcije između hidroksilnih grupa i aksijalnih vodonika holne kiseline mogu se posmatrati *Newman*-ovim projekcionim formulama.

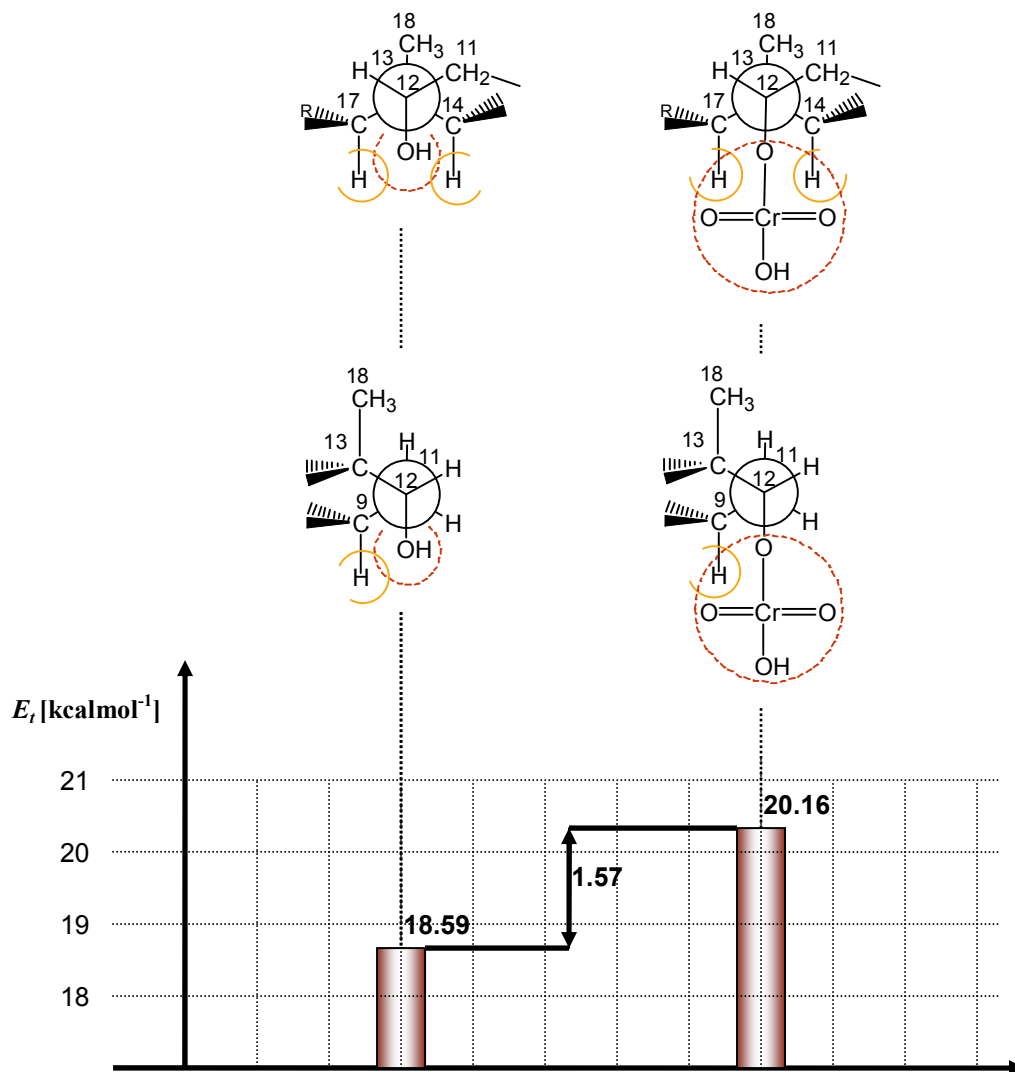
Na Slici 2.15. prikazani su sinklinalni položaji C9 i C14 metinskih grupa, kao i sinklinalni položaj C4 metilenske grupe prema aksijalnoj hidroksilnoj grupi na C7. Zbog bliskog sternog rasporeda hidroksilne grupe na C7 i aksijalnih vodonika vezanih za gore navedene sinklinalne grupe javlja se repulzivna sila (*van der Waals*-ova odbojna sila), koja se povećava pri uvođenju hromatne estarske funkcije koja je znatno voluminoznija od hidroksilne grupe.



Slika 2.15. Povećanje torzione energije pri prevođenju C7 OH grupe holne kiseline u hromatnu estarsku funkciju.

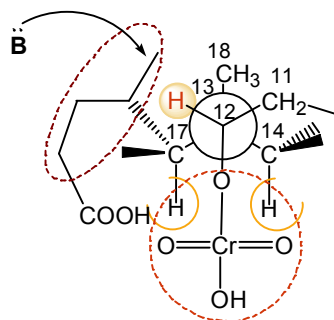
Na slici 2.16. je prikazana stereohemija okoline aksijalne hidroksilne grupe koja je vezana za C12. Zbog njenog sinklinalnog položaja sa metinskim grupama C14, C9 i C17 javlja se *van der Waals*-ova odbojna repulzivna interakcija sa aksijalnim vodoncima koji su vezani za gore navedene C atome i koja se povećava pri uvođenju hromatne estarske funkcije u aksijalni položaj na C12. Sa Slike 2.15. i 2.16. se vidi da su

obe hidroksilne funkcionalne grupe u sinklinalnom položaju sa tri ugljenika, pa bi se očekivala ista reaktivnost. Međutim, reaktivnost hidroksilne grupe na C12 u reakciji oksidacije je smanjena zbog veće zaklonjenosti ekvatorijalnog vodonika na C12 (koji treba u drugoj fazi da se eliminiše), bočnim nizom sa C17 (Slika 2.17.).



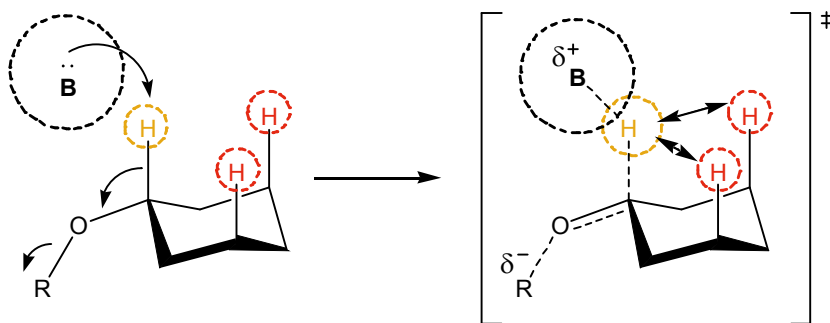
Slika 2.16. Povećanje torzione energije pri prevođenju C7 OH grupe holne kiseline u hromatnu estarsku funkciju.

Hidroksilna funkcija na C3 je sinklinalna sa vodoncima susednih metilenskih grupa, a uvođenje voluminoznije hromatne estarske funkcije na C3 ne dovodi do znatnijeg povećanja repulzivnih interakcija, pa samim tim ni do povećanja reaktivnosti.

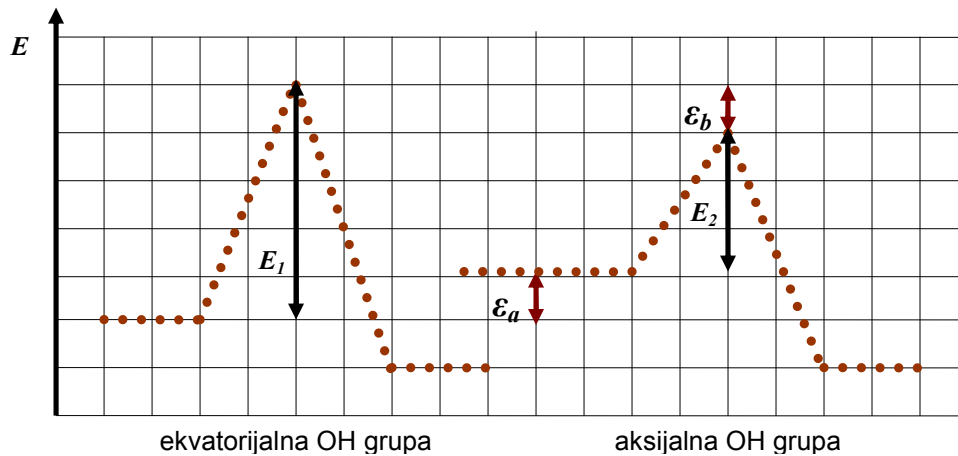


Slika 2.17. Uticaj bočnog niza: bočni niz otežava prilaz baze ekvatorijalnom vodoniku sa C12.

Međutim, ukoliko se vrši oksidacija ekvatorijalne OH grupe na C3, u drugoj fazi oksidacije koja određuje brzinu reakcije, zbog voluminoznosti baze koja apstrahuje aksijalni proton, raste 1,3-diaksijalna interakcija što povećava aktivacionu energiju, to jest usporava reakciju oksidacije (Slika 2.18.).



Slika 2.18. Povećanje 1,3-diaksijalne interakcije u prelaznom stanju druge faze reakcije oksidacije ekvatorijalne OH grupe kada baza apstrahuje aksijalni proton.

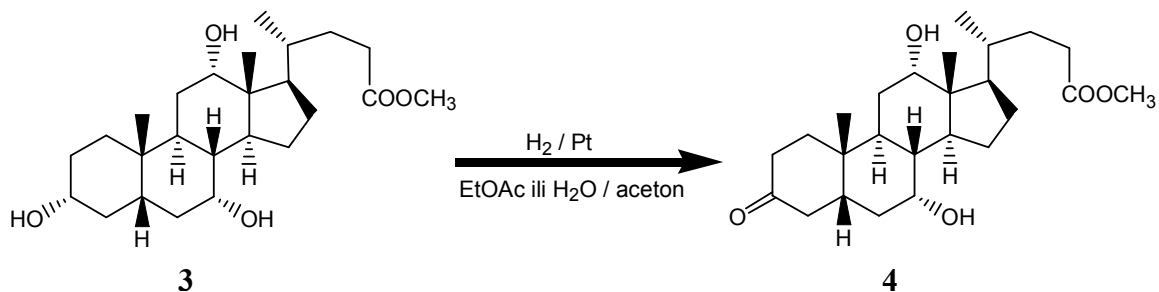


Slika 2.19. Energetski dijagram faze koja određuje brzinu u reakciji oksidacije.

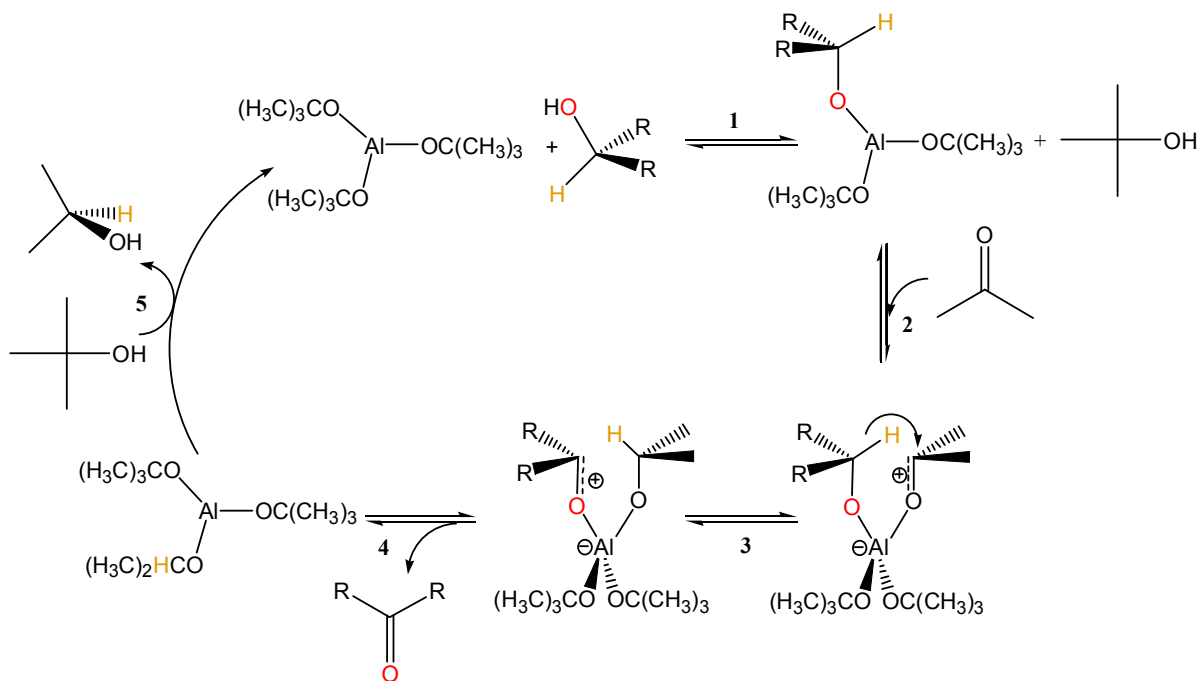


Na Slici 2.19. predstavljen je reakcioni dijagram druge (spore faze) oksidacije holne kiseline sa hromnom kiselinom. Smanjenje aktivacione barijere (aktivacione energije  $E_2$ ) kod aksijalne OH grupe je posledica veće torzione energije aksijalnog hromatnog estra ( $\epsilon_a$ ) od ekvatorijalnog i manjeg sadržaja energije prelaznog stanja ( $\epsilon_b$ ) kada se oksiduje aksijalna OH grupa, pošto se apstrahuje ekvatorijalni vodonik ne javlja se 1,3-diaksijalna interakcija [40].

Katalitička oksidacija na platini ili *Raney*-niklu, kao i oksidacija po *Oppenaur*-u sa aluminijom-alkoksidom u acetonu (ili nekom drugom ketonu) odvija se po drugačijem mehanizmu koji dovodi prvo do oksidacije hidroksilne grupe na C3 [41] (Slika 2.20.).



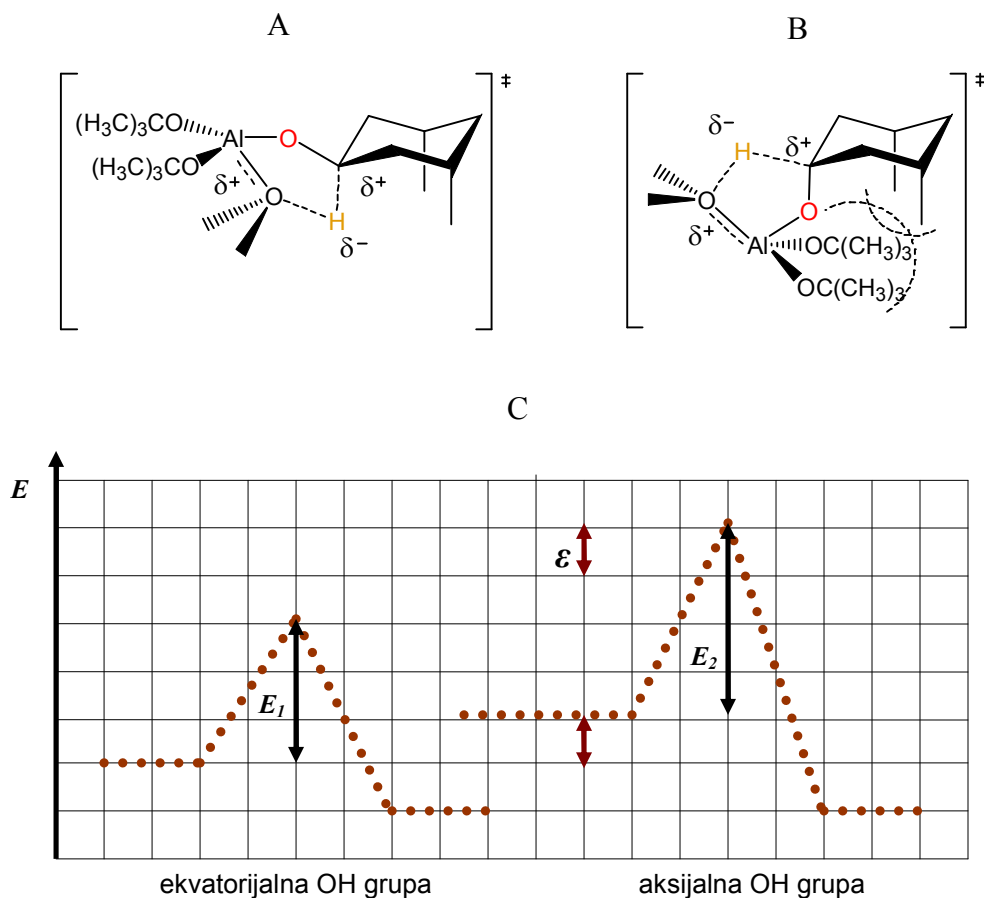
Slika 2.20. Selektivna oksidacija OH grupe C3 metil estra holne kiseline (3) u metil 7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroksi-3-monoketo-5 $\beta$ -holanat (4).



Slika 2.21. Mehanizam *Oppenaur*-ove oksidacije.

Kod *Oppenaur*-ove [42] oksidacije (Slika 2.21.) prva faza (1) je ravnotežna reakcija izmene *tert*-butanola iz aluminijum-*tert*-butoksida sa sekundarnim alkoholom (žučnom kiselinom). U drugoj fazi (2) aceton koji se nalazi u višku gradi koordinativnu

vezu sa centralnim jonom aluminijuma iz trigonalno planarnog kompleksa (jedan od liganda je žučna kiselina) pri čemu nastaje tetraedarski kompleks. Treća faza oksidacije (3) predstavlja prelaz hidridnog anjona sa žučne kiseline na pozitivno polarizovani elektrofilni karbonilni ugljenik acetona u tetraederskom kompleksu, faza oksidacije žučne kiseline. U narednoj fazi (4) tetraedarski kompleks se razlaže uz oslobađanje oksidovane žučne kiseline. Poslednja faza mehanizma je regeneracija aluminijum-*terc*-butoksida uz oslobađanje izopropanola (redukovani aceton). U *Oppenauer*-ovoj reakciji oksidacije žučna kiselina je u obliku metil estra koji se rastvara u benzenu u prisustvu aluminijum-*terc*-butoksida i viška acetona.

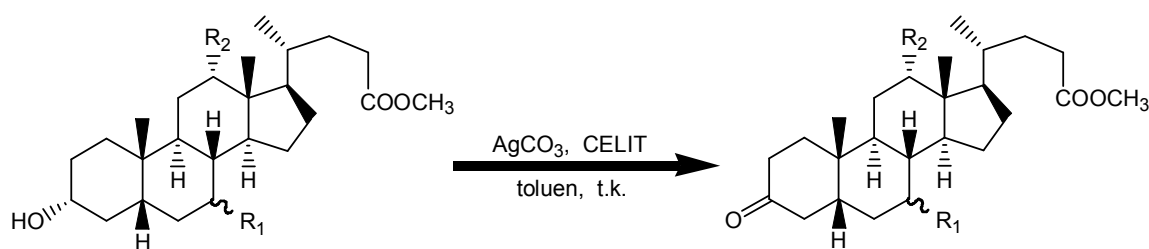


Slika 2.22. Prelazno stanje reakcije premeštanja hidridnog anjona kod *Oppenauer*-ove oksidacije.

Selektivna oksidacija ekvatorijalne OH grupe u prisustvu aksijalne OH grupe kod *Oppenauer*-ove oksidacije se može objasniti ako se posmatra prelazno stanje transfera hidridnog anjona sa žučne kiseline na karbonilni ugljenik acetona (Slika 2.22.). Ukoliko se koordinatnom kovalentnom vezom vezuje ekvatorijalni kiseonik za centralni jon tada izostaje 1,3-diaksijalna interakcija sa reagensom (aluminijumski kompleks), Slika 2.22. A, dok ukoliko koordinatnom kovalentnom vezom se vezuje aksijalna OH grupa onda usled voluminoznosti aluminijumskog kompleksa nastaje 1,3-diaksijalna interakcija koja povećava energiju vezane žučne kiseline (Slika 2.22. B). 1,3-Diaksijalna interakcija

pored toga, povećava i energiju prelaznog stanja transfera hidridnog jona za isto prelazno stanje kada je žučna kiselina vezana preko ekvatorijalnog kiseonika. Slika 2.22. C predstavlja porast energije prelaznog stanja kada se vezuje aksijalna OH grupa,  $\epsilon$  odgovara povećanju energije prelaznog stanja pri prelazu hidridnog jona što je posledica porasta energije celog sistema usled 1,3-diaksijalne interakcije.

Iz rada *Danielsson*-a [43] se vidi da kod oksidacije žučnih kiselina po *Oppenaur*-u nastaje složena smeša proizvoda, a i prinosi 3-monoketo derivata su mali. Stoga je *Tsreng* [44] poboljšao selektivnu oksidaciju OH grupe na C3 ugljeniku žučnih kiselina koristeći celit koji je impregriran sa  $\text{AgCO}_3$ , a koju su prvo opisali *Fetizon* i *Golfier* [45]. *Tsreng* je oksidovao metil estre žučnih kiselina u ključalom toluolu i odredio da se na celitu najbrže oksiduje metil estar litoholne kiseline, dok uvođenje OH grupe smanjuje brzinu oksidacije (Slika 2.23.).

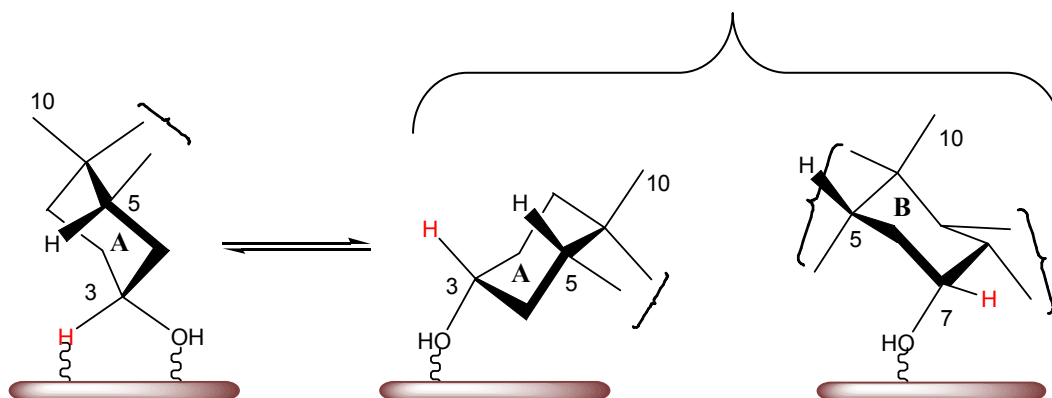
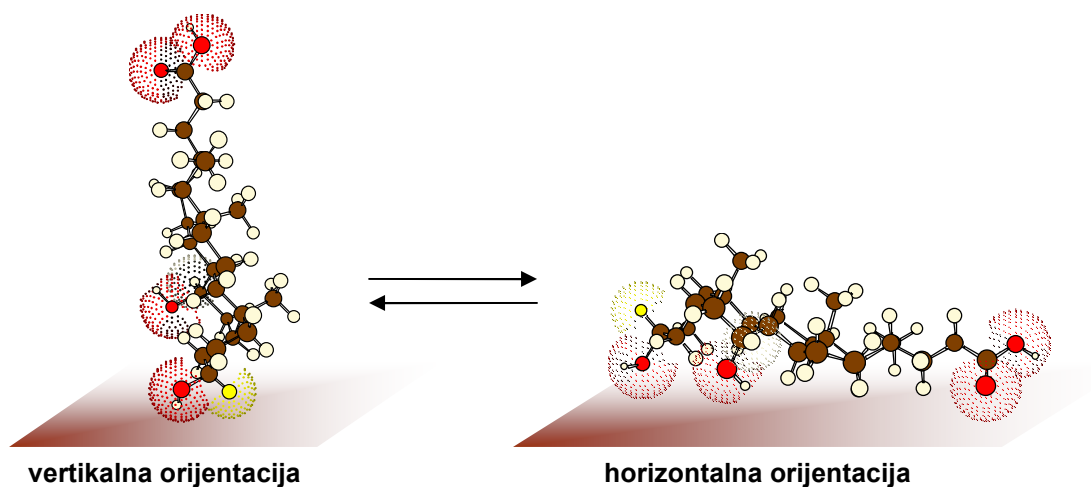


#### Vreme trajanja oksidacije OH grupe na C3

Žučne kiseline	Položaj i orijentacija	Vreme reakcije[h]:
metil estar litoholne kiseline	$R_1 = \text{H}, R_2 = \text{H}$	1
metil estar deoksiholne kiseline	$R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH} (\alpha)$	1.5
metil estar henodeoksiholne kiseline	$R_1 = \text{OH} (\alpha), R_2 = \text{H}$	2
metil estar ursodeoksiholne kiseline	$R_1 = \text{OH} (\beta), R_2 = \text{H}$	2.5

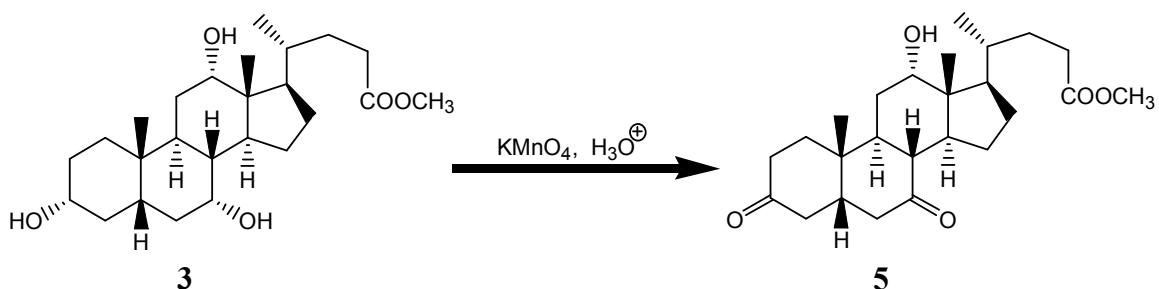
Slika 2.23. Selektivna oksidacija OH grupe C3 na celitu.

*Kakis* sa saradnicima [46] objašnjava različitu brzinu oksidacije OH grupe sa C3 kod žučnih kiselina na celitu predpostavljajući dve vrste orijentacije žučne kiseline na površini adsorbensa: vertikalnu i horizontalnu koje su međusobno u ravnoteži (Slika 2.24.). Kod vertikalne orijentacije C3 OH grupa i C3 vodonik su vezani za površinu celita, što je neophodno za oksidaciju, dok ostale OH grupe i vodonici su slobodni (objašnjenje za selektivnost). Pri horizontalnoj orijentaciji sve OH grupe kao i COOH grupa su vezane za površinu adsorbensa, ali nijedan vodonik sa ugljenika koji ima OH grupu, stoga je ova orijentacija neaktivna u reakciji oksidacije. Međutim, ako žučna kiselina ima više OH grupa onda je ravnoteža predstavljena na Slici 2.24. pomerenka ka horizontalnoj orijentaciji, i oksidacija je usporena. Tako metil estar litoholne kiseline se oksiduje za 1 sat, ravnoteža je pomerenka ka aktivnom obliku, vertikalna orijentacija, dok za oksidaciju OH grupe na C3 metil estara holne kiseline je potrebno sedam sati.



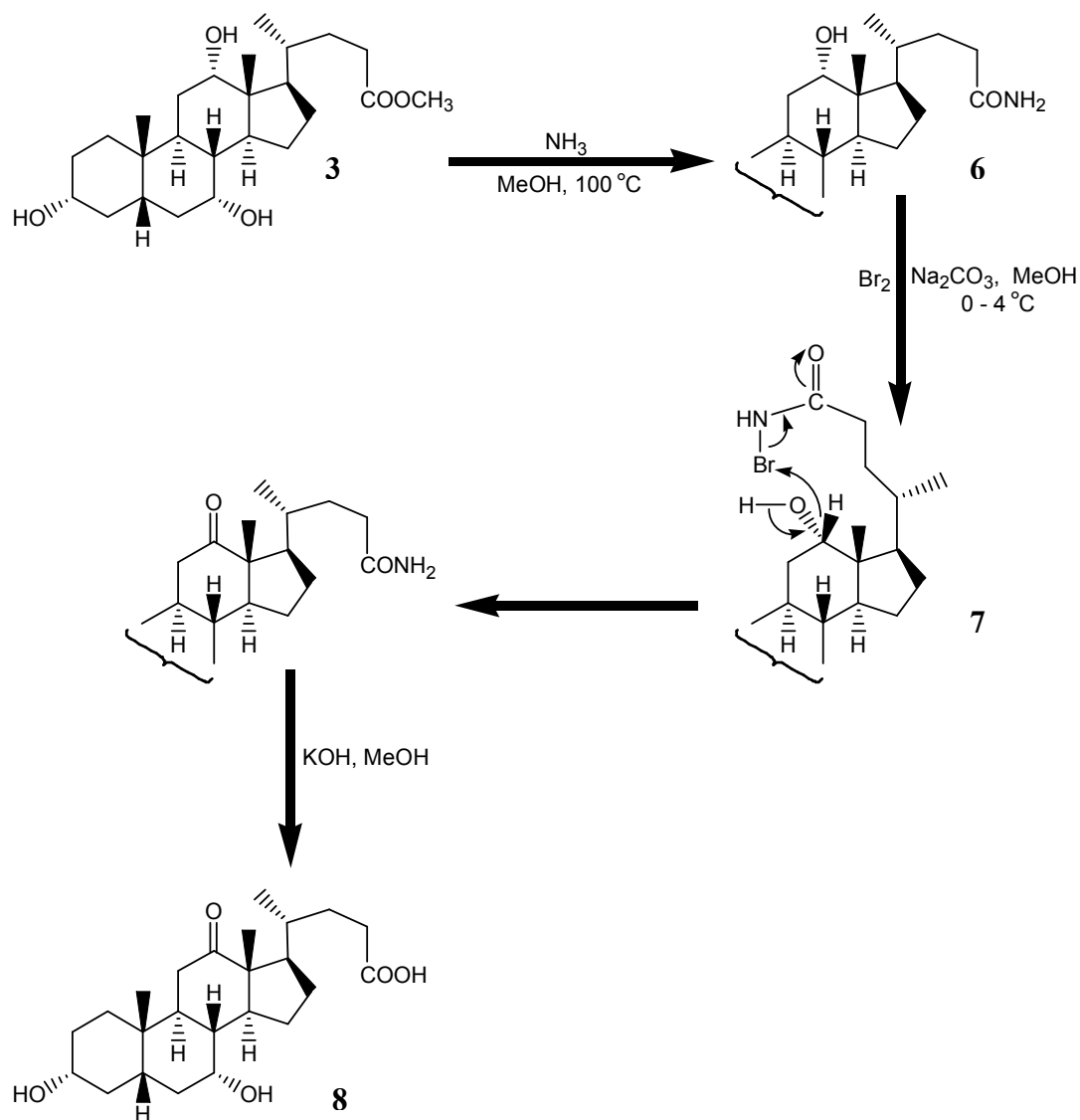
Slika 2.24. Orijentacija adsorbovanih žučnih kiselina na celitu.

Kuwada i saradnici [47] su primetili da metil estar holne kiseline (**3**) u kiseljoj sredini na sobnoj temperaturi sa  $\text{KMnO}_4$  se selektivno oksiduje u metil estar 12 $\alpha$ -hidroksi-3,7-diketo 5 $\beta$ -holansku kiselinu (**5**) (Slika 2.25.).



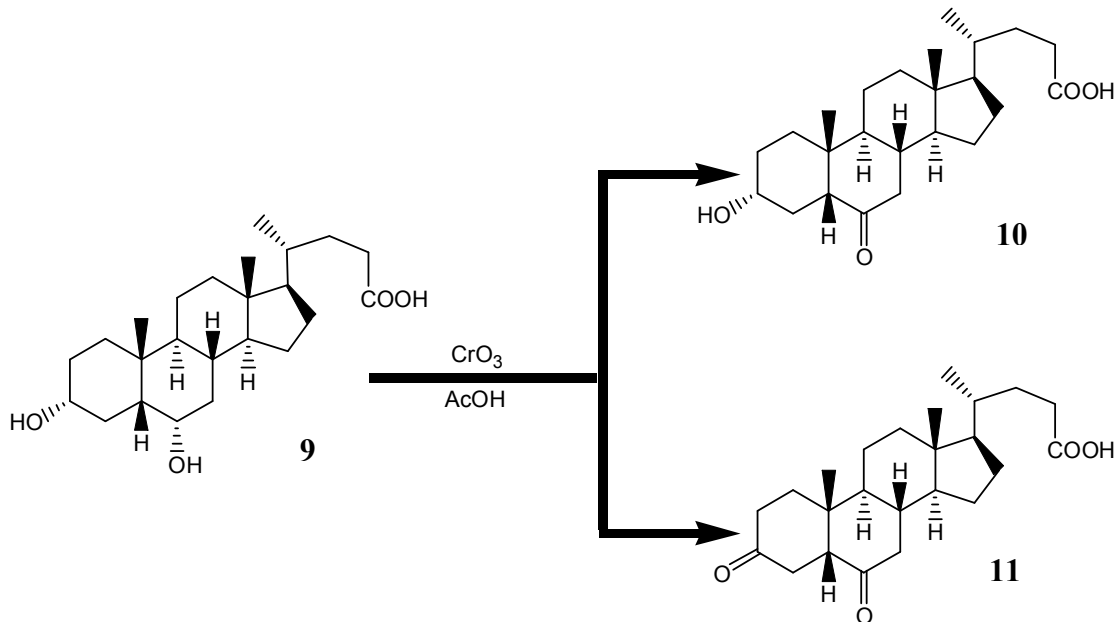
Slika 2.25. Selektivna oksidacija C3 i C7 OH grupe kod metil estra holne kiseline (**3**).

Miljković i saradnici [48] su razradili metodu za selektivnu oksidaciju C12 OH grupe metil estra holne kiseline (**3**) prevođenjem **3** u amid holne kiseline (**6**) koji je potom oksidovan sa ekvivalentnom količinom broma u alkalnom metanolu preko participacije N-bromoamidne funkcije (**7**) iz bočnog niza (Slika 2.26.).



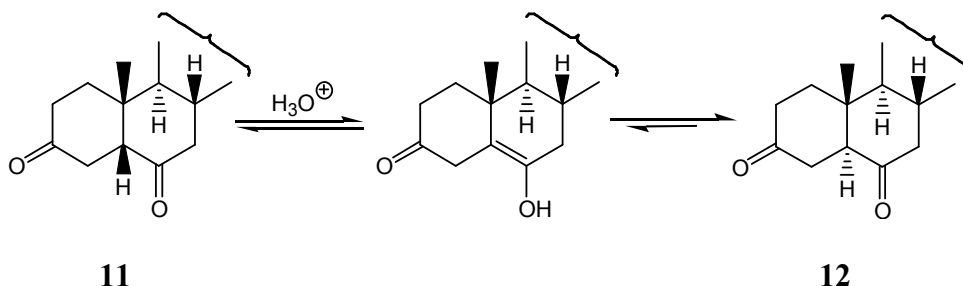
Slika 2.26. Selektivna oksidacija C12 OH grupe kod metil estra holne kiseline (**3**).

Wieland [49] je uspeo da selektivno oksiduje C6 OH grupu hiodeoksiholne kiseline (**9**) pomoću hrom(VI)-oksida. Međutim, kasnije se ispostavilo da dolazi do oksidacije i C3 OH grupe i da izborom pogodnih reakcionih uslova moguće je dobiti 6-monoketohiodeoksiholnu kiselinu (**10**) i 3,6-diketohiodeoksiholnu kiselinu (**11**) u odnosu 7 : 3 (Slika 2.27.).



Slika 2.27. Oksidacija hiodeoksiholne kiseline (**9**).

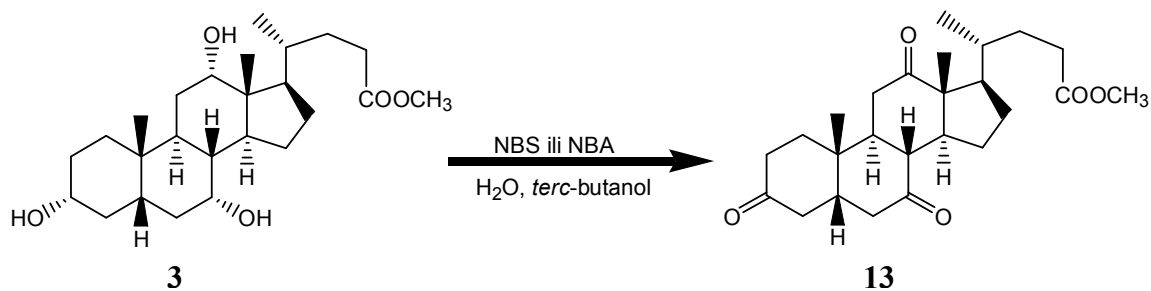
Ukoliko se diketohiodeoksiholna kiselina zagreva u sirćetnoj kiselini uz katalitičke količine hlorovodonične kiseline, onda dolazi do izomerizacije  $5\beta$ -vodonika u  $5\alpha$ -vodonik [50]. Ova transformacija je moguća kod svakog steroidnog jedinjenja koji u položaju C6 ima keto grupu. Izomerizacija se najverovatnije odvija po mehanizmu keto-enolne tautomerije (Slika 2.28.).



Slika 2.28. Izomerizacija 3,6-diketo- $5\beta$ -holanske kiseline (**11**) u 3,6-diketo- $5\alpha$ -holansku kiselinu (**12**).

Fieser i Rajagoplan [51] su u jednom od svojih radova proučavali selektivnu oksidaciju  $7\alpha$ -hidroksilne grupe holne kiseline i pri tome su došli do zaključka da su N-brom-sukcinimid (NBS) i N-brom-acetamid (NBA) najjači oksidacioni agensi u vodenom

terc-butanolu (oksidisu se sve OH grupe) (Slika 2.29.) Isti autori su takođe utvrdili da se oksidacijom sa NBS u vodenom rastvoru natrijum-bikarbonata oksiduje hidroksilna grupa isključivo na C7, dok su hidroksilne grupe na C3 i C12 inertne prema tom oksidacionom sredstvu pri datim reakcionim uslovima. Ovo je potvrđeno i pokušajem oksidacije deoksiholne kiseline sa NBS, međutim deoksiholna kiselina je ostala neizreagovana.



Slika 2.29. Dobijanje metil estra 3,7,12-triketo-5 $\beta$ -holnske kiseline (dehidroholne kiseline, **13**).

### 2.3. POVRŠINSKE OSOBINE ŽUČNIH KISELINA

Poznavanje površinskih osobina žučnih kiselina je od velikog značaja za razumevanje njihovog delovanja na nivou ćelijske membrane, kao i za njihovo vezivanje za makromolekule kao što su peptidi, proteini (transportni proteini), polimolekulski šećeri itd [15-17]. *Chiang* [52] je našao da površinske osobine žučnih kiselina određuju način (stepen) njihovog vezivanja za farneosid X receptor (FXR), koji je ključni nuklearni transkripcijski faktor u sintezi, metabolizmu i transportu žučnih kiselina.

U ispitivanjima mehanizma vezivanja žučnih kiselina za površinu različitih supstrata koristi se metoda *Langmuir*-ove [53] adsorpcije pri konstantnoj temperaturi i pritisku. Kod ove metode žučne kiseline se nanose kao monosloj na površinu supstrata [54,55], pri čemu se postepeno smanjuje površina interakcije, a istovremeno se meri povećanje površinskog pritiska  $\pi$  (kompresiona izoterma, Slika 2.30.).

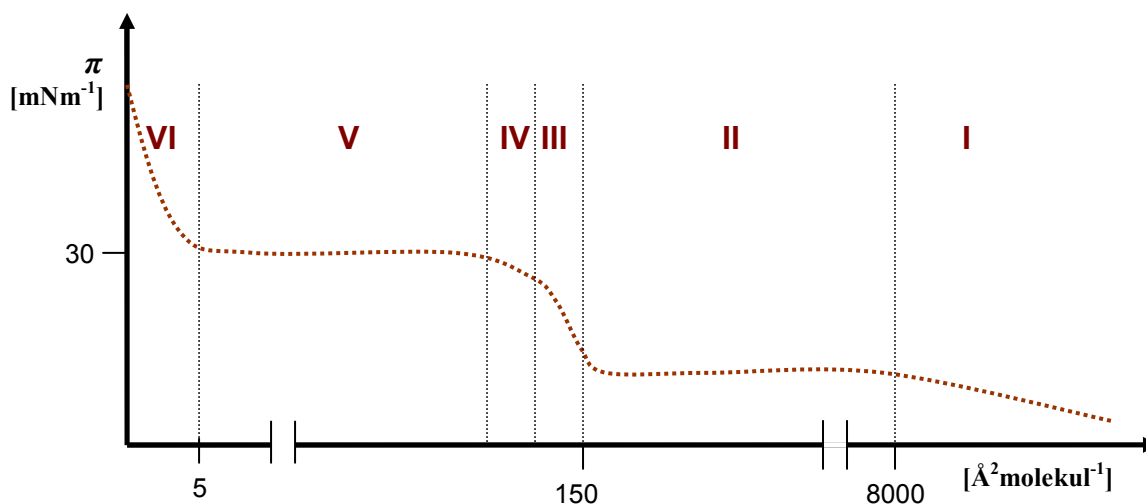
Za tumačenje kompresione izoterme koristi se *Gibsov* zakon fazne ravnoteže:

$$F = C - P \quad p, t = \text{const.} \quad (2.1)$$

gde je  $F$  stepen slobode,  $C$  je broj komponenti u sistemu. *Crisp* je jednačinu (2.1) modifikovao za dvodimenzionalni prostor kao što je to monosloj žučnih kiselina [56]:

$$F = C - P_B - (q - 1) \quad p, t = \text{const.} \quad (2.2)$$

U jednačini (2.2)  $q$  je broj faza u površinskom monosloju žučnih kiselina, dok je  $P_B$  broj makroskopskih faza u sistemu. *Eakwal* i saradnici [57] su detaljno ispitivali kompresionu izotermu za deoksiholnu kiselinu, koja je bila raspoređena (kao monosloj) na površini vode pH 2.



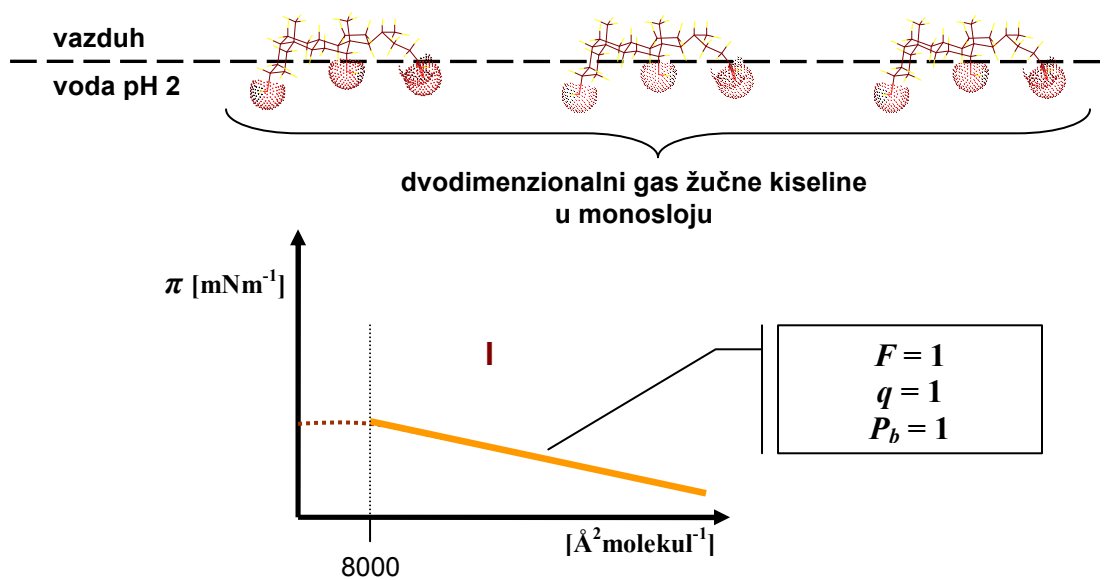
Slika 2.30. Kompresiona izoterma deoksiholne kiseline, na vodenoj površini, pH 2.

*Dervichian* [58] i *Eakwal* [57] su identifikovali šest strukturno različitih delova na kompresionoj izotermi deoksiholne kiseline (Slika 2.30.). *Dervichian* [59] je pomoću



talka i struje vazduha uspeo da odredi agregatno stanje deoksiholne kiseline u monosloju za svaki deo kompresione izoterme.

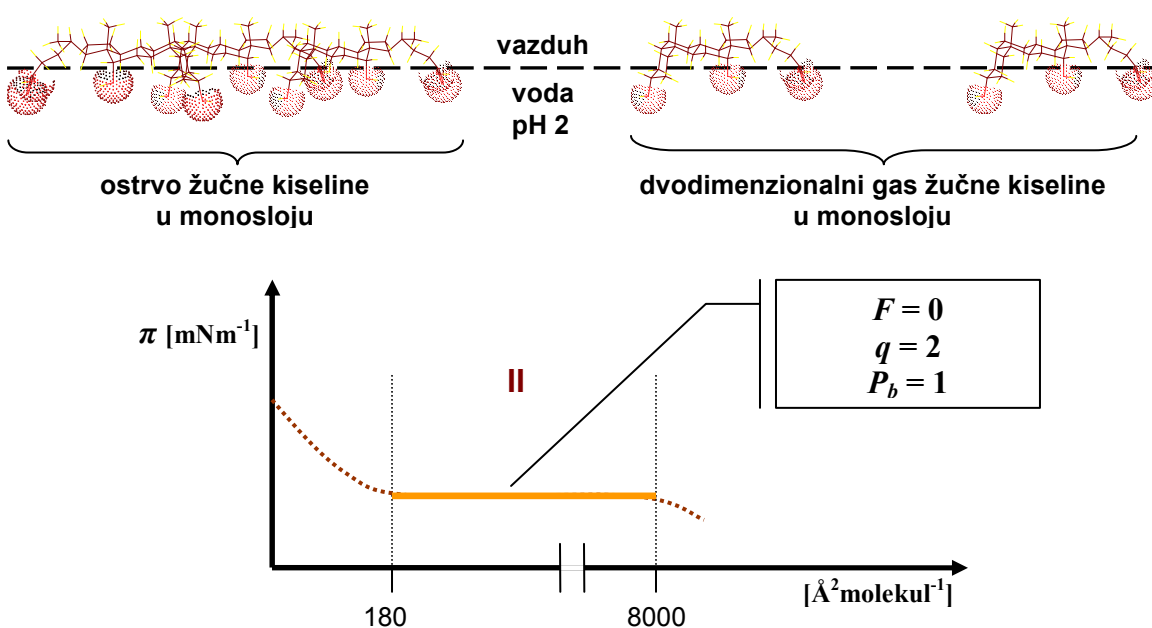
Ukoliko je površina po molekulu veća od  $8000 \text{ \AA}^2$  tada su molekuli deoksiholne kiseline međusobno toliko udaljeni da se ponašaju kao dvodimenzionalni gas (test sa talkom). Naime, kasnije su metodom površinske viskozimetrije *Kaufman* [60] i *Leonard* [61] ustanovili da se zaista, molekuli deoksiholne kiseline kao i henodeoksiholne i holne kiseline pri površini većoj od  $8000 \text{ \AA}^2$  ponašaju kao molekuli gasa (dvodimenzionalni gas). Kako je tada broj površinske faze jedan ( $q = 1$ , dvodimenzionalni gas žučnih kiselina), broj makroskopskih faza takođe je jedan, a to je voda, pH 2 ( $P_b = 1$ ), broj komponenti u sistemu je dva (voda i deoksiholna kiselina,  $C = 2$ ) onda je shodno jednačini (2.2) i vrednost stepena slobode jedan ( $F = 1$ ). Što znači, da postoji samo jedna intenzivna veličina koja se može nezavisno menjati bez promene broja faza. Intenzivna veličina koja se menja je površina po molekulu dok je druga takva veličina površinski pritisak njena funkcija. Ukoliko bi broj stepena slobode bio dva, tada bi se za bilo koju površinu po molekulu moglo nezavisno dodeliti neka vrednost za površinski pritisak, i tada bi umesto krive (Slika 2.30. I deo i Slika 2.31.) koja se dobija eksperimentalno dobijala površina [57,61,62].



Slika 2.31. Deo I kompresione izoterme, molekuli deoksholne kiseline se ponašaju kao dvodimenzionalni gas u monosloju.

Deo kompresione izoterme II je u oblasti između 8000 i 180  $\text{\AA}^2\text{molekul}^{-1}$  i predstavlja pravu liniju (Slika 2.30. II deo), što znači da se površinski pritisak ne menja sa smanjenjem površine. Stoga je za ovu oblast kompresione izoterme broj stepena slobode nula ( $F = 0$ ), što je moguće na osnovu jednačine (2.2) ako je broj površinske faze dva ( $q = 2$ ). Prema *Dervichian*-u jedna od faza u površinskom monosloju je dvodimenzionalni gas deoksiholne kiseline, dok je druga faza dvodimenzionalna tečna faza, koju čine nekoliko molekula deoksiholne kiseline spojenih u monoslojske površinske agregate, koje *Eakwal* naziva površinskim ostrvcima žučne kiseline [57,63] (Slika 2.32.).

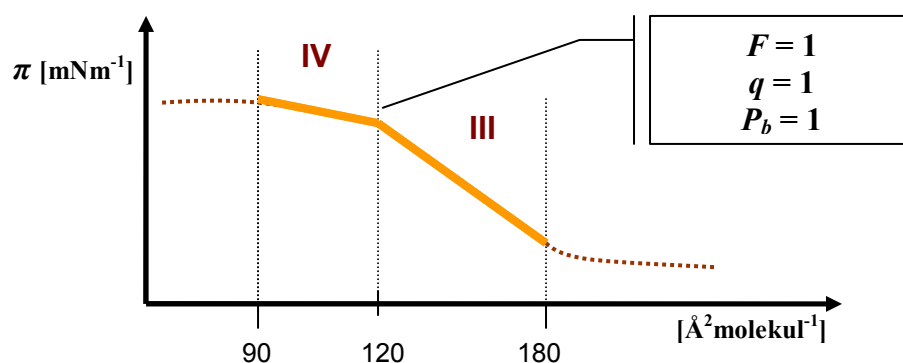
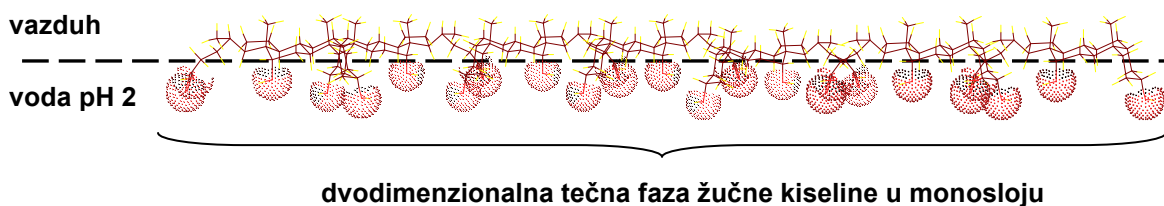
Smanjenjem površine molekuli deoksiholne kiseline u dvodimenzionalnom gasu se međusobno približavaju i prelaze u dvodimenzionalnu tečnost odnosno formiraju ostrva. Ovo je slično sa pojavom kada se jednokomponentni gas izotermiski sabije u cilindru i pri određenoj zapremini se javlja tečna faza pored gasne faze sa kojom je u ravnoteži, i tada je  $F = 0$ . Stoga sve dok su prisutne obe faze intenzivne veličine se ne menjaju, što znači da u toku smanjenja zapremine pritisak ostaje konstantan. Međutim, kako se smanjenjem zapremine povećava koncentracija gasa, a na osnovu  $P = cRT$  trebao bi da raste i pritisak, upravo faznom transformacijom gas se kondenzuje, pa se ne menja njegova koncentracija odnosno pritisak, već se jedino povećava količina tečne faze. Slično je i kod dela II kompresione izoterme deoksiholne kiseline gde se površinski pritisak nemenja, upravo zbog fazne transformacije u monosloju, gde dvodimenzionalni gas prelazi u ostrva žučne kiseline. Tako da sa smanjenjem površine po molekulu u delu II kompresione izoterme dolazi do istovremenog povećanja količine deoksiholne kiseline koja se nalazi u obliku ostrva (dvodimenzionalna tečna faza).



Slika 2.32. Deo II kompresione izoterme, pored dvodimenzionalnog gasa u površinskom monosloju javljaju se ostrva deoksiholne kiseline.

Deo III kompresione izoterme obuhvata opseg površine od 180 do 120  $\text{\AA}^2$  molekul $^{-1}$  (Slika 2.30. i Slika 2.33.). U ovom delu površinski pritisak ponovo raste sa smanjenjem površine, slično kao kod prvog dela izoterme, što sugeriše postojanje jednog stepena slobode, pa prema jednačini (2.2) to znači da je površinski monosloj deoksiholne kiseline ponovo jednofazan ( $q = 1$ ). Dervichian je pomoću talka i struje vazduha ustanovio da se grudvice talka sporije kreću na površini vode u III delu izoterme nego u predhodnim delovima, što znači da je monosloj deoksiholne kiseline postao viskoziji, pa se grudvica talka sporije kreće. Stoga Dervichian [58] i Eakwal [57,63] smatraju da je na 180  $\text{\AA}^2$  molekul $^{-1}$  došlo do potpune fazne transformacije u monosloju i da je dvodimenzionalni gas deoksiholne kiseline prešao u dvodimenzionalnu tečnu fazu (Slika

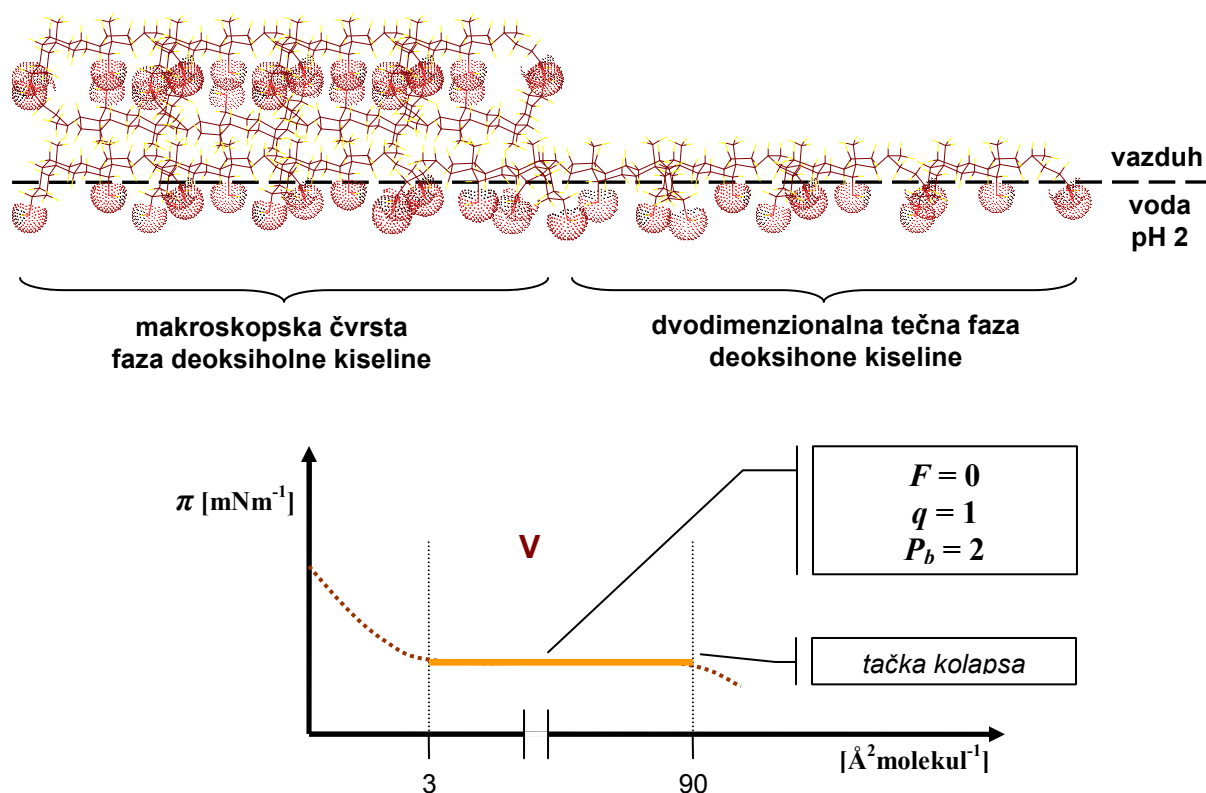
2.33.), što je u kasnijim radovima pomoću površinske viskozimetrije i potvrđeno. U okolini  $120 \text{ \AA}^2 \text{ molekul}^{-1}$  kompresiona izoterma menja nagib što se u literaturi objašnjava sa faznom transformacijom u dvodimenzionalnoj tečnoj fazi monosloja. Naime, menja se način pakovanja molekula deoksiholne kiseline [57,58,63-65].



Slika 2.33. Deo III i IV kompresione izoterme, u monosloju postoji samo jedna faza – tečna faza.

U petom delu kompresione izoterme, koja počinje od  $90 \text{ \AA}^2 \text{ molekul}^{-1}$  (Slika 2.30.), površinski pritisak je ponovo konstantan pored smanjenja površine, što znači da je broj stepena slobode nula ( $F = 0$ ). Pošto je granična površina u potpunosti pokrivena monoslojem deoksiholne kiseline koja se nalazi u obliku dvodimenzionalne tečne faze te *Dervichian* [58] i *Ekwall* [57,63] nisu našli dokaz o postojanju dvodimenzionalne čvrste faze, stoga za  $F = 0$  jednačina (2.2) uslovljava da broj makroskopskih faza bude dva ( $P_b = 2$ ). Na osnovu radova *Gershfelda* [66] i *Reisa* [67] identifikovano je postojanje makroskopske čvrste faze. U literaturi [57,63,66,67] tačkom kolapsa se naziva koordinata površinskog pritiska  $\pi$  i površine po molekulu u kompresionoj izotermi gde iz monosloja počinje izdvajanje makroskopske faze. Za deoksiholnu kiselinu tačka kolapsa je  $90 \text{ \AA}^2 \text{ molekul}^{-1}$  (Slika 2.30. i Slika 2.34.).

U poslednjem VI delu kompresione izoterme pritisak naglo raste, pošto ovde više ne postoji monosloj, već makroskopska čvrsta faza deoksiholne kiseline i tečne vode koja se sabija.

Slika 2.34. Deo **V** kompresione izoterme.

Koordinate tačke kolapsa (površinski pritisak i površina po molekulu) žučnih kiselina (Tabela 2.1.) pružaju informaciju o načinu na koji su oni raspoređeni u monosloju. Od žučnih kiselina holanska kiselina ima najmanju površinu po molekulu u tački kolapsa, što znači da se tečni film (monosloj) holanske kiseline može najviše sabiti do tačke kolapsa odnosno, da molekuli holanske kiseline zauzimaju najmanju površinu na graničnoj fazi. Naime, holanska kiselina od funkcionalnih grupa ima jedino karboksilnu grupu, stoga je molekul u monosloju tako orijentisan da se COOH grupa nalazi u vodi, dok steroidni skelet i bočni niz (hidrofobni deo molekula) je orijentisan ka vazduhu (vertikalna orijentacija). Međutim, ako žučna kiselina ima i OH grupu u svojoj strukturi onda u monosloju zauzima horizontalnu orijentaciju, gde je pored COOH grupe i OH grupa orijentisana ka vodi, što povećava prostor koju žučna kiselina zauzima [57,63].

Tabela 2.1. Površina i površinski pritisak  $\pi$  u tački kolapsa nekih žučnih kiselina

	Holanska k.	Litoholna k.	Henodeoksiholna k.	Holna k.	
Površina [ $\text{Å}^2\text{molekul}^{-1}$ ]	40	81	24	85	105
Površinski pritisak [ $\text{mNm}^{-1}$ ]	20	12.3	16.5	30	14
Agregatno stanje	tečno	tečno	čvrsto	tečno	tečno

Litoholna kiselina se izdvaja od ostalih žučnih kiselina. Naime, jedino ona ima dve tačke kolapsa (Tabela 2.1.). Prva tačka kolapsa se javlja pri površini od  $81 \text{ Å}^2 \text{ molekul}^{-1}$  koja je

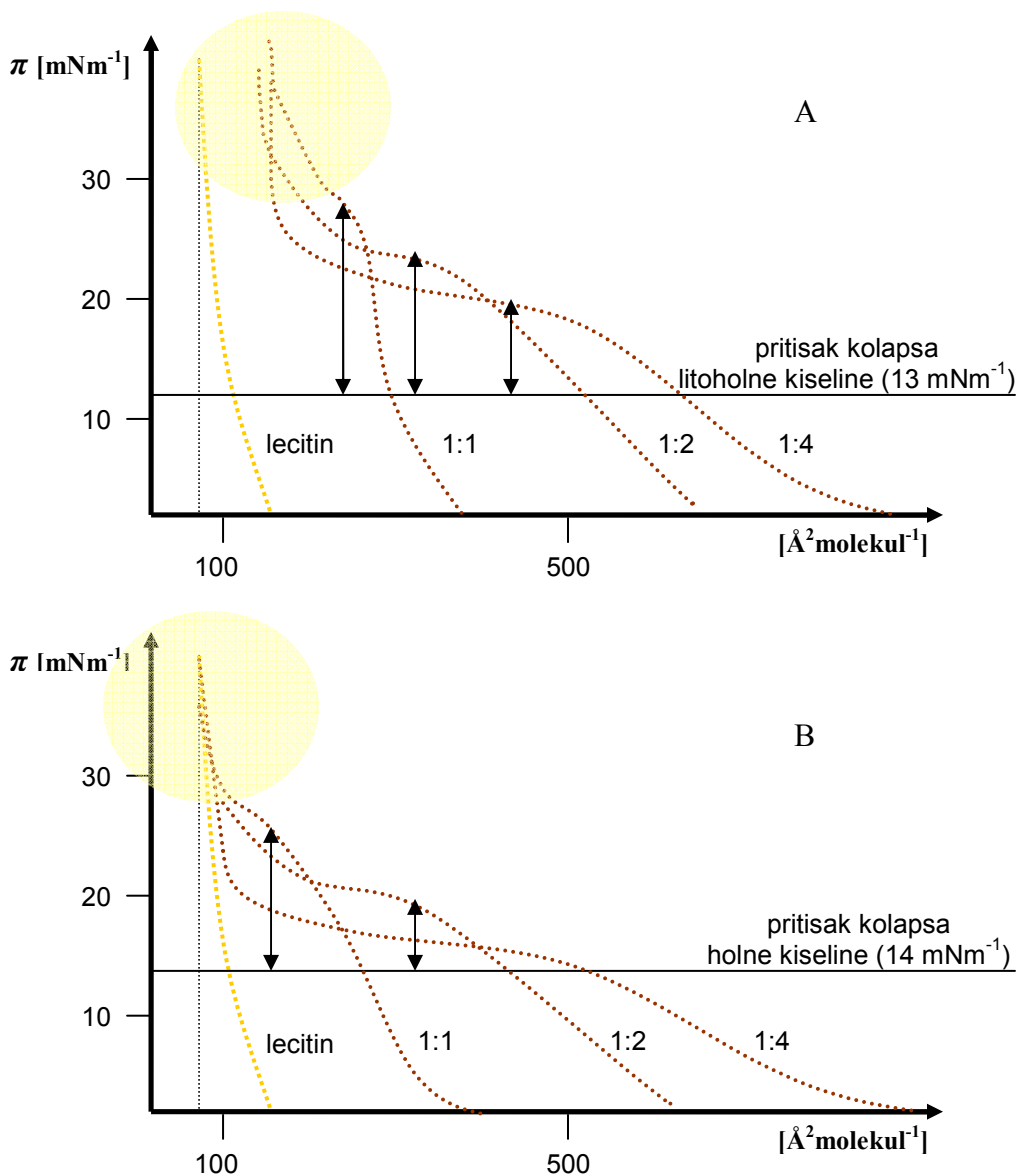
veća od površine kolapsa za holansku kiselinu. Pošto litholna kiselina ima OH grupu na C3 ugljeniku ( $\alpha$  orijentisana) stoga ona ima horizontalnu orijentaciju pa zauzima veću površinu u monosloju. Zbog postojanja i druge tačke kolapsa, prema *Ekwall*-u [68] kod prve tačke kolapsa se još ne stvara makroskopska čvrsta faza litholne kiseline već monosloj tečne faze prelazi u čvrstu fazu trosloja, koja tek posle druge tačke kolapsa ( $24 \text{ \AA}^2 \text{ molekul}^{-1}$ ) prelazi u makroskopsku čvrstu fazu. Kod druge tačke kolapsa površina supstrata (voda, pH 2) u potpunosti je prekrivena troslojem litholne kiseline. Ako se površina po molekulu kod ove tačke kolapsa pomnoži sa tri ( $24 \text{ \AA}^2 \text{ molekul}^{-1} \times 3 = 72 \text{ \AA}^2 \text{ molekul}^{-1}$ ) onda se dobija vrednost površine po molekulu koja približno odgovara površini kod prve tačke kolapsa ( $81 \text{ \AA}^2 \text{ molekul}^{-1}$ ) kada su molekuli litholne kiseline raspoređeni u monosloju (monosloj dvodimenzionalne tečne faze), što ide u prilog teoriji o postojanju trosloja litholne kiseline. *Ekwall* i saradnici [68] su odredili i kompresionu izotermu za litholnu kiselinu kada je ona nanešena na vodu (pH 10 i  $c_{\text{NaCl}} = 3 \text{ mM}$ ). Pri ovim uslovima dobija se jedna tačka kompresije pri površini od  $43 \text{ \AA}^2 \text{ molekul}^{-1}$  slično kao kod holanske kiseline. *Ekwall* [68] smatra da pri pH 10 molekuli litholne kiseline imaju sličnu orijentaciju u monosloju kao molekuli holanske kiseline (vertikalna orijentacija). Naime, u baznoj sredini karboksilna grupa je jonizovana i stoga se bolje rastvara u vodi od hidroksilne grupe, dok velika koncentracija NaCl izoljava OH grupu. Prema tome, hidroksilna grupa se nalazi u vazduhu zajedno sa steroidnim skeletom i hidrofobnim delom bočnog niza, dok je COOH grupa u vodi, dajući vertikalnu orijentaciju litholnoj kiselini. Kriva kompresione izoterme henodeoksiholne kiseline neznatno se razlikuje od kompresione izoterme deoksiholne kiseline. Kod holne kiseline posle tačke kolapsa ( $105 \text{ \AA}^2 \text{ molekul}^{-1}$ ) kompresiona izoterma postepeno raste za razliku od ostalih žučnih kiselina gde se dobija plato. Ovo odstupanje kod holne kiseline u literaturi [57,63,66,67] se objašnjava sa rastvorljivošću makroskopske čvrste faze holne kiseline u vodi koja nastaje nakon tačke kolapsa. Kod di- i trihidroksi derivata holanske kiseline promena pH vrednosti i jonske jačine ne utiče na promenu orijentacije molekula u monosloju (horizontalna), za razliku kod monohidroksi derivata holanske kiseline kod kojih horizontalna orijentacija prelazi u vertikalnu [57,63].

U novije vreme najviše se proučavaju površinske osobine F-supstituisanih žučnih kiselina (supstitucija vodonika u steroidnom jezgru) [69], koje pokazuju sposobnost ka smanjenju FXR (farnesoid X receptor) aktivnosti ili povećanju FXR aktivnosti (u zavisnosti od mesta supstitucije) [71-72].

### 2.3.1. INTERAKCIJE ŽUČNIH KISELINA SA BIOMOLEKULIMA U POVRŠINSKOM MONOSLOJU

Za proučavanje interakcije između različitih molekula u monosloju (mešoviti monosloj) postoje dve metode. Kod prve metode obe ispitivane supstance su nerastvorne u substratu na čiju se površinu nanose. Posle nanošenja molekula na graničnu površinu snima se kompresiona izoterma [73]. Kod druge metode jedna od ispitivanih supstanci se rastvara u substratu, dok je druga nerastvorna i direktno se nanosi na površinu substrata. Kompresiona izoterma se snima nakon određenog vremena koje je potrebno da supstanca iz unutrašnjosti substrata pređe u površinsku fazu (monosloj) [74].

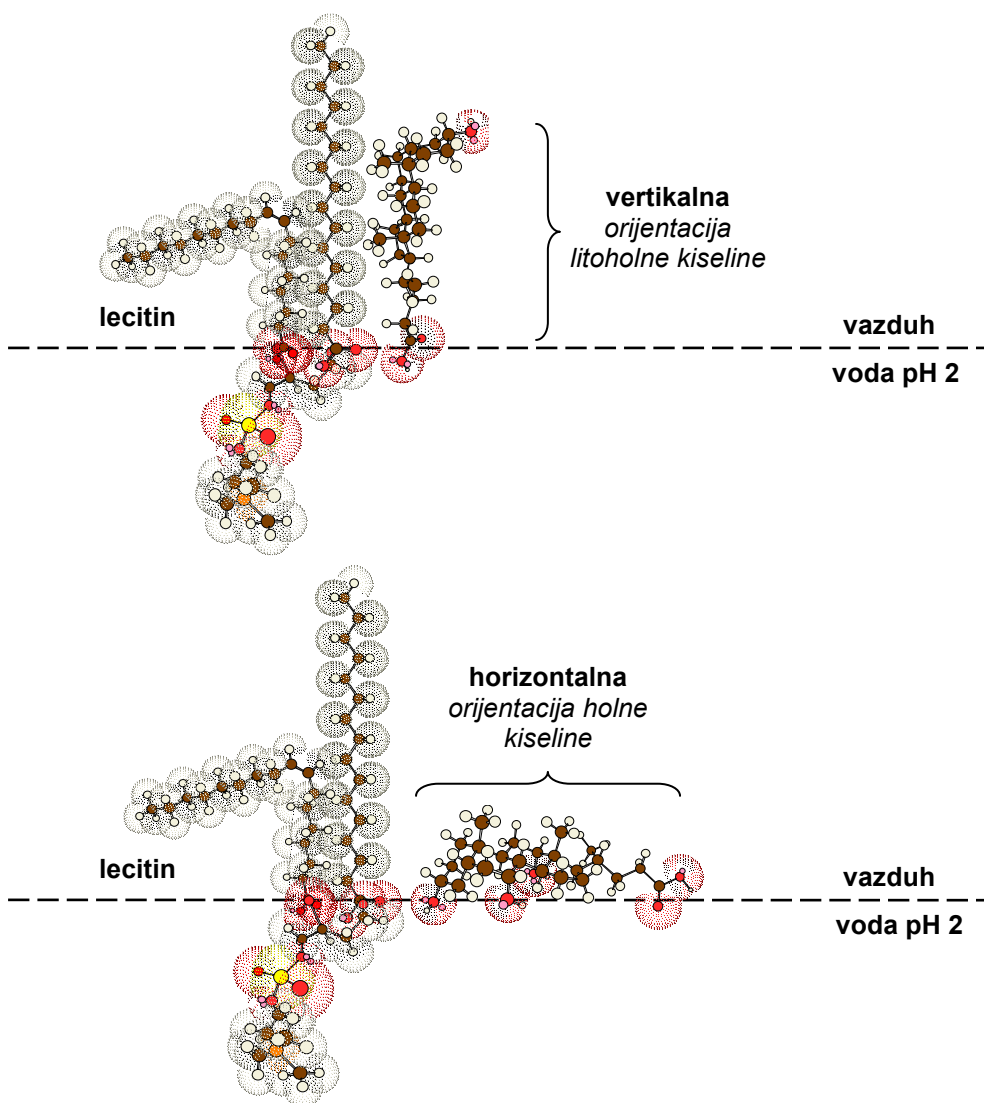
U literaturi se uglavnom nalaze podaci o interakcijama u površinskom monosloju između žučnih kiselina i sledećih molekula: masne kiseline, trigliceridi, fosfolipidi, steroidna jedinjenja [75-78]. Najviše su proučavane interakcije između mono- di- i trihidroksi derivata žučnih kiselina i lecitina [78].



Slika 2.35. Kompresione izoterme, A: smeše lecitina i litoholne kiseline i B: smeše lecitina i holne kiseline, substrat je voda ( $pH\ 2$ ,  $c_{NaCl} = 3\ mM$ ).

Kolapsni pritisak litoholne kiseline je 13 mNm<sup>-1</sup>, dok je njegov kolapsni pritisak u smeši sa lecitinom (lecitin : litoholna kiselina = 1 : 4) 16 mNm<sup>-1</sup> (Slika 2.35. A) [78,79]. Kolapsni pritisak litoholne kiseline u nekoj smeši je površinski pritisak čije delovanje uzrokuje izdvajanje makroskopske faze ove žučne kiseline iz površinskog monosloja. Sa Slike 2.35. A se vidi da u smeši lecitina i litoholne kiseline raste pritisak kolapsa

litoholne kiseline sa povećanjem njihovog odnosa. Ovo znači da lecitin i litoholna kiselina u monosloju stupaju u međusobnu interakciju [78,79]. U suprotnom (bez interakcija) litoholna kiselina bi se i u smeši ponašala kao da je u čistom stanju, to jest kolapsioni pritisak ove žučne kiseline se ne bi menjao. Porast kolapsnog pritiska litoholne kiseline u smeši sa lecitinom ukazuje da je litoholna kiselina stabilizovana, naime sada je podrebnja veća sila da se molekul žučne kiseline istisne iz monosloja u makroskopsku fazu. Što znači, da u monosloju ne postoje posebna ostrva molekula litoholne kiseline i lecitina, već su međusobno pomešani gradeći unutrašnje rastvore-smeše (*intimate miscibility*) [78,79].



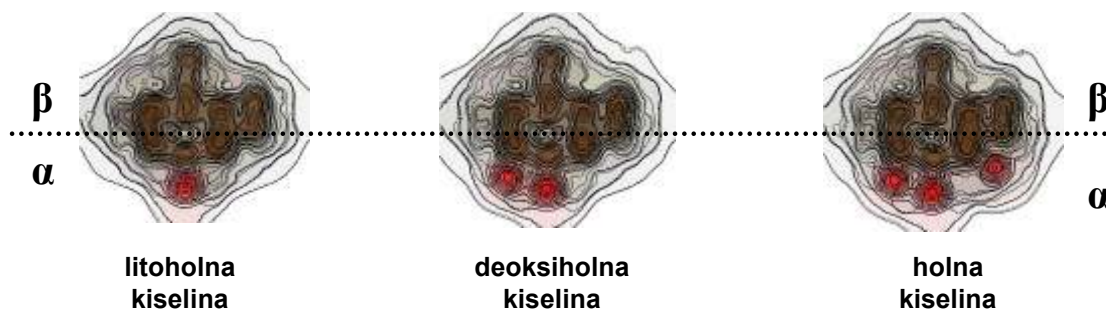
Slika 2.36. Orijehtacija litoholne i holne kiseline sa lecitinom u monosloju.

Prema radu *Dervichian*-a [76] litoholna kiselina u smeši sa lecitinom u monosloju ima vertikalnu orijentaciju (Slika 2.36.). Kompresione izoterme smeše lecitina i litoholne kiseline čak i pri velikim površinskim pritiscima ( $\pi > 30 \text{ mNm}^{-1}$ ) se ne poklapaju sa



kompresionom izotermom čistog lecitina (Slika 2.35. A), što znači da u monosloju čak i pri tim velikim pritiscima postoji litoholna kiselina, što je moguće ako su interakcije jake između litoholne kiseline i lecitina. Jedino od žučnih kiselina litoholna kiselina ostaje u monosloju iznad  $30 \text{ mNm}^{-1}$ . Kompresione izoterme kod ostalih žučnih kiselina pri velikim površinskim pritiscima se poklapaju sa izotermom čistog lecitina.

Kod smeše holne kiseline i lecitina kolapsni pritisak holne kiseline se ne menja sve do odnosa holne kiseline i lecitina 3 : 1. Iznad ovog odnosa kolapsni pritisak holne kiseline raste sa povećanjem količine lecitina (Slika 2.35. B), što znači da holna kiselina za razliku od litoholne kiseline ne stupa sa lecitinom u interakciju u svakom odnosu. Sa Slike 2.35. B se vidi da pri velikim površinskim pritiscima kompresione izoterme smeše lecitina i holne kiseline se poklapaju sa izotermom čistog lecitina, što znači da pri velikim pritiscima u monosloju više nema holne kiseline odnosno, da su interakcije između holne kiseline i lecitina slabe, pa veliki pritisak istiskuje molekule holne kiseline iz monosloja u makroskopsku fazu. U literaturi slabija interakcija holne kiseline sa lecitinom u odnosu na litoholnu kiselinu se objašnjava sa različitom orijentacijom molekula holne kiseline koja je prema *Ekwall*-u [78] horizontalna (Slika 2.36.).



Slika 2.37. Predstavljanje hidrofobno-hidrofilnih osobina žučnih kiselina konturama lipofilnog polja poprečnim presekom molekula (crvena boja - hidrofilni deo; plava i braon boja - hidrofobni deo molekula).

U smeši sa lecitinom deoksiholna kiselina se slično ponaša kao i litoholna kiselina, sa tom razlikom da kompresione izoterme smeše pri velikim površinskim pritiscima se poklapaju sa izotermom lecitina. Prema literaturi [78,79] deoksiholna kiselina kada se nalazi sa lecitinom ima vertikalnu orijentaciju u monosloju. Različitu orijentaciju holne kiseline (horizontalna orijentacija) u odnosu na litoholnu i deoksiholnu kiselinu *Kaufman* [60] objašnjava povećanjem hidrofилnosti holne kiseline. Naime, kod holne kiseline skoro cela  $\alpha$  strana steroidnog skeleta je hidrofilna (Slika 2.37), međutim kako se kompresiona izoterma lecitina i ispitivane žučne kiseline snima na površini vodenog rastvora NaCl, čija je koncentracija 2 mM, to NaCl nema dovoljno moći da dehidratira  $\alpha$  stranu steroidnog skeleta holne kiseline, stoga ova žučna kiselina na površini vodenog rastvora ima horizontalnu orijentaciju. Litoholna i deoksiholna kiselina imaju manje hidrofilnu  $\alpha$  stranu (Slika 2.37.), zato NaCl izoljava njihove OH grupe, pa će na površini vodenog rastvora imati vertikalnu orijentaciju što dovodi i do jačih njihovih interakcija sa ostacima masnih kiselina iz lecitina.



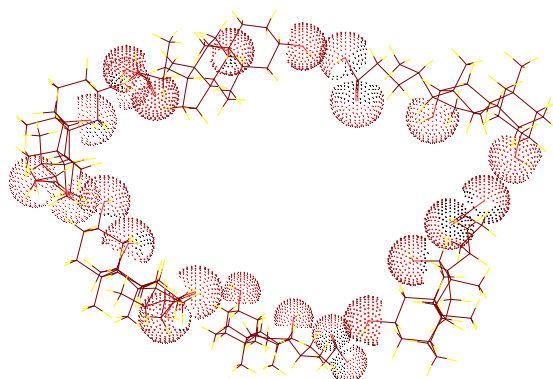
## 2.4. ZNAČAJ VODONIČNE VEZE U SAMOASOCIJACIJI ŽUČNIH KISELINA: HELIKALNI MODEL I REVERSNE MICELE

*Oakenfull i Fisher* [80-82] su na osnovu merenja provodljivosti natrijum-holata i natrijum-deoksiholata postavili model u kome primarne micide žučnih kiselina nastaju građenjem vodoničnih veza između OH grupa. Prema ovim istraživanjima sekundarne micide se formiraju spajanjem  $\beta$  strana steroidnog skeleta žučnih kiselina iz primarnih micela (hidrofobne interakcije). Ovaj model je u potpunosti suprotan od najviše prihvaćenog *Small*-ovog [83-86] modela u kome primarne micide nastaju pomoću hidrofobnih interakcija  $\beta$  strana steroidnog skeleta. *Small* je u svojim istraživanjima zaključio da hidrofobne interakcije ugljovodonika i soli žučne kiseline zavise od broja hidroksidnih grupa, a ne od njihovog položaja u steroidnom jezgru. *Poša* i saradnici [11] su potvrdili *Small*-ov model agregacije određivanjem kritične micelarne koncentracije (CMC) keto derivata holne kiseline. Oni su zaključili da vrednost CMC mono- i diketo derivata holne kiseline ne zavisi od položaja keto grupe, odnosno preostale OH grupe, već isključivo od broja keto grupa. Međutim, *Oakenfull i Fisher* [87,88] su na dihidroksi derivatima holanske kiseline potvrdili značaj vodonične veze u nastajanju primarnih micela. Naime, oni su zapazili da natrijum-hiodeoksiholat i natrijum-ursodeoksiholat imaju slabiju tendenciju građenja micela od natrijum-deoksiholata, što se *Small*-ovim modelom ne može objasniti, dok njihov model različito ponašanje dihidroksi derivata holanske kiseline objašnjava većom stabilnošću primarnih micela (agregati sa vodoničnim vezama). Naime, hiodeoksiholna kiselina i ursodeoksiholna kiselina mogu da grade dve vrste primarnih micela sa vodoničnim vezama, prvu sa otvorenom strukturom i drugu sa zatvorenom strukturom. Kod micela sa zatvorenom strukturom karboksilatne grupe jonizovanih žučnih kiselina su međusobno udaljene 0.7 nm što dovodi do stvaranja repulzivnih sila pa su micide destabilizovane. Karboksilatne grupe kod micela otvorene strukture su međusobno dovoljno udaljene, ali veliki deo hidrofobne površine žučne kiseline je u kontaktu sa vodom, što onda sa aspekta entropije destabilizuje micelu (agregat). Deoksiholna kiselina gradi micide gde su jonizovane karboksilne grupe maksimalno razdvojene, a hidrofobna površina manje izložena vodi. Prema tome natrijum-deoksiholat na osnovu *Oakenfull i Fisher*-ovog modela gradi stabilnije micide od natrijumove soli hiodeoksiholne i ursodeoksiholne kiseline. Kasnije *Vadrene* i saradnici [89] su na osnovu merenja promene molalne zapremine žučnih kiselina u potpunosti odbacili *Oakenfull i Fisher*-ov model asocijacije preko vodoničnih veza, već su preferirali micide žučnih kiselina koje nastaju hidrofobnim interakcijama (*Small*-ov model).

Značaj *Oakenfull-Fisher* modela je u tome što su oni svoja merenja provodljivosti izvodili u vodenom rastvoru etanola dok ostali istraživači u vodi, pa model primarnih micela žučnih kiselina sa vodoničnim vezama nagoveštava postojanje reversnih micela u hidrofobnoj sredini, a to je od suštinskog značaja za promotorno delovanje žučnih kiselina na transport polarnih lekova kroz lipofilnu barijeru.

Za bolje razumevanje reversnih micela žučnih kiselina je bilo i pronalaženje helikalnog agregata natrijum-deoksiholata u eksperimentima *Conte-a* i saradnika [90] (difrakcija X-zraka,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR merenja). Unutrašnjost helikalnog agregata je hidrofilna i popunjena katjonima i molekulima vode. Heliks je stabilizovan vodoničnim

vezama između molekula vode i OH grupa soli žučnih kiselina koje su orijentisane ka unutrašnjosti heliksa. Joni deoksiholata su međusobno povezani vodoničnim vezama između OH grupe sa C3 jedne i COO<sup>-</sup> grupe sa druge žučne kiseline. Spoljašnji deo heliksa deoksiholne kiseline je hidrofoban (Slika 2.38.), što omogućuje njegovu ugradnju u ćelijsku membranu. *Esposito* i saradnici [91,92] su ispitivali agregaciju natrijum-deoksiholata metodom rasejanja X-zraka pod malim uglom kao i spinskom probom, i potvrdili su *Conte*-ove helikse.



Slika 2.38. *Conte*-ov helikalni model agregata Na-deoksiholata.

Prema *Langevinu* [93,94] i *Pileniu* [95] da bi došlo do formiranja reversne micelle (hidrofobna spoljašnjost i hidrofilna unutrašnjost) u organskoj fazi pored amfifilnog molekula neophodno je i prisustvo vode, koja ulazi u hidrofilnu unutrašnjost agregata i stabilizuje sistem. Ukoliko je odnos koncentracije amfifilnog molekula  $[A]$  i koncentracije vode  $[H_2O]$  ( $[A]/[H_2O]$ ) u organskoj fazi manji od 15 tada dolazi do formiranja reversne micelle, dok ako je ovaj odnos veći od 15 tada nastaje mikroemulzija.

*Carey* i saradnici [13] ispitivali su promotorni uticaj natrijumove soli žučnih kiselina na transport insulina kroz nazalnu membranu. Pokazalo se da promotorno delovanje žučnih kiselina raste sa njihovom hidrofobnošću. Naročiti efekat na absorpciju insulina je imala natrijumova so deoksiholne kiseline. Prema *Carey*-u deoksiholna kiselina gradi u nazalnoj membrani ili reversne micelle tipa *Oakenfull-Fisher* ili se formira kanal sa polarnom sredinom kroz koji prolazi monomer insulina. Naime, struktura kanala bi bila analogna *Conte*-ovom helikalnom modelu. Kasnije *Bowe* i saradnici [14] su sintetizovali glikozilovane derivate holne kiseline i postavili su suprotnu teoriju prema kojoj promotorno delovanje žučnih kiselina na transport polarnih lekova (insulin, vancomicin, kalcitonin) kroz ćelijsku membranu zavisi od njihove hidofilnosti. Iako su glikozilovani derivati imali manji efekat od deoksiholne kiseline, oni su zato imali znatno manju toksičnost.

## 2.4.1. TRANSPORT POLARNIH MOLEKULA POMOĆU REVERSNIH MICELA

Uticaj reversnih micela na transport leka se može posmatrati na dva načina:

- kada postoje kanali (kao helikalni model deoksihione kiseline) koji predstavljaju valjkasti model reversne micidele i
- kada postoje reversne micidele tipa *Oakenfull-Fisher* gde je jezgro micidele ispunjeno vodom (jezgro sa vodom) u kome se smešta polarni molekul (lek) koji se transportuju kroz micelu.

### 2.4.1.1. Reversne micidele kao kanali u ćelijskoj membrani

Uopšteno transport polarnog molekula kroz ćelijsku membranu opisuje *Fick*-ova [96-99] jednačina (2.3):

$$J = -\frac{kT}{6\pi\eta r} \exp\left[\frac{\mu_v^{\circ} - \mu_m^{\circ}}{RT}\right] \frac{1}{d} (c_{ve} - c_{vi}) \quad (2.3)$$

U jednačini (2.3)  $J$  predstavlja fluks molekula kroz membranu,  $k$  je *Boltzman*-ova konstanta,  $T$  predstavlja temperaturu,  $\eta$  je koeficijent viskoznosti, a  $r$  je prečnik molekula koji se transportuje,  $d$  predstavlja širinu membrane dok su  $c_{ve}$  i  $c_{vi}$  koncentracije molekula (leka) u ekstracelularnoj i intracelularnoj tečnosti (koncentracije molekula se odnose neposredno na prostor ispred membrane). Jednačina (2.3) u sebi sadrži izraz  $\exp[(\mu_v^{\circ} - \mu_m^{\circ})/RT]$  koji predstavlja *Nerst*-ov zakon raspodele<sup>1</sup>, i predstavlja matematičku formulaciju barijere u transportu polarnog leka kroz membranu [100-104].

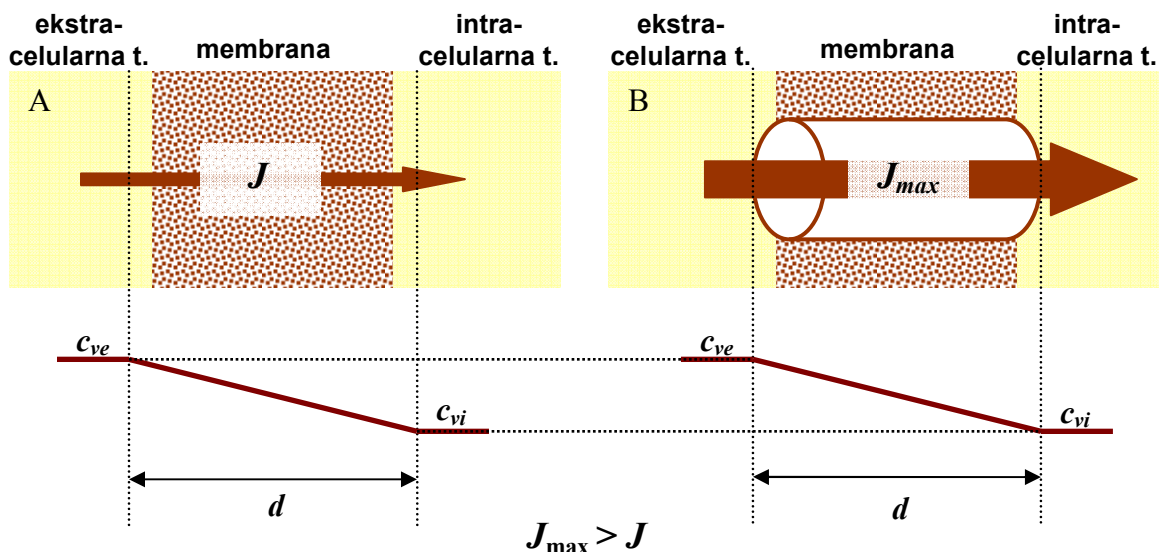
Kada se u ćelijskoj membrani formiraju kanali-reversne micidele koji su ispunjeni vodom, membrana više ne predstavlja barijeru u transportu polarnog molekula, tako da sada fluks molekula opisuje jednačina (2.4):

$$J_{\max} = -\frac{kT}{6\pi\eta r} \frac{1}{d} (c_{ve} - c_{vi}) \quad (2.4)$$

Pošto fluks polarnih molekula zavisi od broja kanala u ćelijskoj membrani, a broj kanala zavisi od koncentracije graditelja (žučne kiseline),  $J_{\max}$  predstavlja fluks polarnog molekula (leka) pri najvećoj mogućoj koncentraciji amfifila, a da se pri tome ne formira mikroemulzija sa lipidima membrane [96]. Ukoliko se uporede jednačine (2.3) i (2.4) tada se uočava odsustvo koeficijenta raspodele u izrazu (2.4) odnosno odsustvo barijere. Zato se u idealnom slučaju transport polarnog molekula (leka) u prisustvu reversne micidele-kanala opisuje kao difuzija kroz vodu (ako je kanal dovoljno širok pa se mogu zanemariti interakcije između molekula koji se transportuje i graditelja kanala). Slika 2.39. pokazuje povećanje fluksa polarnog molekula kroz membranu u prisustvu kanala-

<sup>1</sup> U izrazu  $\exp[(\mu_v^{\circ} - \mu_m^{\circ})/RT]$ ,  $\mu_v^{\circ} - \mu_m^{\circ}$  predstavlja razliku hemijskog potencijala molekula koji se transportuje u vodenoj fazi i hemijskog potencijala u lipidnoj fazi membrane.

reversne micelle u odnosu kada membrana predstavlja barijeru pri istom gradijentu koncentracije.

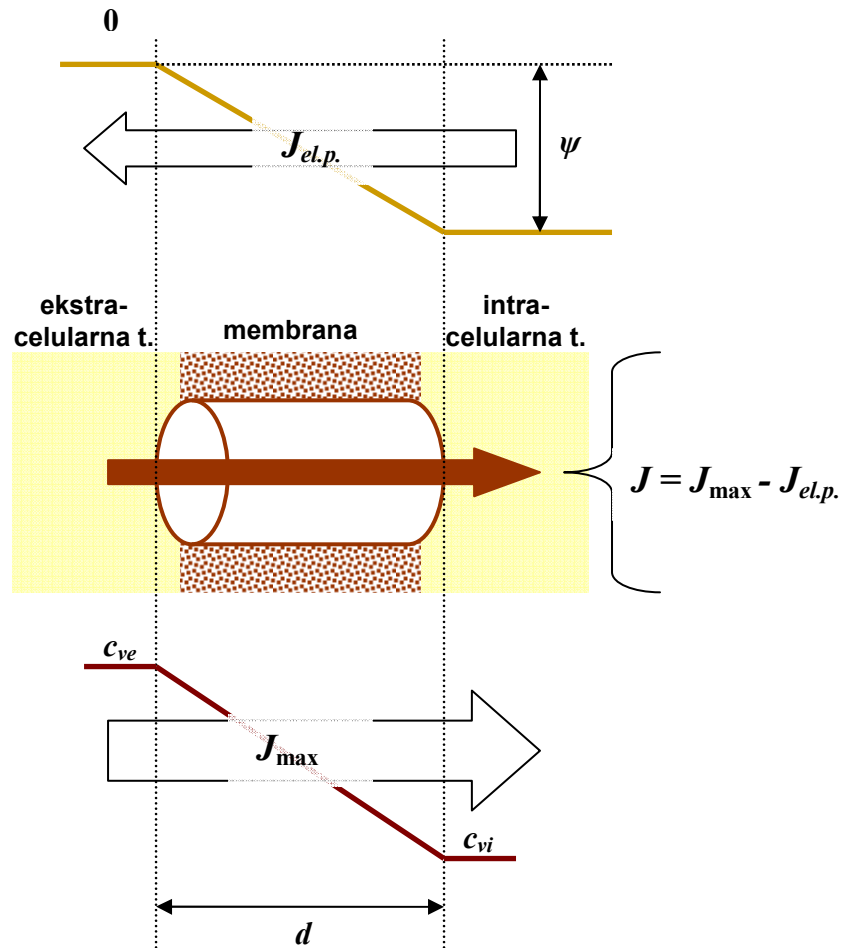


Slika 2.39. Povećanje fluksa polarnog molekula kroz ćelijsku membranu u prisustvu reversne micelle-kanala. A: Transport polarnog molekula kroz ćelijsku membranu bez olakšane difuzije. B: Transport polarnog molekula kroz kanal (olakšana difuzija) pri istom gradijentu koncentracije.

Međutim, ukoliko molekula (lek) koji učestvuje u transportnom procesu kroz membranu ima i naelektrisanje, onda membranski potencijal može da predstavlja takođe barijeru pored hidrofobnog dela membrane [96,100-102]. Reversne micelle-kanali mogu da eliminišu ili da smanje barijeru koja potiče od hidrofobnosti membrane ali nemaju efekta na barijeru koja može da predstavlja membranski potencijal. Ukoliko je posmatrani lek anjon, tada u prisustvu reversne micelle-kanala na anjon deluje termodinamička sila  $RT(d\ln c/dx)$  [96,105,106] koja je usmerena ka intracelularnom prostoru i koja teži da prebaci lek u unutrašnji prostor. Na Slici 2.40. ovaj vid transporta je označen sa  $J_{max}$ . Međutim, kako je lek anjon sa naelektrisanjem  $z$ , tada na njega deluje i odbojna sila elektrostatičnog polja kao posledica postojanja transmembranskog potencijala  $\psi$   $zF(d\psi/dx)$  pošto je  $\psi$  negativan<sup>2</sup>. Zapravo negativni membranski potencijal uzrokuje transport anjonskog molekula iz intracelularnog u ekstracelularni prostor i ovaj vid transporta okarakterisan je sa fluksom  $J_{el.p.}$  (Slika 2.40.). Sve dok je termodinamička sila veća od elektrostatičke odbojne sile, dotle postoji neto transport leka kroz kanal-reversnu micelu okarakterisan fluksom  $J$  (Slika 2.40.). Kako raste koncentracija anjona (leka) u intracelularnom prostoru tako se smanjuje termodinamička sila. U jednom trenutku dolazi do izjednačavanja ove dve sile suprotnog smera  $zF(d\psi_m/dx) = -RT(d\ln c/dx)$ , odnosno  $zFd\psi_m = -RTd\ln c$  i tada je neto fluks anjon-leka kroz kanal-reversnu micelu jednaka nuli,  $J = 0$ . U ovom slučaju negativni membranski potencijal predstavlja za anjon-lek barijeru na koju reversne micelle ne utiču, što znači da je fluks  $J$

<sup>2</sup>  $F$  predstavlja Faradey-ovu konstantu, čija je vrednost:  $96500 \text{ Cmol}^{-1}$ .

smanjen ka intracelularnoj tečnosti u odnosu na polarni lek bez naboja, slične veličine i istog koncentracionog gradijenta.

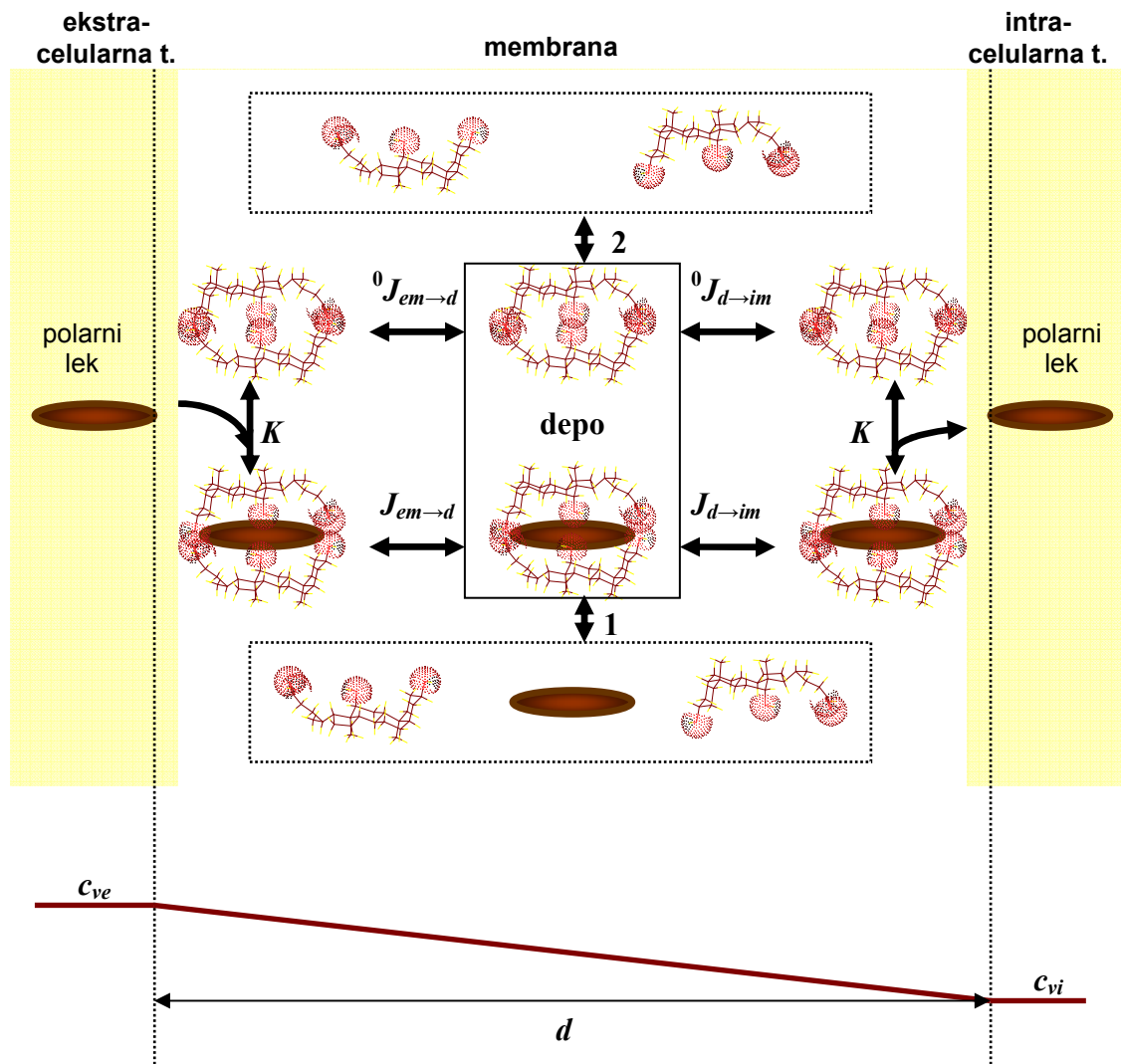


Slika 2.40. Membranski potencijal  $\psi$  predstavlja barijeru u transportu anjon leka kroz ćelijsku membranu.

Međutim, ukoliko je posmatrani lek katjon dati membranski potencijal ne predstavlja barijeru u njegovom transportu već sila  $zF(d\psi/dx)$  deluje u istom smeru sa termodinamičkom silom.

### 2.4.1.2. Uloga reversne micelle tipa *Oakenfull-Fisher* u transportu leka kroz ćelijsku membranu

U ovom slučaju reversne micelle žučnih kiseline formiraju agregate sa polarnim jezgrom koje je ispunjeno vodom. U jezgro ispunjena vodom ulazi polarni molekul koji se transportuje kroz membranu. Međutim, ovaj vid transporta je složeniji i manje efikasniji od transporta pomoću reversne micelle- kanala [107].



Slika 2.41. *Oakenfull-Fisher*-ove reversne micelle deoksiholne kiseline u transportu polarnog leka kroz membranu.

Neto fluks polarnog leka kroz ćelijsku membranu pomoću reversne micelle *Oakenfull-Fisher*-ovog tipa zavisi od koncentracione razlike leka u vodenoj fazi neposredno pred membranom ( $c_{ve} - c_{vi}$ ), kao i kod jednačine (2.3) [108]. Dalje neto fluks zavisi:

- od konstante ravnoteže  $K$  građenja kompleksa polarnog leka i reversne micelle (Slika 2.41.) [106,109]

- od brzine transporta (fluksa) nastalog kompleksa do depoa kompleksa u membrani, odnosno od brzine transporta  $J_{d \rightarrow im}$  kompleksa od depoa do površine membrane sa intracelularne strane. Fluks kompleksa u membrani određen je njegovom viskoznošću, veličinom i oblikom [106,110,111]
- od razgradnje kompleksa u membrani, reakcioni put **1** Slika 2.41. [106]
- od konstante disocijacije kompleksa na intracelularnoj strani, međutim kako je konstanta ravnoteže formiranja kompleksa leka i reversne micide velika, to se lek relativno slabo oslobađa na intracelularnoj strani membrane, pa kompleks ostaje u membrani formirajući depo[106]
- prazna reversna micela sa intracelularne strane se vraća u depo reversne micide sa fluksom  ${}^0J_{d \rightarrow im}$ , a iz depoa na graničnu površinu membrane sa ekstracelularne strane fluksom  ${}^0J_{em \rightarrow d}$  gde preuzima nov lek, stoga neto fluks leka kroz membranu zavisi i od dopremanja prazne reversne micide na graničnu površinu sa ekstracelularne tečnosti. Naime, ako na graničnoj površini ima više praznih reversnih micela to je veća verovatnoća nastajanja kompleksa sa lekom [106]
- od razgradnje reversne micide (reakcioni put **2**, Slika 2.41.), što zavisi od količine vode u membrani, naime voda stabilizuje unutrašnjost prazne reversne micide [106].

Kod ovog modela najčešće je (neto fluks) ukupan transport polarnog molekula leka smanjen u odnosu na transport bez žučnih kiselina. Međutim, kako *Oakenfull-Fisher*-ove micide zadržavaju lek u membrani, one time produžavaju delovanje leka i postepeno otpuštaju lek u intracelularni prostor ili se postepeno kompleks iz depoa razgrađuje i lek u membrani može da se veže za transmembranske kanale, receptore itd. *Poša* i saradnici [11] su našli da holna kiselina i monoketo derivati holne kiseline produžuju analgetički efekat lidokaina, što se može objasniti stvaranjem depoa reversne micide i lidokaina koji se postepeno razgrađuje u membrani predstavljajući izvor lidokaina koji se vezuje za potencijal zavisni Na-kanal (hidrofobna teorija [112,113]).

U zavisnosti od strukture žučne kiseline prepostavlja se da su istovremeno u membrani prisutne i reversne micide *Oakenfull-Fisher*-ovog tipa kao i kanali žučnih kiselina.

## 2.5. METODA GLAVNIH KOMPONENTI U MEDICINSKOJ HEMIJI I BIOHEMIJI

Metoda glavnih komponenti (*principal component analysis, PCA*) pripada osnovnim metodama koje se koriste u *QSARs*<sup>3</sup> istraživanjima [114,115]. Ova metoda je matematički postupak čiji je glavni cilj da se smanji broj varijabila (osobine posmatranih objekta) tj. da se smanji veličina matrice podataka  $\mathbf{X}$  [116]. Na Slici 2.42. predstavljena je matrica podataka  $\mathbf{X}$ . U hemometriji medicinske hemije (hemija lekova) [117] je uobičajeno da vrste matrice predstavljaju objekte to jest posmatrane molekule, gde je  $N$  broj molekula koji se kreće i do 100. Kolone matrice  $\mathbf{X}$  predstavljaju osobine to jest varijabile posmatranih molekula (molekulski deskriptori (topološki), termodinamički parametri, afinitet vezivanja, inhibicija, farmakološko delovanje, farmakokinetički parametri itd).  $M$  je broj posmatranih varijabila koji može da bude od 50-100 pa čak i više. Kod ispitivanja lekova cilj je da se posmatrani molekuli grupišu po sličnosti  $M$  varijabile (osobine) i da grupe budu grafički prikazane. Grupisanje je moguće u dvodimenzionalnom prostoru (posmatraju se dve osobine) ili trodimenzionalnom prostoru (posmatraju se tri osobine), tako da se pomoću metode glavnih komponenti dobijaju vektori glavnih komponenti  $\mathbf{gk}$  čiji je broj manji od posmatranih varijabila, a pri tome oni objašnjavaju ukupnu varijaciju podataka u matrici  $\mathbf{X}$ . Najčešće je dovoljno koristiti dva ili tri vektora  $\mathbf{gk}$  što je dovoljno za grafičko prikazivanje podataka [10,118].

		kolone		
		1	...	M
vrste	1	$x_{11}$	...	$x_{1M}$
	2	$x_{21}$	...	$x_{2M}$
	3	$x_{31}$	...	$x_{3M}$
	4	$x_{41}$	...	$x_{4M}$
	...	...	...	...
	i	$x_{i1}$	...	$x_{iM}$
N	$x_{N1}$	...	$x_{NM}$	

Slika 2.42. Matrica podataka  $\mathbf{X}$ ,  $x_{31}$  predstavlja vrednost 1 varijabile (osobine) za treći molekul.

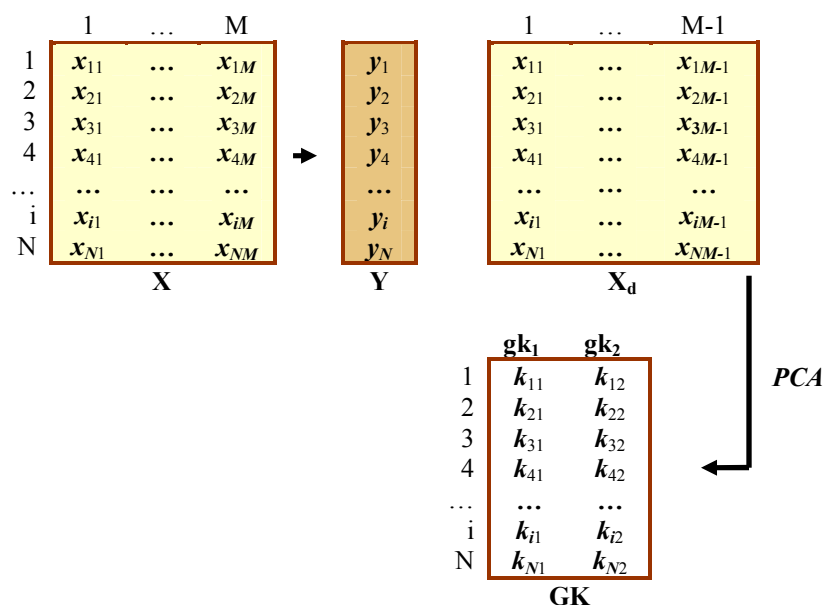
Druga primena metode glavnih komponenti u medicinskoj hemiji je u postavljanju modela delovanja leka, gde je cilj dobijanje zavisnosti između biološke, farmakološke, biohemijske aktivnosti ili izmerenih biofizičko-hemijskih veličina od varijabila koje se dobijaju pomoću računara (*in silico*) [119-121] kao što su:

- topološki deskriptori (veličina i oblik molekula, način vezivanja atoma u molekulu-konektivnost itid)
- raspodela elektrona (funkcije gustine elektrona, dipolni momenat itd).
- amfifilnost, hidrofobnost, hidrofilnost ( $\log P$ ,  $Clog P$ ,  $HLB$  itd.)
- termodinamički parametri

<sup>3</sup> *QSARs* (*quantitative structure-activity relationships*) - kvantitativni odnosi strukture i biološke aktivnosti.



Pod modelom u medicinskoj hemiji se uglavnom podrazumeva višestruka regresiona jednačina [122]. *Krzanowski* [123] je ukazao na dobijanje efikasnijeg modela ukoliko se kod postavljanja regresione jednačine umesto velikog broja varijabila (*in silico* deskriptora) koriste nekoliko vektora glavnih komponenti  $\mathbf{gk}$  koji opisuju veći deo varijacije, uglavnom 90% varijacije. Međutim, vrednosti ove granice [118] nisu ujednačene, pošto neki istraživači koriste i do 80% varijacije *in silico* deskriptora. U ovom slučaju matrica podataka  $\mathbf{X}$  se razdvaja na vektor kolonu  $\mathbf{Y}$  koja predstavlja eksperimentalne podatke (biološka, farmakološka i biohemijska aktivnost) i na matricu *in silico* deskriptora  $\mathbf{X}_d$  (Slika 2.43.).



Slika 2.43. Livingstone-ov način primene metode glavnih komponenti (PCA).

Tada se na *in silico* deskriptore iz matrice  $\mathbf{X}_d$  primenjuje metoda glavnih komponenti pri čemu se dobije matrica  $\mathbf{GK}$  sa vrednostima glavnih komponenti  $\mathbf{gk}$  za ispitivane molekule. Broj glavnih komponenti (broj  $\mathbf{gk}$  vektora) je manji od broja *in silico* deskriptora u matrici  $\mathbf{X}_d$ . Kod postavljanja modela traži se funkcija vektora eksperimentalnih podataka  $\mathbf{Y}$  od vektora glavnih komponenti  $\mathbf{gk}$  (vektori glavnih komponenti su kolone matrice  $\mathbf{GK}$ ) pomoću višestruke regresione analize.

$$y = \text{konstanta} \pm a gk_1 \pm b gk_2 \pm \dots \quad (2.5)$$

U regresionoj jednačini (2.5)  $a$  i  $b$  su numeričke konstante (konstante regresije) koje se dobijaju u toku postavljanja modela.

Tako je *Livingstone* [124] izučavao veliki broj molekula benzodiazepina i za  $ED_{50}$  (koncentracija leka pri kojoj se postiže 50% od maksimalnog efekta), vektor  $\mathbf{Y}$  u opštem modelu, dao sledeću regresionu jednačinu:

$$\log ED_{50} = 1.34 - 0.25gk_1 + 0.2gk_2 + 0.34gk_3 \quad (2.6)$$

*Livingstone* je glavne komponente  $\mathbf{gk}$  dobio primenom metode glavnih komponenti na *in silico* deskriptore (kvantno mehaničke prirode) matrice  $\mathbf{X}_d$  sa 19 derivata benzodiazepina. Statistički pokazatelji jednačine (2.6) su bolji nego kada se regresiona jednačina dobija na osnovu varijabile  $\mathbf{X}_d$  matrice.

Osnova *PCA* metode je da se matrica podataka  $\mathbf{X}$  napiše kao proizvod dve matrice, matrice glavnih komponenti (*score*)  $\mathbf{GK}$  i matrice koeficijenta glavnih komponenti  $\mathbf{P}$  (*loading*). Glavne komponente predstavljaju nove varijabile (osobine) koje su ortogonalne međusobno, odnosno one se ne koreliraju [114,118,125,126].

$$\mathbf{X} = \mathbf{GK}\mathbf{P}^T \quad (2.7)$$

U gornjoj matricnoj jednačini (2.7)  $\mathbf{X}$  je polazna originalna matrica podataka dimenzije  $N \times M$  gde je  $N$  broj objekta-molekula, dok je  $M$  broj varijabila koje se posmatraju za svaki objekat.  $\mathbf{GK}$  je matrica vektora glavnih komponenti  $\mathbf{gk}$  ( $\mathbf{gk}$  su kolone matrice  $\mathbf{GK}$ ) a  $\mathbf{P}^T$  je transponovana matrica koeficijenta glavnih komponenti. Matricna jednačina (2.7) ima sledeće značenje: vektori vrste matrice podataka  $\mathbf{X}$  (ima  $N$  vektora vrste-broj molekula) se preslikavaju u manji dimenzioni podprostor  $a$  ( $a$  je broj vektora glavnih komponenti  $\mathbf{gk}$  u matrici  $\mathbf{GK}$ , to jest broj vektor kolona u matrici glavnih komponenti  $\mathbf{GK}$  i važi da je  $M > a$ ) pomoću matrice  $\mathbf{P}$ . Naime, vektori vrste matrice  $\mathbf{X}$  to jest molekuli, u vektorskom prostoru  $\mathbf{X}$ , opisani su pomoću  $M$  (broj varijabila) koordinata, dok u vektorskom podprostoru  $\mathbf{GK}$  molekuli su odeđeni pomoću  $a$  (broj glavnih komponenti) koordinata. Glavne komponente u matrici  $\mathbf{GK}$  predstavljaju nov koordinatni sistem u kome koordinate ispitivanih molekula predstavljaju vrednosti  $k$  glavnih komponenti  $\mathbf{gk}$  koje se dobijaju preslikavanjem kordinata istih molekula  $x$  iz višedimenzionalnog sistema (matrica podataka  $\mathbf{X}$ ) pomoću matrice  $\mathbf{P}$  (matricna jednačina 2.8.) [118,125,126].

$$\mathbf{GK} = \mathbf{X}\mathbf{P} \quad (2.8)$$

Glavne komponente  $\mathbf{gk}$  predstavljaju linerne kombinacije vrednosti svih varijabila matrice podataka  $\mathbf{X}$  za svaki molekul. Na primer  $\mathbf{gk}_1$  se može predstaviti na sledeći način:

$$k_{11} = p_{11}x_{11} + p_{21}x_{12} \dots + \dots + p_{j1}x_{1j} \dots + \dots + p_{M1}x_{1M} \quad (2.9)$$

$$k_{21} = p_{11}x_{21} + p_{21}x_{22} \dots + \dots + p_{j1}x_{2j} \dots + \dots + p_{M1}x_{2M} \quad (2.10)$$

$$k_{i1} = p_{11}x_{i1} + p_{21}x_{i2} \dots + \dots + p_{j1}x_{ij} \dots + \dots + p_{M1}x_{iM} \quad (2.11)$$

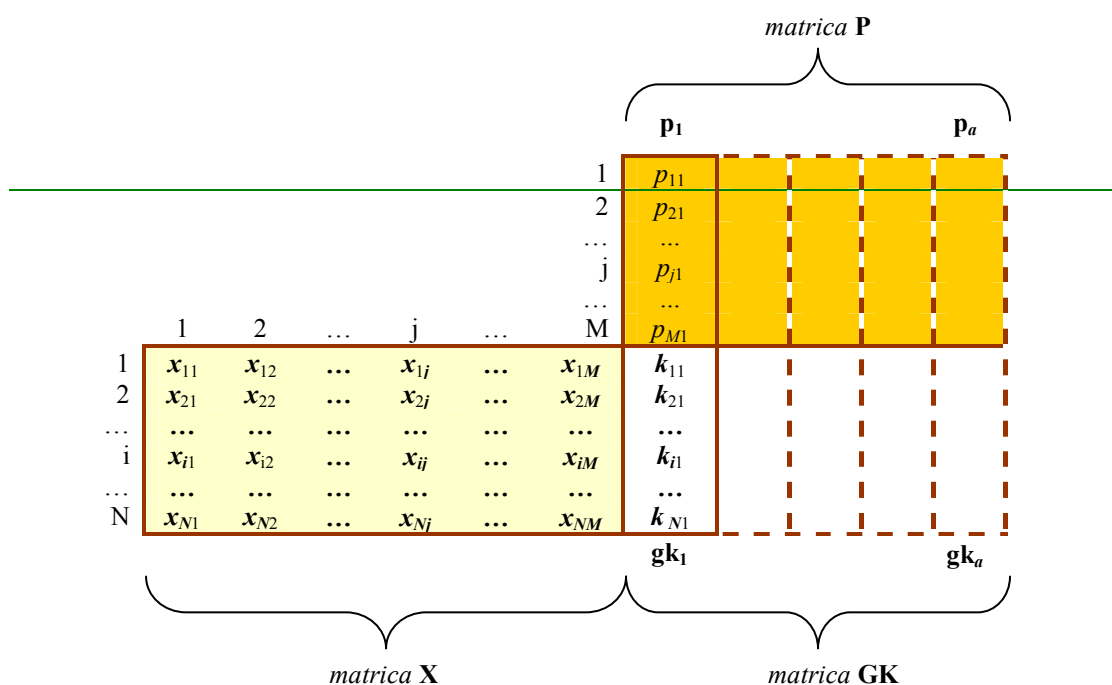
$$k_{N1} = p_{11}x_{N1} + p_{21}x_{N2} \dots + \dots + p_{j1}x_{Nj} \dots + \dots + p_{M1}x_{NM} \quad (2.12)$$

U gornjim jednačinama  $k$  predstavlja vrednost koordinate ispitivanih molekula u glavnim komponentama  $\mathbf{gk}$ . Na primer  $k_{21}$  iz jednačine (2.10) je vrednost koordinate drugog molekula  $2$  u glavnoj komponenti  $\mathbf{gk}_1$ ,  $p$  predstavlja vrednost iz matrice koeficijenta glavnih komponenti (*loading*)  $\mathbf{P}$ . Za svaku glavnu komponentu  $\mathbf{gk}$  iz matrice  $\mathbf{GK}$  odgovara jedna kolona u matrici  $\mathbf{P}$ . Matrica  $\mathbf{P}$  ima onoliko vrsti koliko ima originalnih varijabila u matrici podataka  $\mathbf{X}$ . Tako na primer,  $p_{21}$  predstavlja koeficijent glavne

komponente  $\mathbf{gk}_1$  za varijabilu 2 iz matrice podataka  $\mathbf{X}$ . Na osnovu matričnog računa jednačine 2.9-2.12 se mogu napisati kao [118,127]:

$$\mathbf{gk}_1 = \mathbf{X} \mathbf{p}_1 \quad (2.13)$$

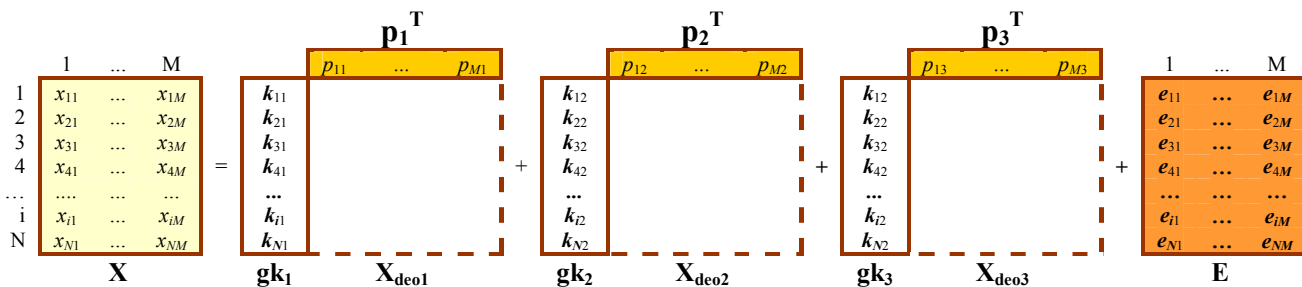
Na Slici 2.44. predstavljena je *Falcon*-ova šema [128] matrične jednačine (2.13) kao proizvod matrice podataka  $\mathbf{X}$  i vektora  $\mathbf{p}_1$  (prva kolona matrice  $\mathbf{P}$ ). Kao rezultat proizvoda (2.13) dobija se vektor glavne komponente  $\mathbf{gk}_1$  (prva kolona matrice  $\mathbf{GK}$ ). Isto tako na Slici 2.44. je prikazan i proizvod matrice  $\mathbf{X}$  i  $\mathbf{P}$  (sadrži  $a$  vektora kolone  $\mathbf{p}$ ) sa rezultantnom matricom  $\mathbf{GK}$  (sadrži  $a$  vektora kolone  $\mathbf{gk}$ ).



Slika 2.44. Falcon-ova šema proizvoda matrice: prikaz matrične jednačine (2.13) i (2.8).

Vektori glavnih komponenti  $\mathbf{gk}$  u matrici vrednosti glavnih komponenti (*score*)  $\mathbf{GK}$  su poređani prema veličini dela varijacije koje objašnjavaju u matrici podataka  $\mathbf{X}$ . Glavna komponenta  $\mathbf{gk}_1$  objašnjava najveći deo varijacije, dok glavna komponenta  $\mathbf{gk}_2$  objašnjava najveći deo one varijacije koju nije objasnila prva glavna komponenta, dok glavna komponenta  $\mathbf{gk}_3$  objašnjava najveći deo ukupne varijacije matrice podataka  $\mathbf{X}$  koje nisu objasnile predhodne glavne komponente ( $\mathbf{gk}_1$  i  $\mathbf{gk}_2$ ) itd [118].

Međutim, obično prve tri glavne komponente objašnjavaju veći deo varijacije u matrici podataka  $\mathbf{X}$ , pa se ostale glavne komponente i ne koriste. Naime, *Wold* sa saradnicima [129] je empirijskim putem našao (matematički nije dokazano) da glavne komponente sa malim sopstvenim vrednostima (glavne komponente koje objašnjavaju mali deo ukupne varijacije u matrici  $\mathbf{X}$ ) se mogu odbaciti, pošto deo varijacije podataka matrice  $\mathbf{X}$  koju objašnjavaju zapravo predstavljaju grešku merenja-određivanja.



Slika 2.45 . Matrični prikaz Wold-ove pretpostavke.

Na Slici 2.45. prikazana je *Wold*-ova pretpostavka. Ako se koriste tri glavne komponente koje objašnjavaju većinu varijacije u matrici podataka  $\mathbf{X}$  onda proizvod (matrični)  $\mathbf{gk}_1\mathbf{p}_1^T$  predstavlja deo podataka (informacije)  $\mathbf{X}_{\text{deo1}}$  od ukupne informacije matrice podataka  $\mathbf{X}$  koji je preslikan u  $\mathbf{gk}_1$ , dok  $\mathbf{gk}_2\mathbf{p}_2^T$  predstavlja deo podataka (informacije)  $\mathbf{X}_{\text{deo2}}$  od ukupne informacije matrice podataka  $\mathbf{X}$  koji je preslikan u  $\mathbf{gk}_2$  itd. jednačina (2.14) i Slika 2.45.:

$$\mathbf{X} = \mathbf{gk}_1\mathbf{p}_1^T + \mathbf{gk}_2\mathbf{p}_2^T + \mathbf{gk}_3\mathbf{p}_3^T + \mathbf{E} = \mathbf{X}_{\text{deo1}} + \mathbf{X}_{\text{deo2}} + \mathbf{X}_{\text{deo3}} + \mathbf{E} \quad (2.14)$$

$\mathbf{E}$  predstavlja deo podataka matrice  $\mathbf{X}$  koji nije preslikan u prve tri glavne komponente  $\mathbf{gk}$ , već predstavlja deo informacije matrice  $\mathbf{X}$  koji je preslikan u ostale glavne komponente (glavne komponente sa malim sopstvenim vrednostima) i prema *Wold*-u to je greška merenja ili buka merenja. Stoga odbacivanjem glavnih komponenti sa malim sopstvenim vrednostima (objašnjavaju mali deo varijacije u matrici podataka  $\mathbf{X}$ ) oslobađa se od greške merenja.

## 2.5.1. GRAFIČKO PREDSTAVLJANJE METODE GLAVNIH KOMPONENTI

### 2.5.1.1. Grafičko predstavljanje matrice koeficijenta glavnih komponenti

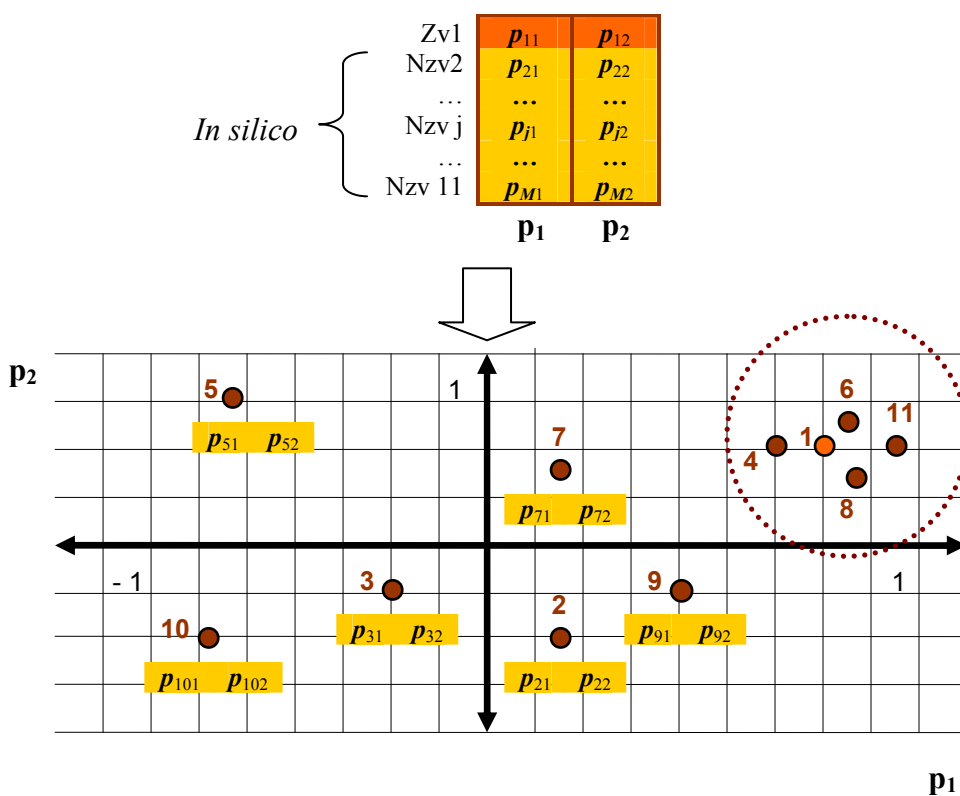
Grafičko predstavljanje matrice koeficijenta glavnih komponenti  $\mathbf{P}$  (*loading*) podrazumeva prikazivanje onih vektora kolone  $\mathbf{p}$  matrice  $\mathbf{P}$  koji preslikavaju informaciju iz matrice  $\mathbf{X}$  u glavne komponente sa velikim sopstvenim vrednostima (to su  $\mathbf{gk}_1$  i  $\mathbf{gk}_2$  koji objašnjavaju veći deo varijacije podataka u matrici  $\mathbf{X}$ ). Što znači, da se  $\mathbf{p}_1$  predstavlja u funkciji  $\mathbf{p}_2$ . Tačke grafika  $\mathbf{p}_1/\mathbf{p}_2$  predstavljaju originalne varijabile, i varijabile koje su međusobno blizu, ukazuje na njihovu dobru međusobnu korelaciju [118,129]. Kod postavljanja regresione jednačine od ovih međusobno koreliranih varijabila dovoljno je koristiti samu jednu. *McCabe* [130] i *Krzanowski* [123] metodu glavnih komponenti primenjuju na matricu podataka  $\mathbf{X}$ , gde su prisutni i eksperimentalno određeni podaci (zavisne varijabile) kao i *in silico* podaci (nezavisne varijabile). Ukoliko se u blizini eksperimentalno određenoj veličini (zavisna varijabila,  $Z_v$ ) na  $\mathbf{p}_1/\mathbf{p}_2$  grafiku nalaze nezavisne varijabile  $N_{zv}$  to ukazuje na njihovu korelaciju (korelaciju *in silico* deskriptora sa eksperimentalno dobijenim podacima), te se formira regresiona jednačina u koju ulaze

one *in silico* varijabile koje se nalaze blizu zavisnoj varijabili, dok se ostale odbacuju (Slika 2.46.).

Na Slici 2.46. tačka 1 u ravni  $\mathbf{p}_1$ - $\mathbf{p}_2$  odgovra zavisnoj varijabili  $Zv$ , dok su ostale tačke *in silico*-nezavisne varijabile  $Nzv$ . *In silico* tačke (4,6,8 i 11) koje se nalaze u blizini tačke zavisne varijabile 1 koreliraju se sa ekspeimentalno određenom varijabilom, dok ostale tačke se odbacuju, te u model-regresionu jednačinu (koja objašnjava zavisnu varijabilu,  $Zv$ ) ulaze *in silico* varijabile:  $Nzv4$ ,  $Nzv6$ ,  $Nzv8$  i  $Nzv11$ .

$$Zv1 = const \pm Nzv4 \pm Nzv6 \pm Nzv8 \pm Nzv11$$

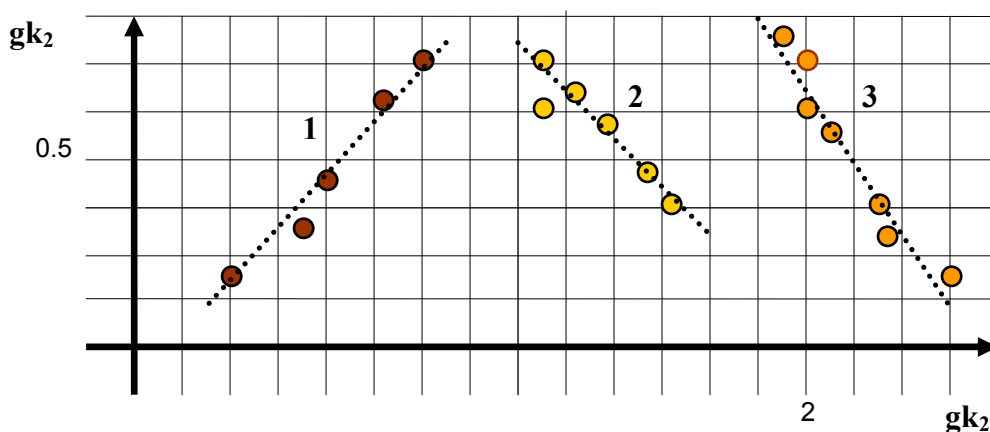
Vrednosti  $p$  u vektorima  $\mathbf{p}$  su zapravo korelacije između varijabile i glavne komponente  $\mathbf{gk}$  [118,129].



Slika 2.46. Grafik koeficijenta glavnih komponenti (loading).

### 2.5.1.2. Grafički prikaz vektora glavnih komponenti

Za grafičko prikazivanje podataka se koriste prva i druga glavna komponenta u slučaju da je njihova kumulativna sopstvena vrednost veća od 80%, a ako je manja onda se koristi i treća glavna komponenta [118]. Tačke u ravni vektora  $\mathbf{gk}_1\text{-}\mathbf{gk}_2$  ili u prostoru vektora  $\mathbf{gk}_1\text{-}\mathbf{gk}_2\text{-}\mathbf{gk}_3$  predstavljaju ispitivane molekule. Ukoliko između ispitivanih molekula postoji sličnost onda se slični molekuli grupišu. Ako se u skupu ispitivanih molekula javljaju homologne serije onda ti molekuli u ravni  $\mathbf{gk}_1\text{-}\mathbf{gk}_2$  formiraju prave linije [131]. Različiti homolozi daju posebne linije. *Sârbu* i saradnici [132] su ispitivali različite molekule žučnih kiselina pomoću reversno fazne tankoslojne hromatografije gde su menjali odnos vode i metanola u mobilnoj fazi. Za svaku žučnu kiselinu pri određenom odnosu vode i metanola (mobilna faza) određena je  $R_f$  vrednost iz koje je izračunata molekularna lipofilnost  $R_{M0}$ . Na matricu podataka  $R_{M0}$  vrednosti (vrste-ispitivani molekuli, kolona-koncentracija metanola u mobilnoj fazi) primenjena je metoda glavnih komponenti pri čemu je dobijeno da već prva i druga glavna komponenta objašnjavaju 99.75 % varijacije podataka u polaznoj matrici, te je za vizualizaciju dovoljno koristiti samo ravan  $\mathbf{gk}_1\text{-}\mathbf{gk}_2$ .



Slika 2.47. Grafički prikaz homolognih grupa molekula žučnih kiselina u ravni glavnih komponenti  $\mathbf{gk}$  (score)  $\mathbf{gk}_1\text{-}\mathbf{gk}_2$ . **1** nekonjugovane žučne kiseline, **2** glikokonjugovane i **3** taurokonjugovane žučne kiseline.

U ravni  $\mathbf{gk}_1\text{-}\mathbf{gk}_2$  ispitivane žučne kiseline su grupisane oko tri prave. Prava **1** sa Slike 2.47. opisuje nekonjugovane žučne kiseline, dok prave **2** i **3** glikokonjugovane odnosno taurokonjugovane žučne kiseline.

## 2.6. METODE GRUPISANJE MOLEKULA U VIŠEDIMENZIONALNOM PROSTORU U MEDICINSKOJ HEMIJI I BIOHEMIJI

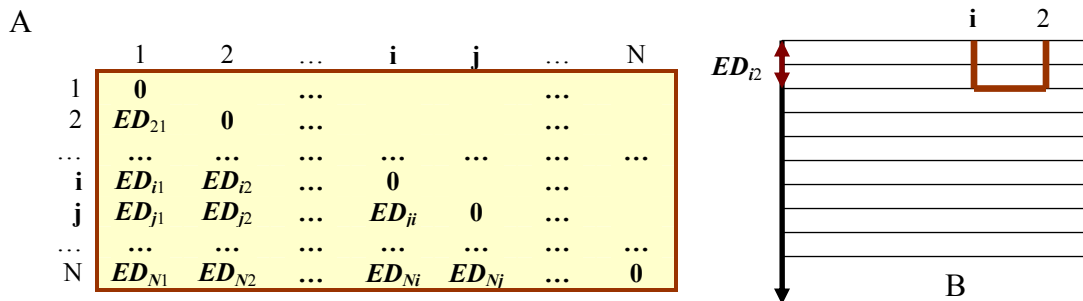
Višedimenzionalni prostor predstavlja broj varijabila (osobina) molekula koje se posmatraju i na osnovu kojih se vrši grupisanje-klasifikacija ispitivanih molekula. Grupisanje molekula ima veliki značaj u hemiji lekova naročito kada se primenjuje kombinatorna hemija za dobijanje aktivnih (biološki) molekula [114,119]. Klasifikacija molekula može da bude hijerarhijska i nehijerarhijska. Kod hijerarhijske klasifikacije pored grupisanja molekula određuje se i sličnost između dobijenih grupa [118].

### 2.6.1. HIJERARHIJSKO GRUPISANJE

Kod hijerarhijskog grupisanja N molekula na osnovu M varijabila (koordinate) *Füstös* sa saradnicima [133] prvo računa *Eukleides*-ovo rastojanje *ED* između ispitivanih objekata (molekula):

$$ED_{ij} = [\sum (x_{i,m} - x_{j,m})^2]^{1/2} \quad (2.15)$$

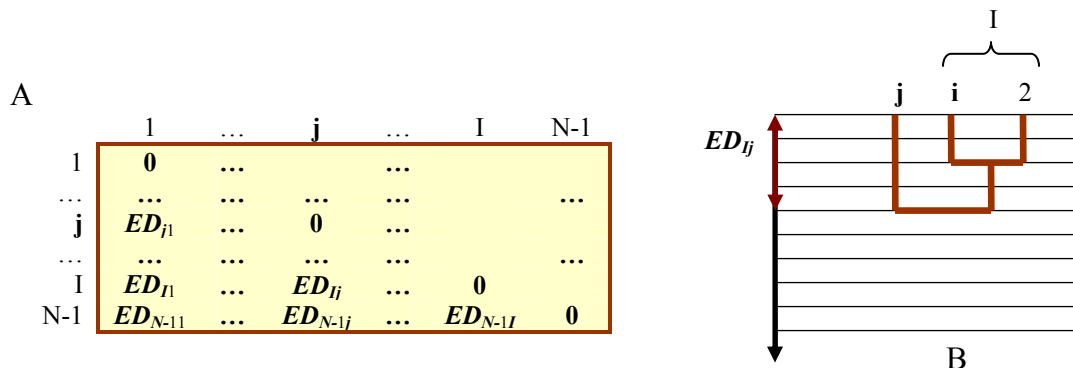
U gornjoj jednačini  $(x_{i,m} - x_{j,m})^2$  predstavlja kvadrat razlike vrednosti *m*-te koordinate (varijabile) između molekula *i* i *j*. Kvadrat razlike koordinata se računa po svakoj varijabili, a zatim se formira NxN matrica *Eukleides*-ovog rastojanja (Slika 2.48. A) [114,118,133], a potom se pristupi izgradnji dendrograma.



Slika 2.48. A: *Eukleides*-ova rastojanja između molekula (matrica rastojanja NxN). B: Početni korak u izgradnji dendrograma.

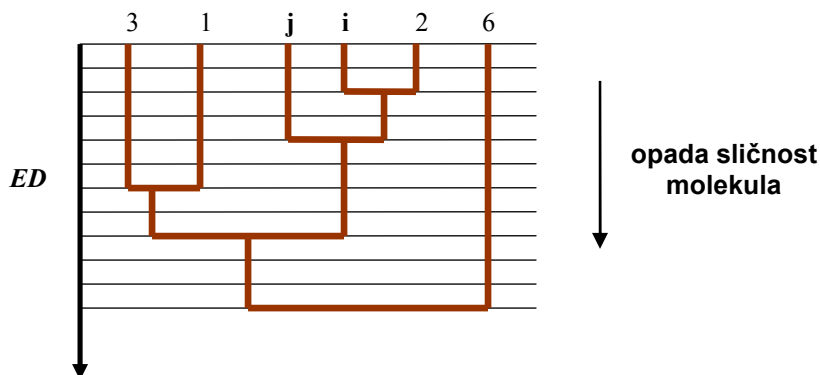
Pomoću algoritama se nađe molekulski par koji se na osnovu jednačine (2.15) nalazi međusobno najbliže, to jest ima najmanju vrednost *ED* iz matrice rastojanja NxN (Slika 2.48. A). Na primer ako su molekuli *i* i 2 najbliži, onda se ti molekuli u dendrogramu povežu na *ED*<sub>i2</sub> rastojanju od početne tačke na apscisi (Slika 2.48. B), što znači da su ovi molekuli međusobno najbliži u skupu N molekula. U sledećem koraku molekuli *i* i 2 koji su povezani posmatraju se kao jedan objekat I, te se računa udaljenost ostalih molekula od I objekta za dobijanje (N-1)x(N-1) matrice rastojanja. Rastojanje ostalih

molekula od I objekta se računa na osnovu sledećih pravila: pravilo proseka, pravilo jednostavnog povezivanja, pravilo potpunog povezivanja, *Ward*-ovo pravilo, centroidno pravilo itd. Međutim, *Massart* sa saradnicima [134] je pokazao da primenom centroidnog i *Ward*-ovog pravila u potpunosti se reprodukuje originalna struktura podataka (Slika 2.49. A i B).



Slika 2.49. A: Eukleides-ova rastojanja između molekula (matrica rastojanja  $(N-1) \times (N-1)$ ). B: Izgradnja dendrograma: povezuje se j molekul sa I objektom, pošto je  $ED_{ij}$  najmanje rastojanje u  $(N-1) \times (N-1)$  matrici.

U sledećem koraku j molekul i I objekat se posmatraju kao novi zajednički objekat J, te se računa Eukleides-ovo rastojanje između objekta J i ostalih molekula, i formira se matrica rastojanja  $(N-2) \times (N-2)$ , gde se onda nalazi najkraće rastojanje između preostalih molekula ili preostalih molekula i objekta ili samih objekata koji se zatim povezuju u dendrogramu (Slika 2.50.). Proces se nastavlja sve dok postoje objekti.



Slika 2.50. Aglomerativni dendrogram.

Kod aglomerativnog dendrograma (Slika 2.50.) na početku apscise svaki molekul je odvojena grupa, koji se u toku konstruisanja dendrograma postepeno povezuju (u svakom koraku se povezuju oni objekti koji su međusobno najbliži). Postoje i obrnuti postupci za dobijanje dendrograma kada je svaki molekul u jednoj grupi i postepeno se razdvajaju-divizivni dendrogram [114,118,135]. *De Juan* sa saradnicima [136] je pomoću hijerarhijskog grupisanja (aglomerativni dendrogram) uspeo da grupiše 43 organska rastvarača u 3 grupe (solvochromne grupe).



## 2.6.2. NEHIJERARHIJSKO GRUPISANJE

Jedna od relativno najjednostavnijih i često primenjivanih nehijerarhijskih postupaka grupisanja molekula je metoda "K-srednje" [137-139]. Kod ove metode unapred se zadaje na koliko grupa (K je broj grupa) se želi podeliti početni skup molekula. Vrednost K se može dati nasumično ili na osnovu predhodnih ispitivanja. Algoritam "K-srednje" metode nasumično raspoređuje objekte (molekule) u K grupe. Zatim se u dobijenim grupama izračuna prosečna vrednost svake osobine (koordinate) molekula, te se onda računa zbir kvadrata odstupanja svake osobine (koordinate) molekula od srednje vrednosti-funkcija indikator *FI*. Funkcija indikator se računa za svaki molekul. U sledećem koraku jedan molekul iz jedne grupe se premešta u drugu grupu, te se ponovo računa indikatorska funkcija, i ukoliko opada onda se nastavlja sa premeštanjem-preraspodelom molekula, koje se ponavlja sve dok funkcija *FI* ne bude konstantna.

U literaturi se još koriste sledeća nehijerarhijska grupisanja molekula: *Jarvis-Patric*-ovo grupisanje, *fuzzy* grupisanje, grupisanje pomoću *Kohonen*-ove mreže, diskriminantna analiza itd [114,118,133].

## 2.6.3. PRIMENA HIJERARHIJSKOG I NEHIJERARHIJSKOG GRUPISANJA KOD ŽUČNIH KISELINA

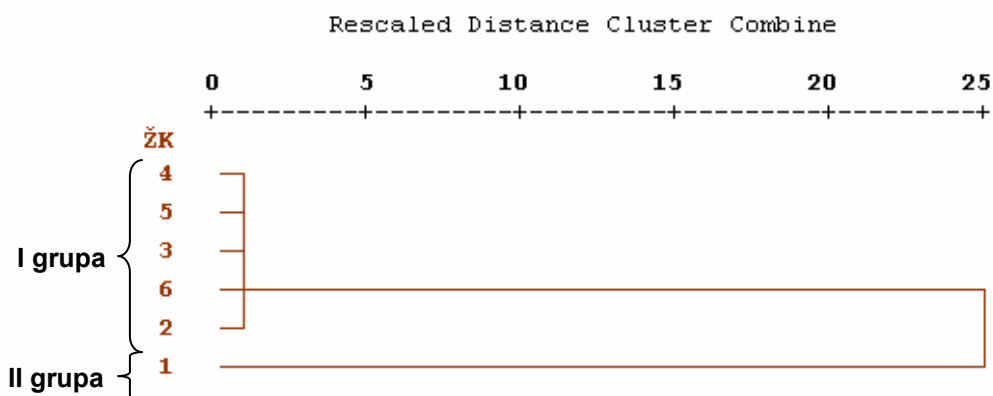
Tabela 2.2. *In silico* deskriptori holne kiseline i njenih keto derivata

Žučne kiseline	logP	ClogP	površina	dipol	ovalnost	ABSQ	ABSQo
Holna kisel. (1)	3,57	2,94	469,69	1,48	1,62	4,89	1,81
12-MKH (2)	3,42	3,09	425,64	4,14	1,64	4,69	1,77
7-MKH (3)	3,47	3,10	419,10	2,82	1,61	4,70	1,77
7,12-DKH (4)	3,37	3,21	416,84	5,18	1,63	4,50	1,74
3,7-DKH (5)	3,36	3,21	418,72	4,92	1,63	4,49	1,74
3,7,12-TKH (6)	3,60	3,28	413,67	6,42	1,63	4,30	1,72

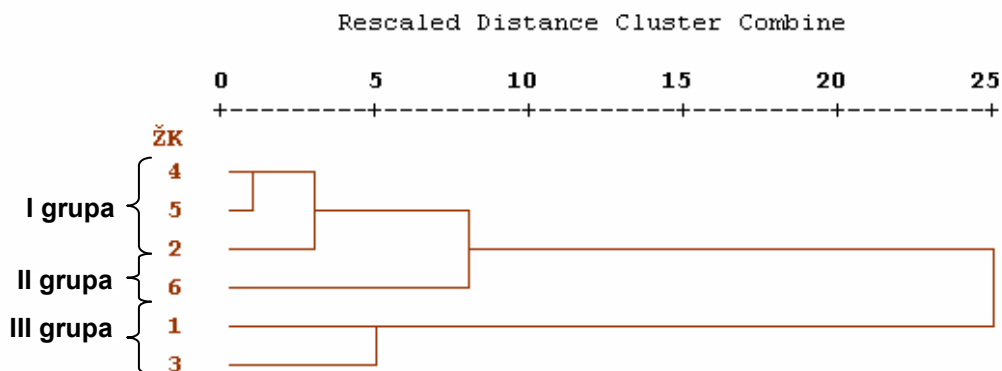
logP i Clog P - particioni koeficijenti, ABSQ - apsolutne vrednosti naboja na svakom atomu u molekulu, ABSQo - apsolutne vrednosti naboja na atomima kiseonika u molekulu

U gornjoj tabeli (Tabela 2.2.) predstavljeni su *in silico* molekularni deskriptori (Alchemi 2000) sledećih žučnih kiselina: holne kiseline, 12-monoketoholne kiseline (12-MKH), 7-monoketoholne kiseline (7-MKH), 7,12-diketoholne kiseline (7,12-DKH), 3,12-diketoholne kiseline (3,12-DKH) i 3,7,12-triketoholne kiseline (3,7,12-TKH). Na osnovu struktura žučnih kiselina iz Tabele 2.2. se očekuju četiri grupe, u prvoj grupi su monoketo derivati u drugoj diketo derivati holne kiseline, dok u trećoj i četvrtoj grupi su holna odnosno triketoholna kiselina. Međutim, ako se primeni hijerarhijsko grupisanje na žučne kiseline iz gornje tabele (Tabela 2.2.) koristeći centroidno pravilo, onda se dobivaju dve grupe, I grupa sa keto derivatima i II grupa sa holnom kiselinom (Slika 2.51), što na prvi pogled znači da se keto derivati holne kiseline ne mogu međusobno razlikovati na osnovu varijabla iz Tabele 2.2. Međutim iz Tabele 2.2. se uočava da su vrednosti varijabla površina molekula mnogo veća od vrednosti ostalih varijabla, takođe

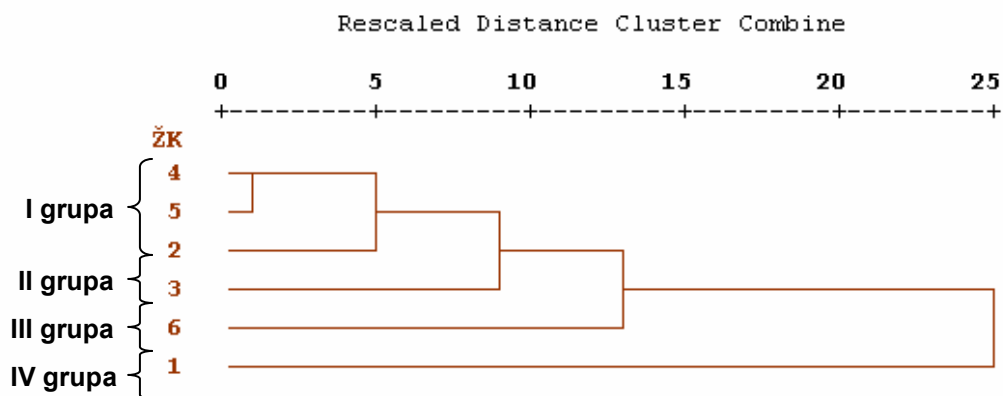
vrednosti površina određuju raspodelu žučnih kiselina. Naime, ako se formira dendrogram žučnih kiselina samo na osnovu njihovih površina onda se dobija identični dendrogram kao na Slici 2.51., a ako se odredi hijerarhijsko grupisanje bez varijabila površine onda se dobija dendrogram sa tri grupe žučnih kiselina (Slika 2.52.). Što znači, da se dobijaju strukturno drukčiji dendrogrami za isti skup molekula (Slika 2.51. i 2.52.), te da varijabile sa malim vrednostima ne dolaze do izražaja pri formiranju dendrograma. U slučaju kada se vrednosti varijabila značajno razlikuju, onda *De Maesschalck* [140] kao i *Brown* [141] predlažu da se na matrici podataka primeni postupak standardizacije (*autoscaling*). Primenom standardizacije prosečna vrednost svake varijabile je 0, dok je njihova standardna devijacija 1. Osobine-varijabile tokom standardizacije gube dimenzije. Pored standardizacije u literaturi [118] se predlaže i primena postupka “vrednosti između 0-1“ (*range scaling*). Kod ovog postupka vrednosti osobina se raspoređuju između 0 i 1, a varijabile takođe gube dimenzije.



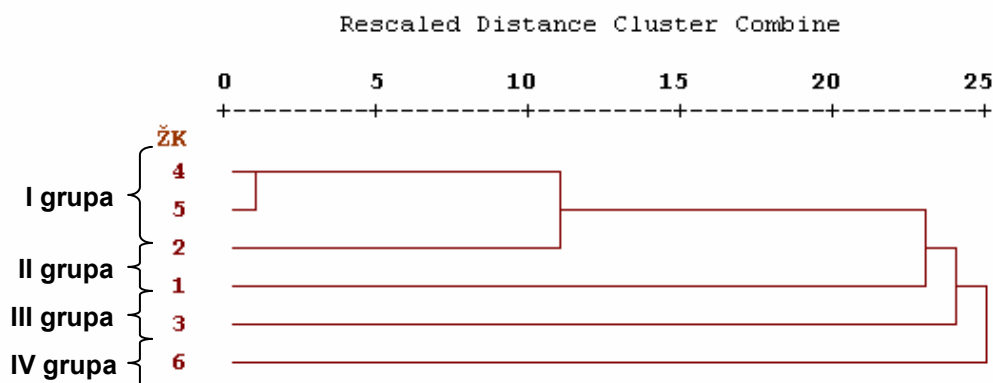
Slika 2.51. Dendrogram dobijen centroidnim postupkom na osnovu varijabila iz Tabele 2.2., korišćenjem isključivo varijabile površine molekula.



Slika 2.52. Dendrogram dobijen centroidnim postupkom na osnovu podataka iz Tabele 2.2. bez varijabila površine molekula.



Slika 2.53. Dendrogram dobijen centroidnim postupkom na osnovu varijabila iz Tabele 2.2., kada se primeni postupak “vrednosti između 0-1“ (range scaling) na vrednosti varijabila.



Slika 2.54. Dendrogram dobijen centroidnim postupkom na osnovu prve tri glavne komponente, glavne komponente su dobijene na osnovu podataka iz Tabele 2.2.

Slika 2.53. predstavlja dendrogram koji se formira kada se primeni postupak “vrednosti između 0-1“ na polaznu matricu podataka (Tabela 2.2.). Na dendrogramu sa Slike 2.53. se može uočiti da su diketo derivati holne kiseline međusobno najsličniji (**4** i **5**). Naime, oni su u dendrogramu povezani pri manjoj vrednosti apscise od ostalih žučnih kiselina. 12-Monoketoholna kiselina (**2**) je najsličnija sa diketo derivatima holne kiseline, dok 7-monoketoholna kiselina (**3**) formira posebnu grupu (grupa **II**). Triketoholna kiselina (**6**) formira grupu **III**, dok holna kiselina (**1**) grupu **IV**, što znači da posle primene postupka “vrednosti između 0-1“ na podatke iz Tabele 2.2. ispitivane žučne kiseline formiraju četiri grupe što se i očekuje na osnovu njihove strukture, dok se 7-monoketoholna i 12-monoketoholna kiselina nalaze odvojeno. 12-Monoketoholna kiselina se nalazi zajedno sa diketo derivatima holne kiseline. Da bi se neki dendrogram (ili neka druga klasifikaciona metoda) potvrdio posle primene metode “vrednosti između 0-1“ Borosy [118] predlaže da se na matricu podataka (Tabela 2.2.) prvo primeni metoda glavnih komponenti (PCA) i na taj način da se za dalju analizu (za dobijanje dendrograma)

koriste one glavne komponente **gk** koje objašnjavaju veći deo ukupne varijacije u matrici podataka (iznad 90% varijacije). Na Slici 2.54. prikazan je dendrogram nakon primene metode glavnih komponenti na vrednosti iz Tabele 2.2. Kao što se vidi sa dendrograma žučne kiseline se grupišu u četiri grupe. U I grupu ulaze diketo derivati holne kiseline (**4** i **5**) koje su kao i u predhodnom dendrogramu povezani pri manjoj vrednosti apscise od ostalih žučnih kiselina. 12-Monoketoholna kiselina (**2**) se takođe može pripisati grupi sa diketo derivatima holne kiseline kao i u dendrogramu sa Slike 2.53. Međutim, između dva dendrograma uočljiva je razlika u nivou (stepenu) povezivanja 12-monoketoholne kiseline (**2**) sa diketo derivatima holne kiseline (**4** i **5**). Naime, u dendrogramu sa Slike 2.54. 12-monoketoholna kiselina je povezana sa diketo derivatima holne kiseline pri većoj vrednosti apscise u odnosu na nivo povezivanja prema dendrogramu sa Slike 2.53., što znači da dendrogram sa Slike 2.54. pokazuje manju sličnost 12-monoketoholne kiseline sa diketo derivatima holne kiseline nego dendrogram sa Slike 2.53. Svaka preostala žučna kiselina (holna kiselina (**1**), monoketo derivati holne kiseline (**2,3**) i triketoholna kiselina (**6**)) na dendrogramu sa Slike 2.54. se nalazi u posebnoj grupi, međutim grupisanje žučnih kiselina ne pokazuje isti značaj kao i na dendrogramu sa Slike 2.53. Naime, na dendrogramu sa Slike 2.53. nivo povezivanja žučnih kiselina iz grupa II, III i IV je između 23 i 25 jedinice apscise, dok je nivo povezivanja istih grupa na dendrogramu sa Slike 2.53. između 8 i 25 jedinice apscise, što znači da su grupe sa dendrograma sa Slike 2.53. manje slične, te su više razdvojene. Prema mišljenju Schoonjans-a sa saradnicima [142] i Livingstone-a [124] što je veća razlika u nivou povezivanja grupa, to je njihova sličnost manja, odnosno grupisanje je značajnije.

Kod oba dendrograma je zajedničko ( Slike 2.53. i 2.54.) da se najbolje grupišu diketo derivati holne kiseline, te da su holna, triketoholna i 7-monoketoholna kiselina raspoređene u posebne grupe, kao i da se dve monoketoholne kiseline nalaze u odvojenim grupama. Iako dendrogram sa Slike 2.54. (primena metode glavnih komponenti na matricu podataka) pokazuje manji nivo značajnosti u formiranju grupa, ipak to potvrđuje postojanje četiri grupe na dendrogramu sa Slike 2.53. (primena postupka “vrednosti između 0-1“ na polaznu matricu podataka).

Tabela 2.3. Primena “K-srednje“ metode na grupisanja žučnih kiselina prema podacima iz Tabele 2.2. A: Posle primene standadizacije. B: Nakon primene metode glavnih komponenti

A			B		
Žučne kiseline	grupa	d	Žučne kiseline	grupa	d
Holna kiselina (1)	4	0.00	Holna kiselina (1)	4	0.00
12-MKH (2)	1	1.49	12-MKH (2)	1	1.08
7-MKH (3)	2	0.00	7-MKH (3)	2	0.00
7,12-DKH (4)	1	0.73	7,12-DKH (4)	1	0.51
3,7-DKH (5)	1	0.79	3,7-DKH (5)	1	0.58
3,7,12-TKH (6)	3	0.00	3,7,12-TKH (6)	3	0.00

d-rastojanje molekula od srednje vrednosti (centra) grupe

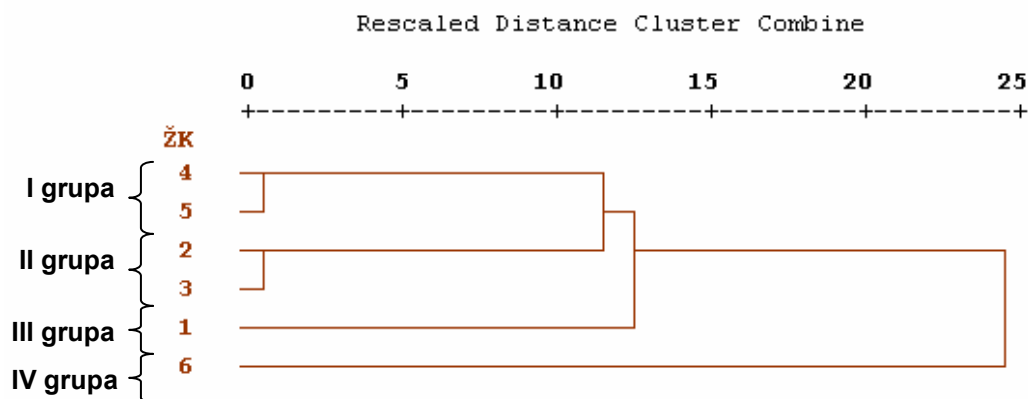
Radi provere značaja grupisanja pomoću hijerarhijske metode Horvai [118] preporučuje korišćenje “K-srednje“ metode (ili neke druge nehijerarhijske metode). Pre primene “K-srednje“ metode neophodno je podatke u Tabeli 2.2. standardizovati, da bi se izbegao neravnomerno velik uticaj vrednosti varijabile površine molekula. Ukoliko se

posmatra raspodela žučnih kiselina u četiri grupe (Tabela 2.3. A) onda se žučne kiseline grupišu kao i na dendrogramu sa Slike 2.53. U prvu grupu pored diketo derivata holne kiseline ulazi i 12-monoketoholna kiselina. Diketo derivati holne kiseline pokazuju veliku međusobnu sličnost. Naime, oni se nalaze skoro na identičnim rastojanjima od centra grupe (Tabela 2.3. A), dok je 12-monoketoholna kiselina znatno udaljenija. Primenom *PCA* metode na vrednosti iz Tabele 2.2. i grupisanjem žučnih kiselina na osnovu prva tri vektora glavne komponente **gk** (objašnjavaju 94% varijacije) pomoću postupka “K-srednje“ (Tabela 2.3. B) dobija se njihova identična raspodela sa raspedelom u Tabeli 2.3. A, čak su elementi prve grupe međusobno sličniji (manje rastojanje od centra grupe).

Prema tome, grupisanjem žučnih kiselina “K-srednje“ metodom potvrđeni su rezultati grupisanja pomoću hijerarhijske metode.

Tabela 2.4. Eksperimentalno određene vrednosti kritične micelarne koncentracije (CMC) i molekularne lipofilnosti ( $R_{M0}$ )

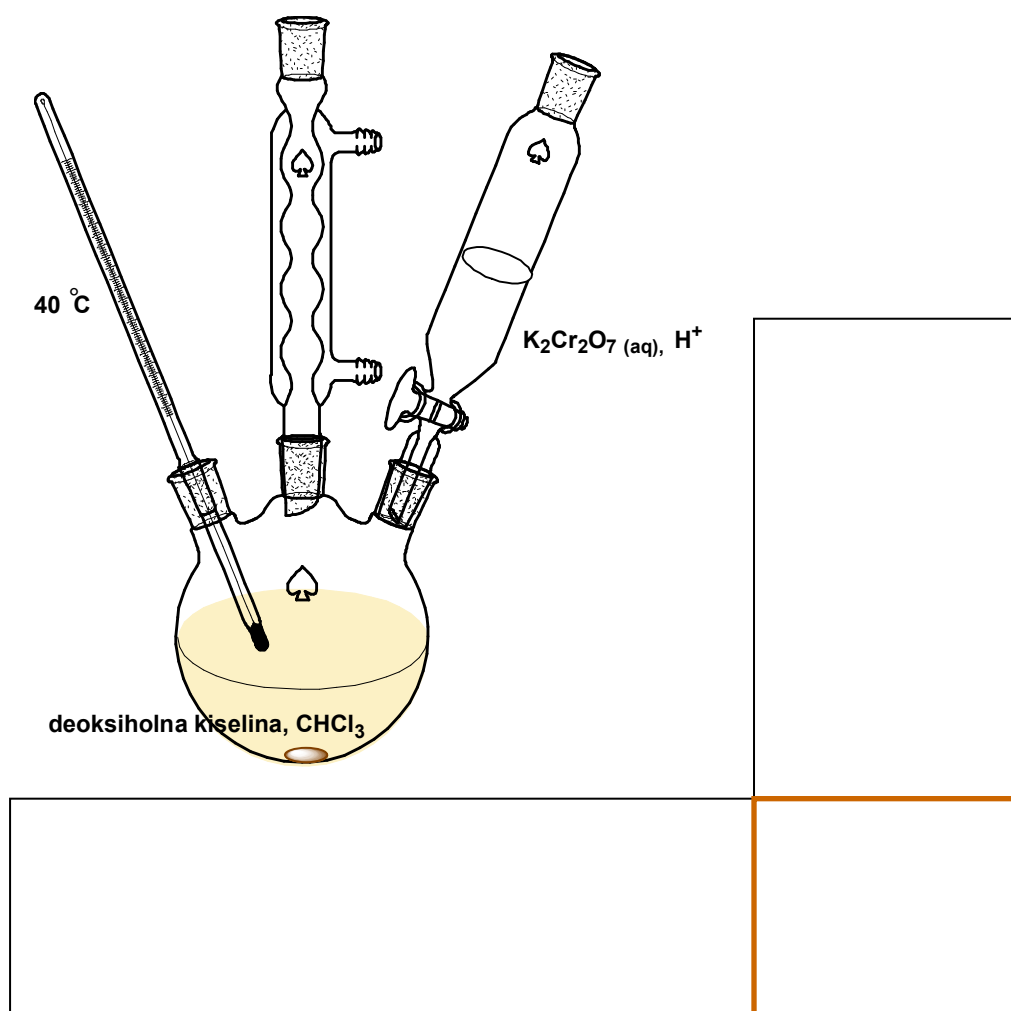
Žučne kiseline		CMC	$R_{M0}$
Holna kiselina	(1)	3,84	8,00
12-MKH	(2)	3,11	60,00
7-MKH	(3)	2,99	65,00
7,12-DKH	(4)	3,71	102,00
3,7-DKH	(5)	3,79	100,00
3,7,12-TKH	(6)	2,54	140,00



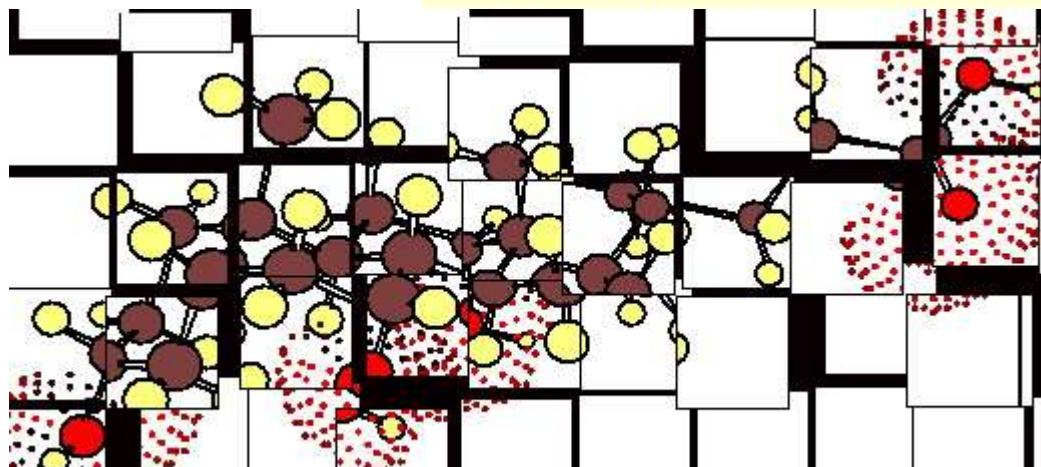
Slika 2.55. Dendrogram dobijen centroidnim postupkom na osnovu eksperimentalnih podataka Tabele 2.4. (range scaling).

Na Slici 2.55. predstavljen je dendrogram koji se dobija na osnovu eksperimentalnih podataka žučnih kiselina (Tabela 2.4., vrednosti *CMC* su odredili Poša i saradnici [11], dok  $R_{M0}$  Šárbu i saradnici [122]). Na dendrogramu sa Slike 2.55. žučne kiseline se grupišu kao što se i očekuje na osnovu njihove strukture. U prvoj grupi se nalaze diketo derivati holne kiseline (4 i 5), dok u drugoj grupi monoketo derivati holne kiseline (2 i 3). Oba diketo kao i oba monoketo derivata holne kiseline pokazuju veliku međusobnu sličnost, dok grupe I i II su povezane pri relativno visokom nivou, što znači da se diketo derivati značajno razlikuju od monoketo derivata.

# Eksperimentalni deo



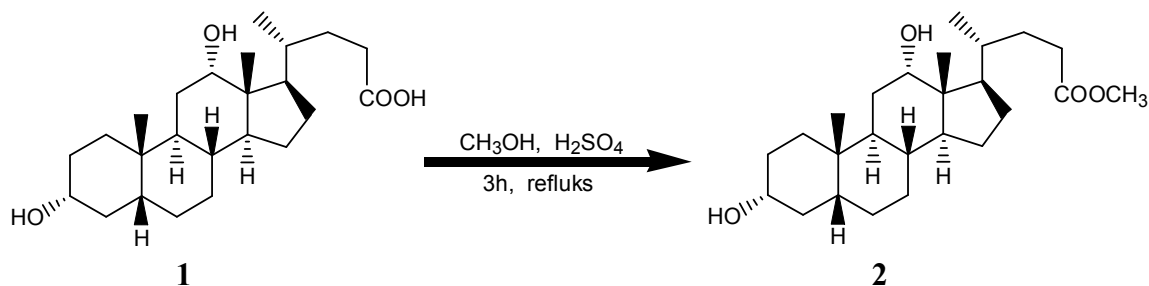
### 3. Sinteza keto derivata deoksiholne i henodeoksi- holne kiseline



### 3.1. SINTEZA 3 $\alpha$ -HIDROKSI-12-KETO-5 $\beta$ -HOLANSKE KISELINE (12-MONOKETODEOKSIHOLNA KISELINA, 5)

#### 3.1.1. ESTERIFIKACIJA DEOKSIHOLNE KISELINE (1)

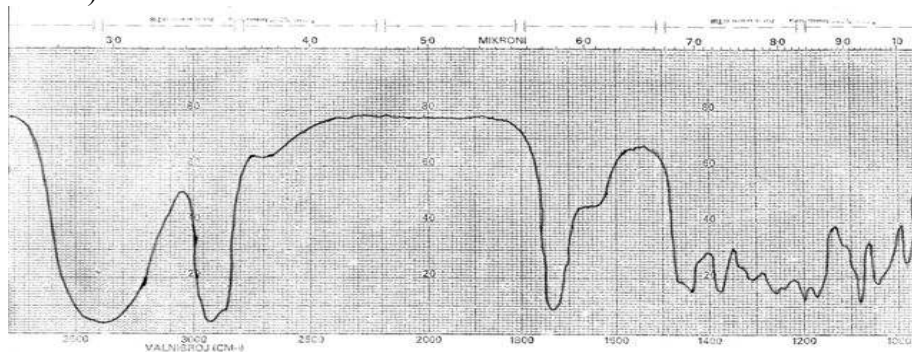
Metil 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\beta$ -holanat (**2**) se dobija u reakciji deoksiholne kiseline i metanola u prisustvu sumporne kiseline kao katalizatora. (Slika 3.1.).



Slika 3.1. Dobijanje metil 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\beta$ -holanata (**2**).

Deoksiholna kiselina (**1**, 4.50 g, 11 mmol) se rastvori u apsolutnom metanolu (22.60 cm<sup>3</sup>). U rastvor se doda koncentrovana sumporna kiselina (1 cm<sup>3</sup>) i reakciona smeša se zagreva na tački ključanja u toku tri sata. Tok esterifikacije se prati tankoslojnom hromatografijom na silika gelu (hloroform : aceton = 8 : 2). Reakciona smeša se zatim sipa u vodu (500 cm<sup>3</sup>) i ekstrahuje hlороformom. Hlorоformski ekstrakt se najpre ispira zasićenim vodenim rastvorom natrijum-bikarbonata, a potom vodom. Nakon sušenja hlороformskog ekstrakta bezvodnim natrijum-sulfatom i isparavanja hlороforma, dobija se sirovi proizvod **2** u obliku svetlo-žutog ulja. Posle kristalizacije iz metanola jedinjenje **2** se dobija u prinosu od 84 % (4.05 g), t.t. 107 °C. Struktura dobijenog metil deoksiholata (**2**) potvrđena je spektroskopskim podacima: **IR** (KBr):  $\nu_{max}$  3400 ( $\nu$ , OH), 2920 ( $\nu_{as}$ , C-H), 2860 ( $\nu_s$ , C-H, estar), 1730 ( $\nu$ , C=O, estar), 1450 ( $\delta_{as}$ , CH<sub>3</sub>), 1380 ( $\delta_s$ , CH<sub>3</sub>), 1250 ( $\nu$ , C-O-C, estar), 1040 ( $\nu$ , C-OH).

U IR spektru jedinjenja **2** uočava se signal karbonilne (estarske) funkcije na 1740 cm<sup>-1</sup> (Slika 3.2.).

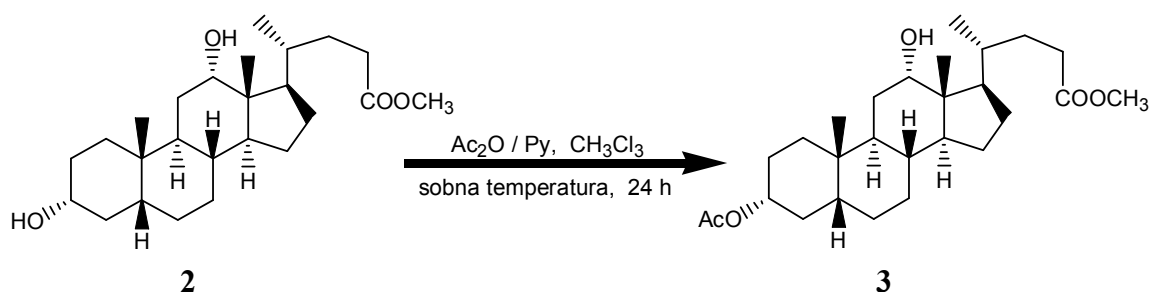


Slika 3.2. IR spektar metil 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\beta$ -holanata (**2**).



### 3.1.2. ACETILOVANJE METIL ESTRA DEOKSIHOLNE KISELINE (2)

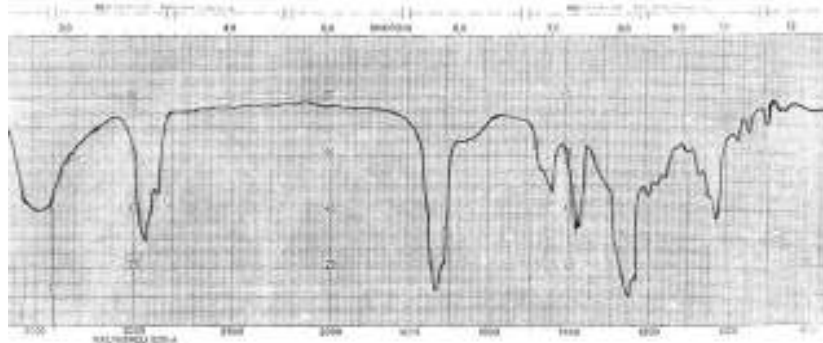
Metil 3 $\alpha$ -acetoksi-12 $\alpha$ -hidroksi-5 $\beta$ -holanat (3) se dobija selektivnim acetilovanjem hidroksi grupe u položaju 3 jedinjenja 2 u reakciji sa anhidridom sirćetne kiseline. Reakcija se odvija u hloroformu uz piridin (katalizator) na sobnoj temperaturi u trajanju od 24 sati (Slika 3.3.).



Slika 3.3. Dobijanje metil 3 $\alpha$ -acetoksi-12 $\alpha$ -hidroksi-5 $\beta$ -holanata (3).

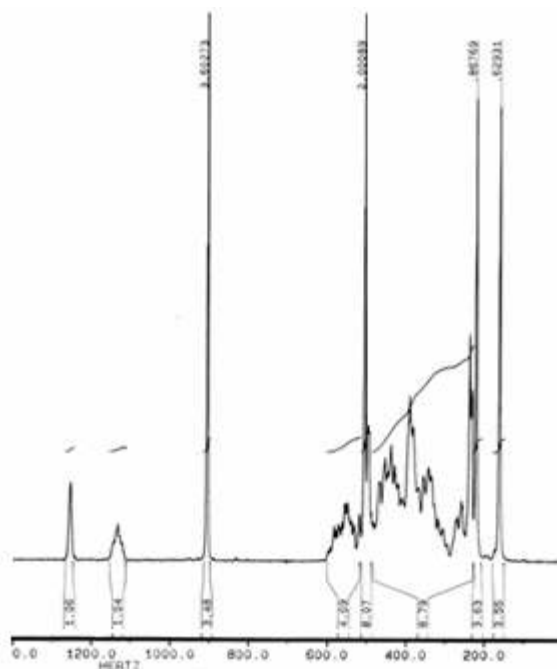
Metil deoksiholat (2, 5.00 g, 9.68 mmol) se rastvori u smeši hloroforma (18 cm<sup>3</sup>) i apsolutnog piridina (3.34 cm<sup>3</sup>, 28 mmol). Rastvoru se doda anhidrid sirćetne kiseline (3.20 cm<sup>3</sup>, 34 mmol) i reakciona smeša ostavi na sobnoj temperaturi 24 h. Po završetku reakcije, reakciona smeša se ispira 10 % HCl (3×20 cm<sup>3</sup>), potom vodom do neutralne reakcije. Organski sloj se suši anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i upari, pri čemu zaostaje sirovi metil 3 $\alpha$ -acetoksi-12 $\alpha$ -hidroksi-5 $\beta$ -holanat (3) (4.10 g, 82 %), koji se koristi bez prečišćavanja u sledećoj fazi. Za određivanje fizičkih i spektroskopskih karakteristika jedinjenje 3 se prekrystalise iz metanola. Dobijeni čisti metil 3 $\alpha$ -acetoksi-12 $\alpha$ -hidroksi-5 $\beta$ -holanat ima t.t. 162 °C. Struktura jedinjenja 3 je potvrđena spektroskopskim podacima: **IR** (KBr):  $\nu_{\max}$  3400-3550, 2920, 2880, 1735, 1450, 1380, 1250, 1030; **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0.72 (s, 3H, C18); 0.91 (s, 3H, C19); 2.0 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COO-C3); 3.68 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.05 (m, 1H, C3), 4.82 (s, 1H, C12); **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  12.40 (C18); 17.50 (C19); 72.3 (C3); 79.1 (C12); 170.0 (CH<sub>3</sub>COO-C3); 173.0 (C24).

U IR-spektaru jedinjenja 3 uočava se intenzivna traka na 1250 cm<sup>-1</sup> koja potiče od asimetričnih vibracija C-O veze acetatne grupe (Slika 3.4.).



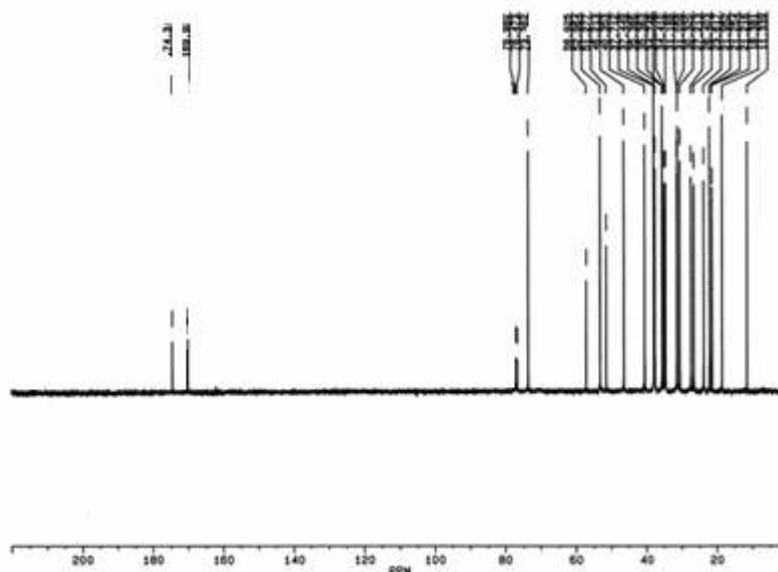
Slika 3.4. IR-spektar metil 3 $\alpha$ -acetoksi-12 $\alpha$ -hidroksi-5 $\beta$ -holanata (3).

U  $^1\text{H}$  NMR-spektru se vidi signal na 2.0 ppm koji potiče od protona metil grupe acetoksi funkcije sa C3 i signal na 3.68 ppm koji odgovara  $\text{CH}_3$  grupi metilestarske funkcije (Slika 3.5.).



Slika 3.5.  $^1\text{H}$  NMR-spektar metil  $3\alpha$ -acetoksi- $12\alpha$ -hidroksi- $5\beta$ -holanata (**3**).

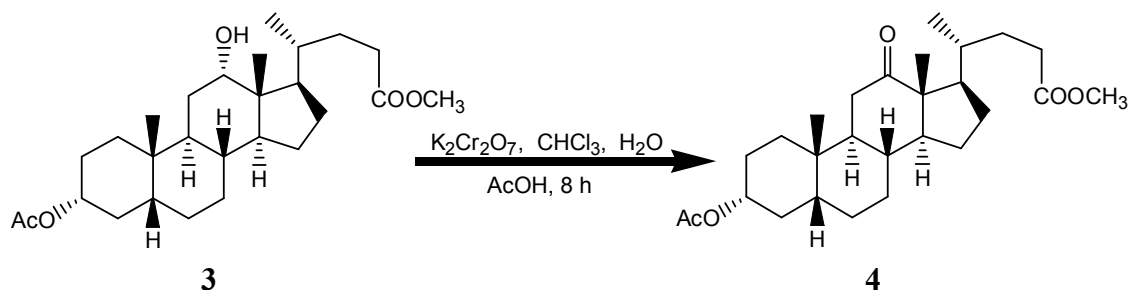
$^{13}\text{C}$  NMR-spektar potvrđuje uvedenu acetatnu funkciju porastom broja C-atoma na 27 (Slika 3.6.).



Slika 3.6.  $^{13}\text{C}$  NMR-spektar metil  $3\alpha$ -acetoksi- $12\alpha$ -hidroksi- $5\beta$ -holanata (**3**).

### 3.1.3. OKSIDACIJA METIL 3 $\alpha$ -ACETOKSI-12 $\alpha$ -HIDROKSI-5 $\beta$ -HOLANATA (3)

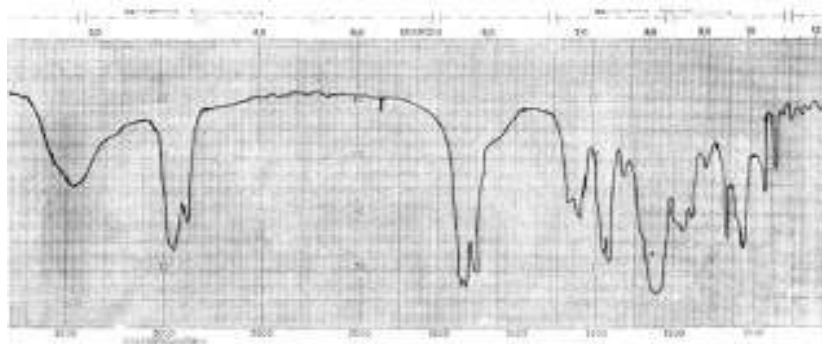
Oksidacija slobodne 12 $\alpha$ -hidroksilne funkcije metil 3 $\alpha$ -acetoksi-12 $\alpha$ -hidroksi-5 $\beta$ -holanata (3) se vrši kalijum-dihromatom u dvofaznom sistemu hloroforma, sirćetne kiseline i vode u toku 8 sati na 50 °C (Slika 3.7.).



Slika 3.7. Dobijanje metil 3 $\alpha$ -acetoksi-12-keto-5 $\beta$ -holanata (4).

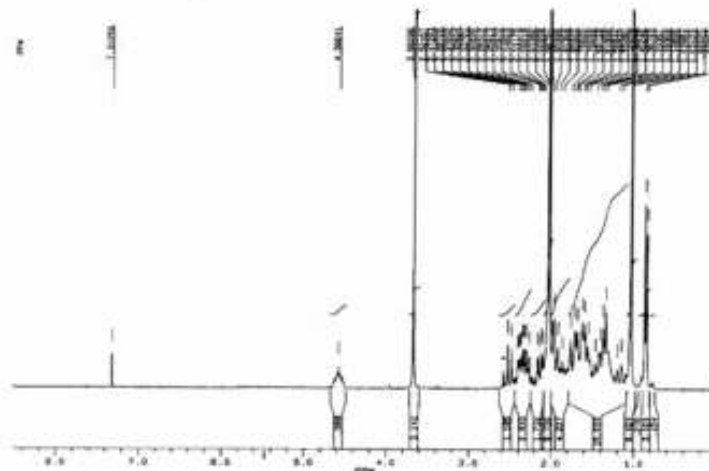
Metil 3 $\alpha$ -acetoksi-12 $\alpha$ -hidroksi-5 $\beta$ -holanat (3, 5 g, 10.7 mmol) se rastvori u smeši hloroforma (8 cm<sup>3</sup>) i glacijalne sirćetne kiseline (50 cm<sup>3</sup>). Rastvoru se dokapava suspenzija K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (5.70 g, 20 mmol) u smeši glacijalne sirćetne kiseline (50 cm<sup>3</sup>) i vode (8.0 cm<sup>3</sup>) u toku 50 minuta uz intenzivno mešanje na 50 °C. Tok reakcije se prati tankoslojnom hromatografijom na silika gelu (toluen : etilacetat = 5 : 1). Po završetku reakcije, reakciona smeša se izlije u 500 cm<sup>3</sup> ledene vode i ekstrahuje hloroformom (5×25 cm<sup>3</sup>). Organska faza se suši anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a nakon udaljavanja sušila i rastvarača dobija se sirovi metil 3 $\alpha$ -acetoksi-12-keto-5 $\beta$ -holanat (4) koji kristališe iz metanola i dobija se čist proizvod 4 u prinosu od 65 % (3.25 g), t.t. 180 °C. Struktura jedinjenja 4 je potvrđena spektroskopskim podacima: **IR** (KBr):  $\nu_{\max}$  2940, 2880, 1740, 1705, 1430, 1370, 1250; **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0.71 (s, 3H C21); 1.02 (s, 6H, C18 i C19); 2.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COO-C3); 3.65 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4.58 (m, 1H, C3); **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  11.40 (C18), 18.40 (C19), 70.5 (C3), 171.0 (CH<sub>3</sub>COO-C3), 174 (C24), 213.9 (C12).

U IR-spektaru se uočava intenzivna traka na 1705 cm<sup>-1</sup> koja potiče od valencionih vibracija karbonilne funkcije sa C12 (Slika 3.8.).



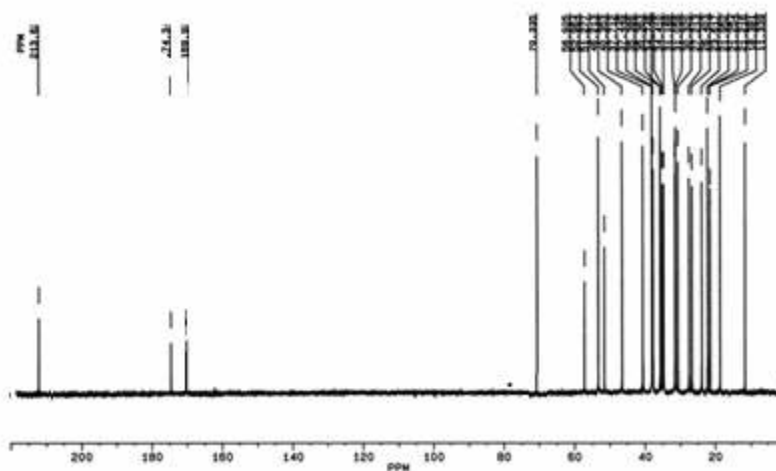
Slika 3.8. IR-spektar metil 3 $\alpha$ -acetoksi-12-keto-5 $\beta$ -holanata (4).

U  $^1\text{H}$  NMR-spektaru umesto dva signala za dve angularne metil grupe vidi se samo jedan signal na 1.02 ppm zbog uticaja karbonilne grupe sa C12. Odsustvo signala na 4.82 ppm koji potiče od protona na C12 potvrđuje izvršenu oksidaciju  $12\alpha$ -hidroksilne grupe (Slika 3.9.).



Slika 3.9.  $^1\text{H}$  NMR-spektar metil  $3\alpha$ -acetoksi-12-keto- $5\beta$ -holanata (4).

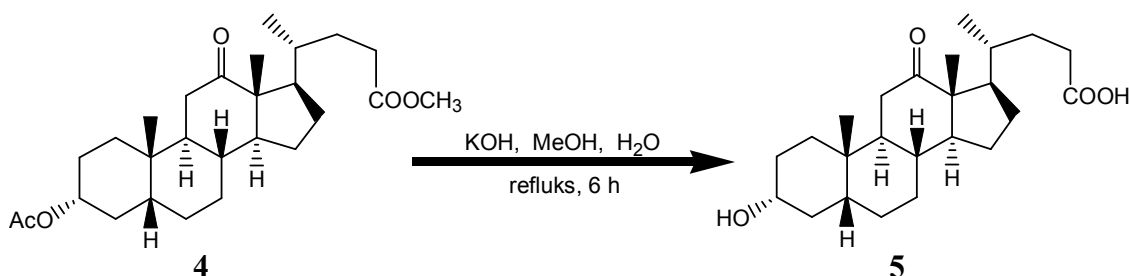
U  $^{13}\text{C}$  NMR-spektaru  $3\alpha$ -acetoksi-12-monoketodeoksiholne kiseline (4) se javlja signal na 213.9 ppm koji potiče od C12 karbonilnog ugljenika, što potvrđuje oksidaciju nezaštićene OH grupe. (Slika 3.10.).



Slika 3.10.  $^{13}\text{C}$  NMR-spektar metil  $3\alpha$ -acetoksi-12-keto- $5\beta$ -holanata (4).

### 3.1.4. HIDROLIZA METIL 3 $\alpha$ -ACETOKSI-12-KETO-5 $\beta$ -HOLANATA (4)

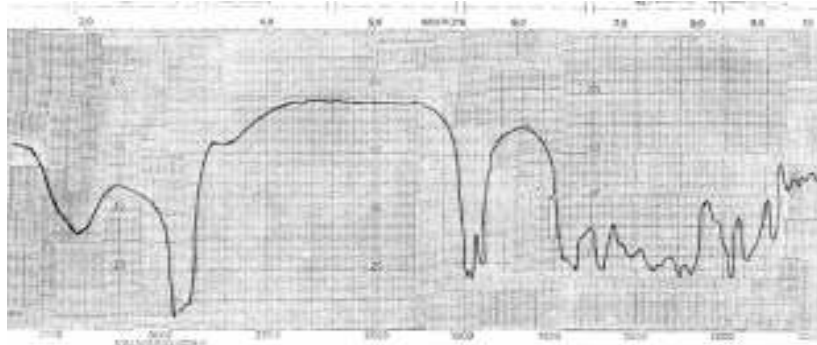
Poslednja faza sinteze 12-monoketodeoksiholne kiseline (5) je uklanjanje acetoksi grupe sa C3 i metil estarske funkcije. Hidroliza metil 3 $\alpha$ -acetoksi-12-keto-5 $\beta$ -holanata (4) se vrši kalijum-hidroksidom u metanolu u toku 6 sati na tački ključanja, pri čemu se dobija 3 $\alpha$ -hidroksi-12-keto-5 $\beta$ -holanska kiselina (5) (Slika 3.11.).



Slika 3.11. Uklanjanje zaštitne grupe sa 3 $\alpha$ -hidroksi-12-keto-5 $\beta$ -holanske kiseline (5).

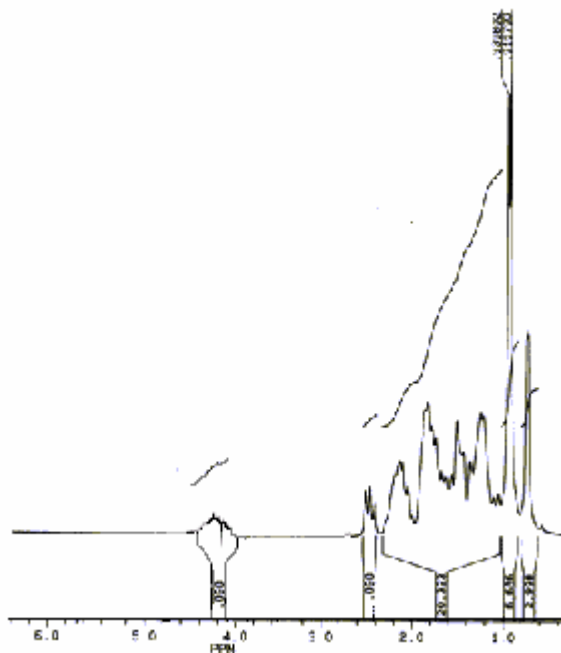
Metil 3 $\alpha$ -acetoksi-12-keto-5 $\beta$ -holanat (4, 5.00 g, 9.9 mmol) se rastvori u metanolu (30 cm<sup>3</sup>), rastvoru se doda KOH (5 g) i H<sub>2</sub>O (1 cm<sup>3</sup>). Uz intenzivno mešanje, održava se temperatura na 80°C u toku 6h. Tok reakcije se prati hromatografijom na tankom sloju silika-gela (hloroform : aceton = 7 : 1). Nakon završetka reakcije, reakciona smeša se izlije u ledenu vodu (500 cm<sup>3</sup>) uz intenzivno mešanje. Smeša se zakiseli HCl-om (10 %, 60cm<sup>3</sup>) pri čemu se taloži sirova 12-monoketodeoksiholna kiselina (5). Sirov proizvod se procedi, talog se ispira vodom do neutralne reakcije, suši na sobnoj temperaturi i prekrystalise iz metanola, pri čemu se dobija čista 3 $\alpha$ -hidroksi-12-keto-5 $\beta$ -holanska kiselina (5) u prinosu od 82.10 % (4.10 g), t.t. 167 °C. Struktura sintetizovanog jedinjenja 5 je potvrđena spektroskopskim podacima: **IR** (KBr):  $\nu_{\text{max}}$  3600, 2970, 1715; **<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 0.91 (s, 6H, C19 i C18), 4.32 (m, 1H, C3), **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub> : CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub> = 2 : 1):  $\delta$  11.40 (C18), 18.75 (C19), 174.3 (C24), 214 (C12).

U IR-spekttru 12-monoketodeoksiholne kiseline na 3600-3300 cm<sup>-1</sup> javlja se intenzivna traka koja potiče od simetričnih i asimetričnih valencionih vibracija slobodnih OH funkcija sa C3 i karboksilne funkcije (Slika 3.12.).



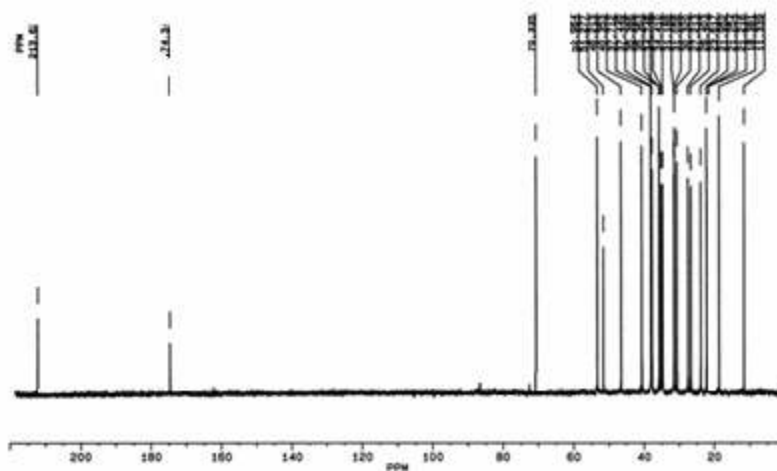
Slika 3.12. IR-spektar 3 $\alpha$ -hidroksi-12-keto-5 $\beta$ -holanske kiseline (5).

U  $^1\text{H}$  NMR-spektru 12-monoketodeoksiholne kiseline na 0.91 ppm nalaze se signali koji potiču od angularnih metil grupa. Na 4.32 ppm je signal od  $\beta$ -orjentisanog protona sa C3 (Slika 3.13.).



Slika 3.13.  $^1\text{H}$  NMR-spektar  $3\alpha$ -hidroksi-12-keto- $5\beta$ -holanske kiseline (**5**).

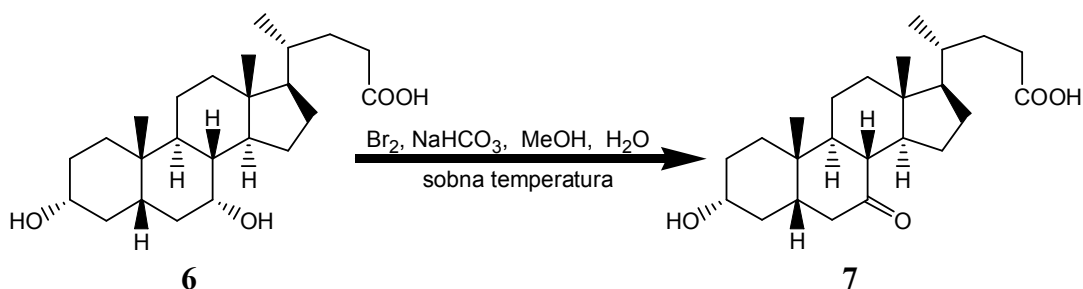
U  $^{13}\text{C}$  NMR-spektru 12-monoketodeoksiholne kiseline (**5**) se javljaju signali za 24 C atoma, što takođe potvrđuje hidrolizu estarskih grupa metil  $3\alpha$ -acetoksi-12-keto- $5\beta$ -holanata (Slika 3.14.). Signal na 214 ppm odgovara C12 karbonilnom ugljeniku.



Slika 3.14.  $^{13}\text{C}$  NMR-spektar  $3\alpha$ -hidroksi-12-keto- $5\beta$ -holanske kiseline (**5**).

### 3.2. SINTEZA 3 $\alpha$ -HIDROKSI-7-KETO-5 $\beta$ -HOLANSKE KISELINE (7-MONOKETOHENODEOKSIHOLNA KISELINA, 7)

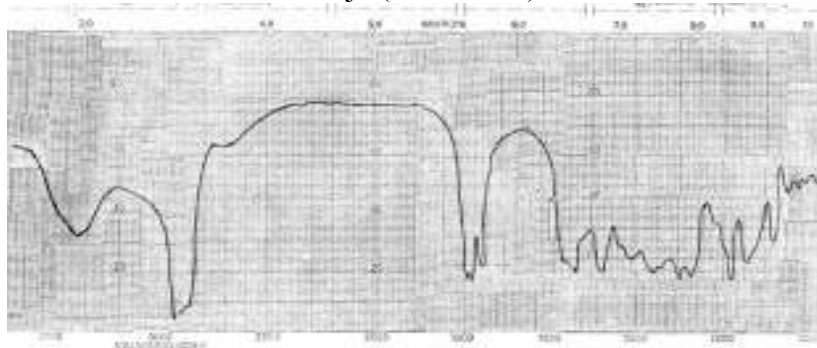
Sinteza 3 $\alpha$ -hidroksi-7-keto-5 $\beta$ -holanske kiseline (7-monoketohenodeoksiholna kiselina, 7) se zasniva na selektivnoj oksidaciji 7 $\alpha$ -hidroksilne grupe henodeoksiholne kiseline (6) u baznoj sredini sa bromom na sobnoj temperaturi (Slika 3.17.).



Slika 3.17. Sinteza 3 $\alpha$ -hidroksi-7-keto-5 $\beta$ -holanske kiseline (7).

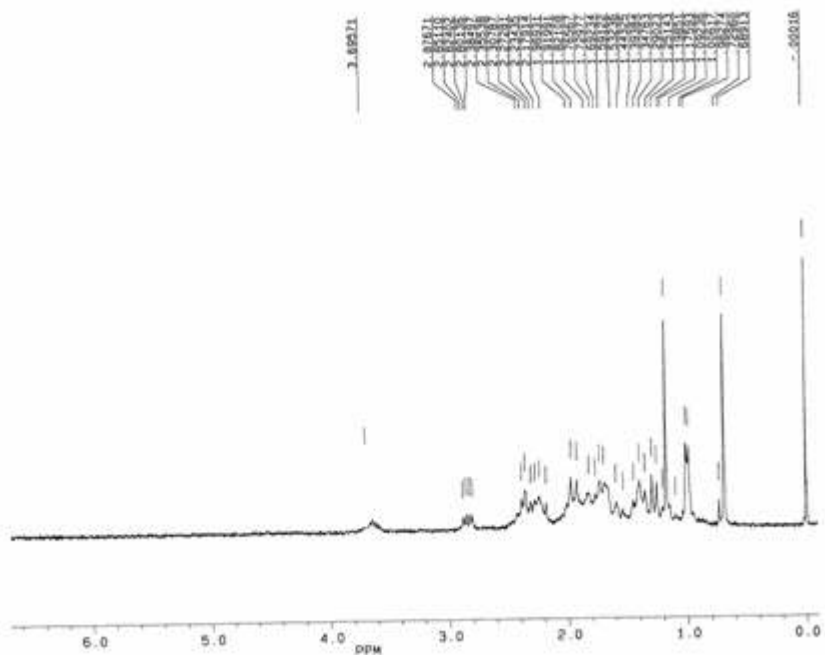
Henodeoksiholna kiselina (6, 5 g, 11 mmol) se rastvori u metanolu (60 ml), doda se vodeni rastvor NaHCO<sub>3</sub> (2.5 g natrijum-hidrogenkarbonata u 40 ml vode), a potom postepeno se dodaje brom (0.5 ml) u toku 30 minuta. Tok reakcije se prati hromatografijom na tankom sloju silika-gela (hloroform : aceton = 7 : 2). Reakciona smeša se izlije u ledenu vodu (500 ml) i sirova 7-monoketohenodeoksiholna kiselina (7) se taloži sa 10 % HCl (80 ml). Talog se cedi i ispira do neutralne reakcije, a sirova 7-monoketohenodeoksiholna kiselina se suši na vazduhu. Rekristalizacijom iz smeše metanol : voda = 1 : 0.3 dobija se čisti proizvod 7. Prinos 7-monoketohenodeoksiholne kiseline je 62 % (3.10 g), *tt* 209-211 °C. Struktura jedinjenja 7 je potvrđena spektroskopskim podacima: IR (KBr):  $\nu_{\text{max}}$  3600, 2970, 1705; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0.70 (s, 3H, C18), 1.05 (d, 3H, C21), 1.20 (s, 3H, C19), 3.69 (m, 1H, C3), <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  12.01 (C18), 17.50 (C19), 174 (C24), 213 (C7).

U IR-spektaru 7-monoketohenodeoksiholne kiseline na 3600-3300 cm<sup>-1</sup> se javlja intenzivna traka koja potiče od simetričnih i asimetričnih valencionih vibracija slobodne OH funkcije sa C3 i karboksilne funkcije (Slika 3.18.).



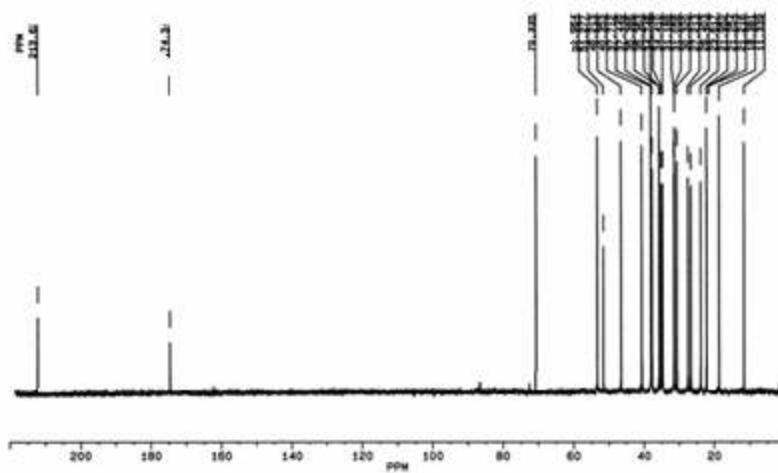
Slika 3.18. IR-spektar 3 $\alpha$ -hidroksi-7-keto-5 $\beta$ -holanske kiseline (7).

U  $^1\text{H}$  NMR-spektru 7-monoketohenodeoksiholne kiseline na 0.70 i 1.20 ppm se javljaju signali koji potiču od angularnih metil-grupa. Na 3.69 ppm je signal od  $\beta$ -orjentisanog protona sa C3, dok signal protona sa C7 nedostaje (Slika 3.19.).



Slika 3.19.  $^1\text{H}$  NMR-spektar  $3\alpha$ -hidroksi-7-keto- $5\beta$ -holanske kiseline (7).

U  $^{13}\text{C}$  NMR-spektru na 213.3 ppm se javlja signal C7 karbonilnog ugljenika, što je dokaz o izvršenoj oksidaciji OH grupe sa C7 (Slika 3.20.).

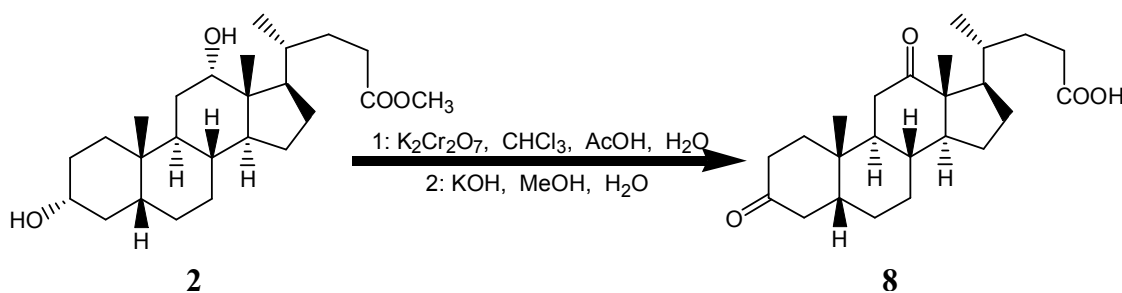


Slika 3.20.  $^{13}\text{C}$  NMR-spektar  $3\alpha$ -hidroksi-7-keto- $5\beta$ -holanske kiseline (6).



### 3.3. SINTEZA 3,12-DIKETO-5 $\beta$ -HOLANSKE KISELINE (DEHIDRODEOKSIHOLNA KISELINA, **8**)

Oksidacija 3 $\alpha$ - i 12 $\alpha$ -hidroksilne funkcije metil 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\beta$ -holanata (**2**) se vrši kalijum-dihromatom u dvofaznom sistemu hloroforma, sirćetne kiseline i vode u toku 10 sati na tački ključanja reakcione smeše (Slika 3.21.).



Slika 3.21. Dobijanje 3,12-diketo-5 $\beta$ -holanske kiseline (**8**).

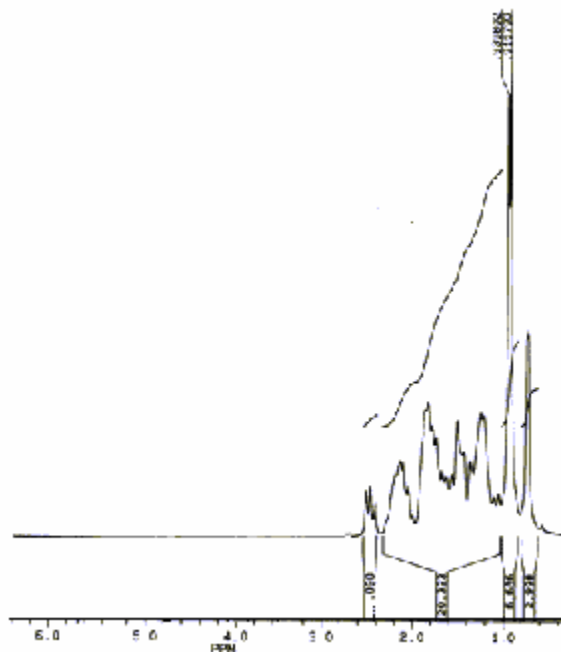
Metil 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -hidroksi-5 $\beta$ -holanat (**2**, 5 g, 12.3 mmol) se rastvori u smeši hloroforma (25  $cm^3$ ) i glacijalne sirćetne kiseline (50  $cm^3$ ). Rastvoru se dokapava suspenzija  $K_2Cr_2O_7$  (17.10 g, 50 mmol) u smeši glacijalne sirćetne kiseline (70  $cm^3$ ) i vode (12.0  $cm^3$ ) u toku 30 minuta uz intenzivno mešanje na tački ključanja reakcione smeše. Tok reakcije se prati tankoslojnom hromatografijom na silika gelu (toluen : etilacetat = 5 : 1). Po završetku reakcije, reakciona smeša se izlije u 500  $cm^3$  ledene vode i ekstrahuje hloroformom (5 $\times$ 25  $cm^3$ ). Organska faza se suši anhidrovanim  $Na_2SO_4$ , a nakon udaljavanja sušila i rastvarača dobija se sirovi metil 3,12-diketo-5 $\beta$ -holanat (**8**) (3.95 g) koji se rastvori u metanolu (25 ml), doda kalijum-hidroksid (2 g), voda (1 ml) i zagreva na tački ključanja u toku 10 h. Tok reakcije hidrolize se prati na tankom sloju silikagela (hloroform : aceton= 7 : 1). Nakon završetka reakcije, reakciona smeša se izlije u ledenu vodu (500 ml) i proizvod reakcije **8** se taloži 10 %  $HCl$  (80ml), zatim se talog ispira vodom do neutralne reakcije. Proizvod se prekrystalise iz smeše metanol : voda = 3 : 1, pri čemu se dobija čista 3,12 -diketo-5 $\beta$ -holanska kiselina u prinosu od 62.2 % (3.11 g), t.t 186 °C. Struktura jedinjenja **8** je potvrđena spektroskopskim podacima: **IR** (KBr):  $\nu_{max}$  2940, 2880, 1740, 1705, 1430, 1370, 1250;  **$^1H$  NMR** ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  0.78 (d, 3H, C21), 0.95 (s, 6H, C18 i C19),  **$^{13}C$  NMR** ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  12.01 (C18), 17.50 (C19), 177 (C24), 208.2 (C3), 213.9 (C12).

U IR-spektru 3,12-diketodeoksiholne kiseline (**8**) na 2800-3000  $cm^{-1}$  se javlja traka koja potiče od simetričnih i asimetričnih valencionih vibracija slobodne OH sa karboksilne funkcije, na 1705  $cm^{-1}$  se javlja traka koja odgovara vibracijama keto grupa. (Slika 3.22.).



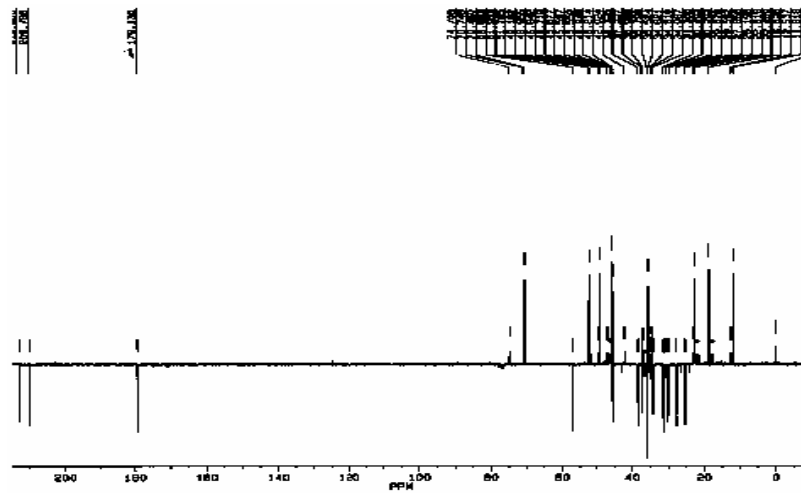
Slika 3.22. IR-spektar 3,12 -diketo-5 $\beta$ -holanske kiseline (**8**).

U  $^1\text{H}$  NMR-spektaru 3,12-diketodeoksiholne kiseline signali koji potiču od protona sa C3, C12 nedostaju, što dokazuje da je izvršena oksidacija obe hidroksilne grupe (Slika 3.23.).



Slika 3.23.  $^1\text{H}$  NMR-spektar 3,12-diketo-5 $\beta$ -holanske kiseline (**8**).

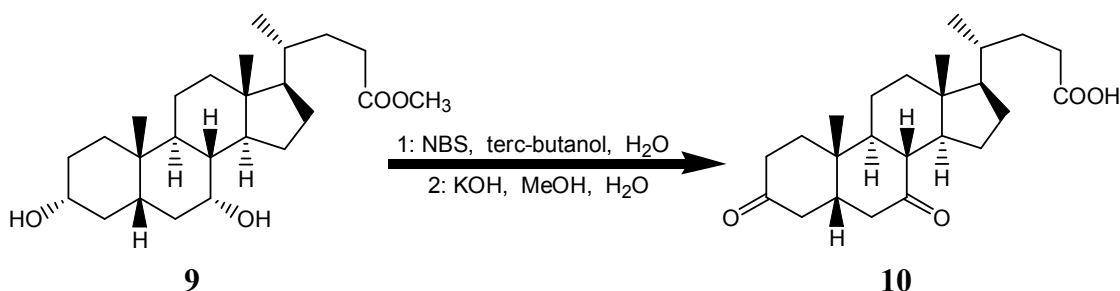
U  $^{13}\text{C}$  NMR-spektaru 3,12-diketodeoksiholne kiseline pored signala na 177 ppm (C24, COOH)) javljaju se još dva signala (208.2 (C3, C=O) i 213.9 (C7, C=O)), što potvrđuje da je izvršena oksidacija obe OH grupe deoksiholne kiseline. (Slika 3.34.).



Slika 3.24.  $^{13}\text{C}$  NMR-spektar 3,12-diketo-5 $\beta$ -holanske kiseline (8).

### 3.4. SINTEZA 3,7-DIKETO-5 $\beta$ -HOLANSKE KISELINE (DEHIDROHENODEOKSIHOLNA KISELINA, 10)

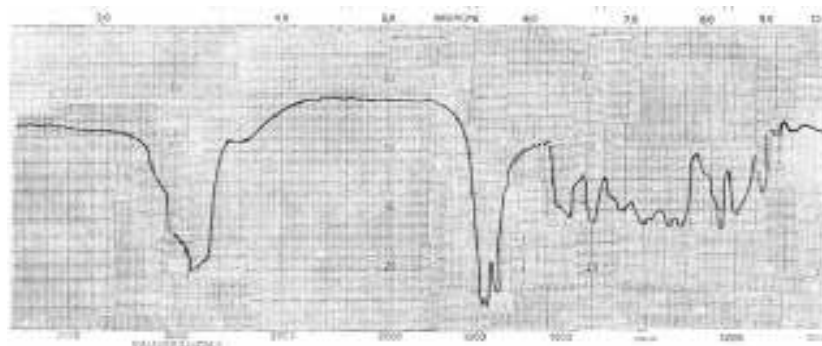
N-bromsukcinimid (NBS) u vodenom terc-butanolu oksiduje obe hidroksilne grupe metil estra henodeoksiholne kiseline (**9**), pri čemu nastaje metil estar dehidrohenodeoksiholne kiseline (**10**) (Slika 3.25.).



Slika 3.25. Sinteza 3,7-diketo-5 $\beta$ -holanske kiseline (**10**).

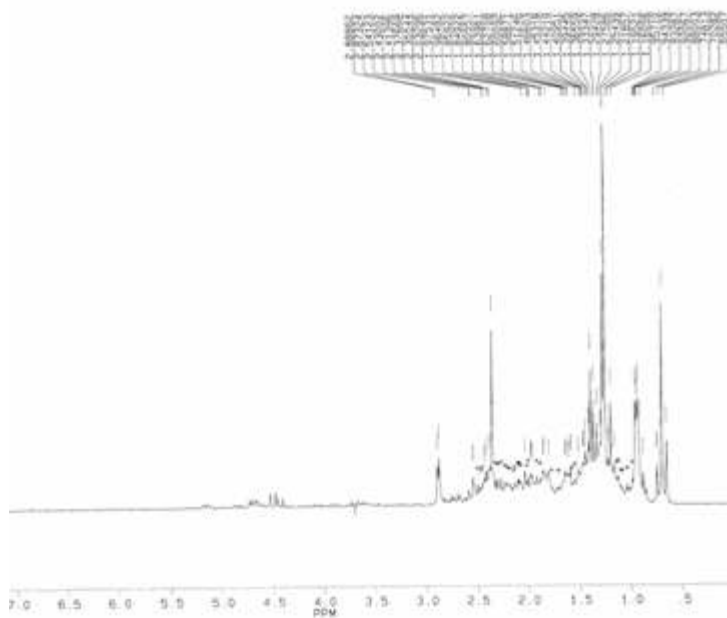
Metil 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\beta$ -holanat (**9**, 5.0 g, 12.28 mmol) se rastvori u terc.-butanolu (100 ml). N-bromsukcinimid (6 g, 45.9 mmol) se rastvori u vodi (50 ml) uz zagrevanje i mešanje i dobijeni rastvor NBS se sipa bez hlađenja u rastvor metil henodeoksiholata (**9**). Reakciona smeša se meša 48 h na sobnoj temperaturi, a nakon toga zagreva 3 sata na tački ključanja reakcione smeše. Tok reakcije se prati na tankom sloju silikagela (hlороform : aceton = 7 : 1). Nakon završetka reakcije deo terc.-butanola se upari, a metil dehidrohenodeoksiholat se ekstrahuje hlороformom (5 x 25ml) iz ostataka reakcione smeše. Hlороformski ekstrakt se suši anh. natrijum-sulfatom i upari. Sirov proizvod, žute boje, se prečišćava hromatografijom na stubu silikagela (75 g silika gela, 100 ml hlороform : aceton : = 7 : 0.1, 25 ml hlороform : aceton = 5 : 1). Metil estar dehidrohenodeoksiholne kiseline (4.15 g, 10.23 mmol) se rastvori u metanolu (25 ml), doda kalijum-hidroksid (2 g) i voda (1 ml), i zagreva na tački ključanja u toku 2 h. Tok reakcije hidrolize se prati na tankom sloju silikagela (hlороform : aceton = 7 : 1). Nakon završetka reakcije reakciona smeša se izlije u ledenu vodu (500 ml) i proizvod reakcije **10** se taloži 10 % HCl (80ml) i talog ispira vodom do neutralne reakcije. Ukoliko je talog svetlo žute boje rastvori se u 10 % natrijum-tiosulfatu na 60 °C i intenzivno meša u toku 10 sati, a potom se dehidrohenodeoksiholna kiselina taloži 10 % HCl. Proizvod se prekrystalise iz smeše metanol : voda = 3 : 1, pri čemu se dobija čista 3,7-diketo-5 $\beta$ -holanska kiselina u prinosu od 46.8 % (2.34 g), t.t 191 °C. Struktura jedinjenja **10** je potvrđena spektroskopskim podacima: IR (KBr):  $\nu_{\max}$  2940, 2880, 1740, 1705, 1430, 1370, 1250;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.65 (s, 3H, C18), 0.95 (d, 3H, C21), 1.20 (s, 3H, C19);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  12.01 (C18), 17.50 (C19), 179 (C24), 211.03 (C3), 212.4 (C7)

U IR-spekttru 3,7 -diketohenodeoksiholne kiseline (**10**) na 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$  se javlja traka koja potiče od simetričnih i asimetričnih valencionih vibracija slobodne OH grupe sa karboksilne funkcije. Na 1705  $\text{cm}^{-1}$  se javlja traka koja odgovara vibracijama keto grupa. (Slika 3.26.).



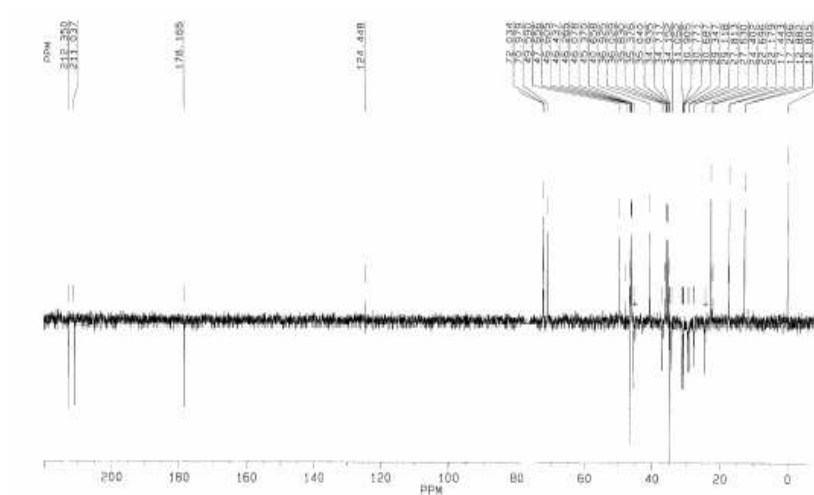
Slika 3.26. IR-spektar 3,7-diketo-5 $\beta$ -holanske kiseline (10).

U  $^1\text{H}$  NMR-spektaru 3,7-diketoheodeoksiholne kiseline signali koji potiču od protona sa C3, C7 nedostaju, što dokazuje da je izvršena oksidacija obe hidroksilne grupe (Slika 3.27.).



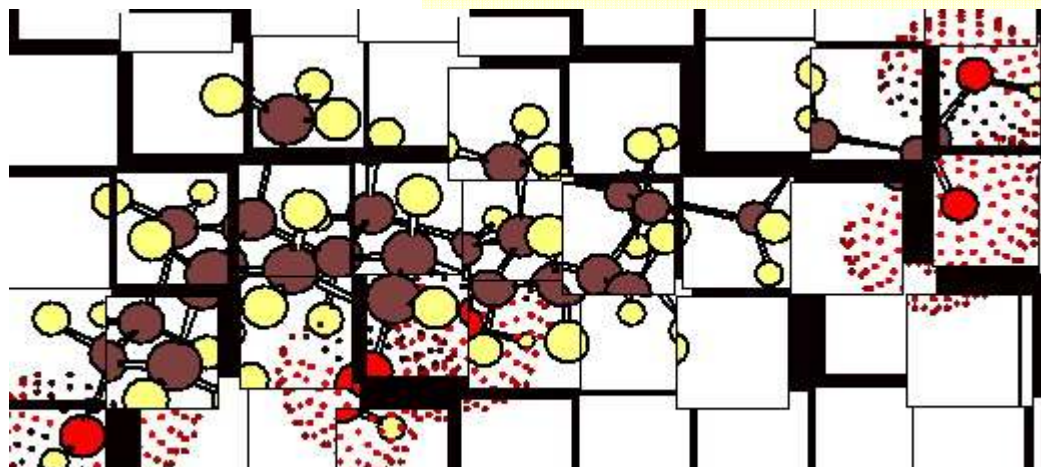
Slika 3.27.  $^1\text{H}$  NMR-spektar 3,7-diketo-5 $\beta$ -holanske kiseline (10).

U  $^{13}\text{C}$  NMR-spektaru 3,7-diketoheodeoksiholne kiseline pored signala na 179 ppm (C24, COOH) javljaju se još dva signala (211.03 (C3, C=O) i 212.40 (C7, C=O)), što potvrđuje da je izvršena oksidacija obe OH grupe heodeoksiholne kiseline. (Slika 3.28.).



Slika 3.28.  $^{13}\text{C}$  NMR-spektar 3,7-diketo-5 $\beta$ -holanske kiseline (10).

# 4. Biofizička ispitivanja



# 4.1. Ispitivanje samoasocijacije odabranih žučnih kiselina



Poznavanje temperaturne zavisnosti kritične micelarne koncentracije keto derivata holne kiseline pored fundamentalnog značaja [143,144] neophodno je i za tumačenje farmakološkog delovanja kako samih žučnih kiselina tako i za njihove interakcije sa odgovarajućim lekovima pošto se procesi u organizmu odvijaju u intervalu temperature od 36-41 °C.

Stoga jedan od ciljeva ovog rada je da se odredi temperaturna zavisnost kritične micelarne koncentracije odnosno standardne termodinamičke funkcije keto derivata holne, deoksiholne i henodeoksiholne kiseline koje do sada nisu poznata u nama dostupnoj literaturi. Takođe cilj ovog rada je i da se nađe zavisnost između standardnih termodinamičkih funkcija pre svega entropije i odgovarajućih molekulskih deskriptora ispitivanih žučnih kiselina pomoću višestruke regresije i metode glavnih komponenti.

*Gill i Wadso* [145,146] su dali korelaciju između toplotnog kapaciteta i hidrofobne površine ispitivanih amfifila, dok su *Balducci* i saradnici [147] dali korelaciju između *CMC* žučnih kiselina i njihovih hidrofobnih površina.

Pored gore navedenog cilj ovih ispitivanja je i da se odredi koncentracioni opseg prelaza monomernog oblika holne i 7-monoketoholne kiseline u oblik micela u vodenoj ( $D_2O$ ) i nevodenoj sredini ( $CDCl_3$ ).

#### 4.1.1A. UTICAJ TEMPERATURE NA KRITIČNU MICELARNU KONCENTRACIJU: TERMODINAMIČKE FUNKCIJE FORMIRANJA MICELE

Za određivanje termodinamičkih funkcija formiranja micela (micelizacija) postoji direktna i indirektna metoda [148-150]. Kod direktne metode meri se entalpija demicelizacije mikrokolorimetrom, a kod indirektno metode koristi se temperaturna zavisnost kritične micelarne koncentracije. Određivanje standardnih termodinamičkih funkcija formiranja micela žučnih kiselina indirektnom metodom zasniva se na eksperimentalnim opažanjima *Mukerjee-a* [151,152] koji je ustanovio linearnu zavisnost između  $\log CMC$  i  $\log c_{Na}$  gde je  $c_{Na}$  ravnotežna koncentracija  $Na^+$ -jona. On je pretpostavio sledeću ravnotežu između monomera anjona žučnih kiselina ( $\check{Z}K^-$ ), molekulskih agregata ( $M$  sa agregacionim brojem  $n$ ) i katjona ( $Na^+$ ):



Međutim, prema *Ruckenstein-u* [153] se ne može govoriti o formiranju micela koja bi imala isključivo jedan agregacioni broj, već postoji više vrsta pa samim tim i veći broj ravnotežnih reakcija. Koja od tih reakcija dominira zavisi od koncentracije žučnih kiselina, prema tome *Mukerjee-va* reakcija (4.1) predstavlja najverovatniju reakciju pri *CMC*, što znači da se sistem tretira kao monodisperzna faza micela sa jednim agregacionim brojem. Primenom zakona o dejstvu mase na gornju reakciju (4.1) dobija se sledeća jednačina:

$$K_m^0 = \frac{c_M}{c_{\text{ŽK}}^n c_{\text{Na}}^m} \quad (4.2)$$

$K_m^0$  predstavlja standardnu konstantu ravnoteže formiranja micela, dok je  $c_{\text{ŽK}}$  ravnotežna koncentracija monomera anjona žučne kiseline kada počinje formiranje micela, a  $c_M$  je ravnotežna koncentracija micela. Ukoliko se jednačina (4.2) uvrsti u *Gips-ovu* jednačinu koja predstavlja standardnu slobodnu energiju formiranja micela računatu po molu monomera  $\Delta G_m^0 = (RT \ln K_m^0)/n$  dobija se sledeća jednačina:

$$\frac{\Delta G_m^0}{2.303RT} = -\log \frac{c_M}{n} + \log c_{\text{ŽK}} + \frac{m}{n} \log c_{\text{Na}} \quad (4.3)$$

Prema *Tanford-u* [154] ravnotežna koncentracija monomera anjona žučne kiseline  $c_{\text{ŽK}}$  predstavlja krtičnu micelarnu koncentraciju:  $c_{\text{ŽK}} = \text{CMC}$ . Pošto je razlika između ukupne koncentracije žučne kiseline i *CMC* veoma mala, izraz  $m/n \log c_{\text{Na}}$  u jednačini (4.3) se može zanemariti. *Carey* i *Smal* [155-157] su primenili jednačinu (4.3) za eksperimentalne uslove kada je koncentracija NaCl jednaka nuli, pa su dobili jednostavan izraz za standardnu slobodnu energiju formiranja micela:

$$\Delta G_m^0 = 2.303RT \log \text{CMC} \quad (4.4)$$

Standardna entalpija građenja micela se računa prema *vant' Hoff-ovoj* [158,159] formuli:

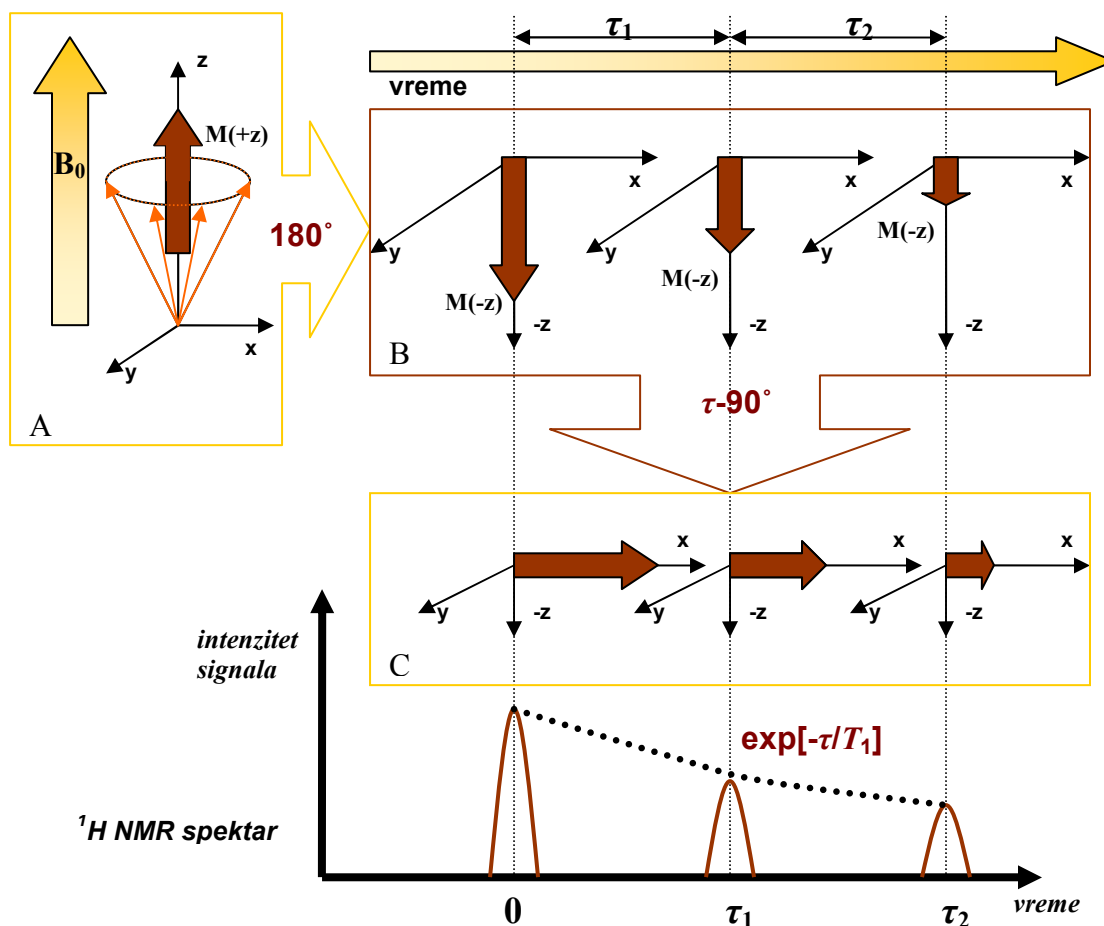
$$\Delta H_m^0 = \frac{-RT^2 d \ln(\text{CMC})}{dt} \quad (4.5)$$

Dok se standardna entropija formiranja micela računa prema dobro poznatoj *Gibs-ovoj* jednačini:

$$T\Delta S_m^0 = \Delta H_m^0 - \Delta G_m^0.$$

Do sada su termodinamičke funkcije nastajanja molekulskih agregata određeni za veliki broj amfifilnih molekula, od žučnih kiselina to su uglavnom bile holna, deoksiholna i ursodeoksiholna kiseline kao i njihovi gliko i tauro konjugati [143,155-157].  $\Delta G_m^0$  ima negativnu vrednost za svaki ispitivani amfifilni molekul bez obzira na temperaturu merenja, što znači da je formiranje micela spontan proces [158]. Na relativno niskim temperaturama standardna entropija formiranja micela je uvek pozitivna, (*entropy-driven proses*), dok na visokim temperaturama entalpija je negativna i po apsolutnoj veličini mnogo veća od entropije, (*enthalpy-driven proses*) [143,159].

#### 4.1.1B. ISPITIVANJE SAMOASOCIJACIJE HOLNE I 7-MONOKETOHOLNE KISELINE $^1\text{H}$ NMR RELAKSACIONOM METODOM



Slika 4.1. Određivanje relaksacionog vremena spin-rešetke  $T_1$ .

Na Slici 4.1.A prikazan je vektor ukupnog magnetnog momenta  $M(+z)$  koga formiraju spinski magnetni momenti u  $\alpha$  stanju jezgra vodonika u prisustvu spoljašnjeg polja  $B_0$ . Ukoliko se na uzorak deluje impulsom od  $180^\circ$  onda se vektor ukupnog magnetnog momenta zarotira za  $180^\circ$  te će imati orijentaciju duž  $-z$  ose  $M(-z)$  (Slika 4.1. B), to jest jezgra vodonika će se naći u  $\beta$  stanju. Međutim, kako su u polju  $B_0$  jezgra raspoređena između  $\alpha$  i  $\beta$  stanja prema Boltzmann-ovoj raspodeli ( $\alpha$  stanje je manje energije odnosno veće populacije, rezultanta spinskih magnetnih momentata je u pravcu  $+z$  ose) to znači da posle prestanka impulsa ( $180^\circ$ ) jezgra će težiti da se vrate iz  $\beta$  stanja (stanje više energije) u  $\alpha$  stanje (stanje manje energije) pa će se ukupni magnetni momenat koji je orijentisan duž  $-z$  ose  $M(-z)$  u toku vremena smanjivati (Slika 4.1. B). Proces se zove spin-rešetka relaksacija zbog toga što prilikom prelaza jezgra iz  $\beta$  stanja u  $\alpha$  stanje razlika energije odlazi u okolinu koja se označava kao rešetka. Smanjenje intenziteta ukupnog magnetnog momenta orijentisanog duž  $-z$  ose  $M(-z)$  je

eksponencijalnog karaktera:  $\exp[-\tau / T_1]$ ,  $\tau$  je vreme, dok je  $T_1$  parametar eksponencijalne funkcije i naziva se spin-rešetka relaksaciono vreme, koje se i određuje kod ove metode i čije određivanje su razradili *Canet* [160], *Becker* [161] i *Hanssum* [162]. Međutim kako se detektor (radiofrekventno kolo) nalazi u xy ravni da bi se  $\mathbf{M}(-\mathbf{z})$  registrovao, ovaj se vektor mora preorijentisati u xy ravan. Pošto se prati opadanje  $\mathbf{M}(-\mathbf{z})$  u funkciji vremena, posle  $180^\circ$  impulsa u određenim vremenima  $\tau$  (na Slici 1.  $\tau_1$  i  $\tau_2$  označavaju vremena posle  $180^\circ$  impulsa kada se primenjuje impuls od  $90^\circ$ ) na  $\mathbf{M}(-\mathbf{z})$  se deluje impulsom od  $90^\circ$  što rezultuje postavljanje  $\mathbf{M}(-\mathbf{z})$  u ravan detektora (Slika 4.1. C) pa se generiše slobodno indukcionni znak datog jezgra, odnosno signal u NMR spektru. Ovim je opadanje  $\mathbf{M}(-\mathbf{z})$  vektora u funkciji vremena preneto u NMR spektar, tako što opada intenzitet (površina) odgovarajućeg signala eksponencijalno sa parametrom funkcije  $T_1$  koji se određuje praćenjem opadanja površine signala u funkciji vremena. *Gouin* i *Zhu* su odredili kritičnu micelarnu koncentraciju holne kiseline, tako što su za različite koncentracije žučne kiseline  $c_{\text{ŽK}}$  odredili spin-rešetka relaksaciono vreme  $T_1$  za protone C18 ili C19 ili C21 metil grupe. Oni su *CMC* identifikovali kao infleksionu tačku u funkciji  $T_1 = f(c_{\text{ŽK}})$  [163].

## 4.1.2. MATERIJAL I METODA

### 4.1.2.1. UTICAJ TEMPERATURE NA KRITIČNU MICELARNU KONCENTRACIJU ODABRANIH ŽUČNIH KISELINA

Soli žučnih kiselina formiraju micide u vodenoj sredini, stoga se ispitivane žučne kiseline prevode u Na-soli. Ispitivane su sledeće žučne kiseline:

**Hidroksi derivati holanske kiseline:**  $3\alpha,12\alpha$ -dihidroksi- $5\beta$ -holanska kiselina (deoksiholna kiselina, DK);  $3\alpha,7\alpha$ -dihidroksi- $5\beta$ -holanska kiselina (henodeoksiholna kiselina, HDK) i  $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihidroksi- $5\beta$ -holanska kiselina (holna kiselina, HK).

**Hidroksi i keto derivati holanske kiseline:**  $3\alpha,12\alpha$ -dihidroksi-7-keto- $5\beta$ -holanska kiselina (7-monoketoholna kiselina, 7-MKH);  $3\alpha,7\alpha$ -dihidroksi-12-keto- $5\beta$ -holanska kiselina (12-monoketoholna kiselina, 12-MKH);  $12\alpha$ -hidroksi-3,7-diketo- $5\beta$ -holanska kiselina (3,7-diketoholna kiselina, 3,7-DKH);  $3\alpha$ -hidroksi-7,12-diketo- $5\beta$ -holanska kiselina (7,12-diketoholna kiselina, 7,12-DKH);  $3\alpha$ -hidroksi-12-keto- $5\beta$ -holanska kiselina (12-monoketodeoksiholna kiselina, 12-MKDK);  $3\alpha$ -hidroksi-7-keto- $5\beta$ -holanska kiselina (7-monoketohenodeoksiholna kiselina, 7-MKHDK).

**Keto derivati holanske kiseline:** 3,7,12-triketo- $5\beta$ -holanska kiselina (3,7,12-triketoholna kiselina, 3,7,12-TKH); 3,7-diketo- $5\beta$ -holanska kiselina (3,7-diketohenodeoksiholna kiselina, 3,7-DKHDK); 3,12-diketo- $5\beta$ -holanska kiselina (3,12-diketodeoksiholna kiselina, 3,12-DKDK);

#### 4.1.2.1.1. Solubilizaciona metoda

Vrednosti kritične micelarne koncentracije (*CMC*) ispitivanih žučnih kiselina se određuje na sledećim temperaturama:  $20^\circ\text{C}$ ,  $30^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C}$ ,  $50^\circ\text{C}$ ,  $60^\circ\text{C}$ ,  $70^\circ\text{C}$  i  $80^\circ\text{C}$ .

Vodonerastvorna boja iz unutrašnjosti flomastera (5 cm) se ekstrahuje etanolom (50 ml) mućkanjem u toku 60 minuta, ekstrakt se filtrira. Filtrat (30  $\mu$ l) se prenese u "micro vialu" od 5 cm<sup>3</sup> i ostavi na sobnoj temperaturi 24 sata da etanol otpari. Na dnu "micro viala" formira se sloj boje koja se suši 5 sati u sušnici na 50 °C.

Prave se vodeni rastvori (10 ogleđa) Na-soli žučne kiseline (3.5 ml) koncentracije u opsegu od 0 do 10 mM. Ukoliko se *CMC* ne nalazi u ovom opsegu pravi se nova serija rastvora od 10 do 20 mM, itd. Rastvor žučne kiseline (3 ml) se prenese u prethodno pripremljenu "micro vialu" sa bojom. Na "micro vialu" se stavi vodeni hladnjak, što sprečava isparavanje rastvora u toku temperiranja (zagrevanje na zadatoj temperaturi). Merenje u potpuno zatvorenom sistemu na višim temperaturama uticalo bi na promenu standardnog (atmosferskog) pritiska, zbog napona vodene pare. Nakon temperiranja u toku jednog sata, pomoću perilstatičke pumpe (3388 Variable-Flow Chemical Transfer Pump-Controll Company) se uzima rastvor (1 ml) kroz otvor vodenog hladnjaka. Absorbancija se meri na sobnoj temperaturi. Pošto je analizirani rastvor odvojen od hidrofobne boje, temperatura više ne deluje na solubilizaciju boje. Ona količina boje koja je na zadatoj temperaturi prešla u micelarnu fazu žučne kiseline ostaje i na sobnoj temperaturi u rastvorenom obliku, međutim rastvor žučne kiseline koji nije rastvorio boju i nakon hlađenja ostaje bezbojan, pošto je odvojen od nerastvornog filma boje na datoj temperaturi. Spektrofotometrijski (Agilent 8453) se određuje absorbancija na onoj talasnoj dužini koja odgovara apsorpcionom maksimumu korišćene boje (za Snaider flomaster je 623 nm). Slepa proba je destilovana voda. Na osnovu izmerenih vrednosti absorbancije, crtaju se krive  $A = f(c_{\text{žk}})$ , odnosno diferencijalne krive čiji maksimum odgovara vrednostima *CMC* ispitivanih žučnih kiselina.

#### 4.1.2.1.2. Direktna spektrofotometrija

Radi provere gornje metode u intervalu temperature od 20 do 40 °C koristi se metoda *Reisa* [165] (direktna spektrofotometrija) koja se zasniva na promeni absorpcionog maksimuma  $A_{max}$  ispitivanih rastvora Na-soli žučnih kiselina pri građenju micela, odnosno od promene talasne dužine  $\lambda_{max}$  na kojoj se javlja maksimum absorbancije.

Spektar se snima u opsegu od 200 do 350 nm, sa brzinom skeniranja od 800 nm/min pomoću spektrofotometra (Agilent 8453) sa dodatkom *Peltier* termostatisane ćelije. Za merenje se koriste zatvorene kvarcne ćelije sa optičkim putem od 10 mm. Zbog zatvorenih sistema merenja se vrše do 40 °C pošto bi na većim temperaturama došlo do znatnijeg odstupanja od standardnog pritiska. Rastvori žučnih kiselina su isti kao i kod metode solubilizacije. Rezultati se predstavljaju kao funkcija logaritma koncentracije žučnih kiselina i  $A_{max}$  odnosno  $\lambda_{max}$ .

#### 4.1.2.1.3. Obrada podataka

Molekulski deskriptori žučnih kiselina se dobijaju pomoću programa Chem 3D Ultra 7.0. Rezultati su statistički obrađeni pomoću programa SPSS 10.0 for Windows, koji je korišćen i za višestruku linearnu regresiju kao i za analizu glavnih komponenti (*PCA*).

#### 4.1.2.2. ODREĐIVANJE KRITIČNE MICELARNE KONCENTRACIJE 7-MONOKETOHOLNE I HOLNE KISELINE <sup>1</sup>H NMR RELAKSACIONOM METODOM

Početni rastvor Na-soli žučne kiseline (120 mM u D<sub>2</sub>O i 80 mM u CDCl<sub>3</sub>) se razblaži sa deuterijum oksidom odnosno deuterohloroformom tako da se dobijaju rastvori koncentracije od 2 mM do 120 mM za D<sub>2</sub>O odnosno 80 mM za CDCl<sub>3</sub>. Merenja se vrše na 23 °C koristeći Bruker AC-250 aparat. <sup>1</sup>H NMR spektri se snimaju sa spektralnim prozorom od 3200 Hz. Spin-rešetka relaksaciono vreme se određuje eksperimentom brze inverzije (180°-τ-90°-AQC). Površina određenog signala žučne kiseline (iz <sup>1</sup>H NMR spektra) se prati u toku devet različitih vremena τ.

### 4.1.3. REZULTATI I DISKUSIJA

#### 4.1.3.1. UTICAJ TEMPERATURE NA KRITIČNU MICELARNU KONCENTRACIJU ODABRANIH ŽUČNIH KISELINA

U ovom radu za određivanje vrednosti kritične micelarne koncentracije (*CMC*) se koristi metoda solubilizacije vodonerastvorne boje koju su *Vulliez* i *Eisele* primenili za ELISA test [164], a *Poša* sa saradnicima ju je modifikovao za opšte spektrofotometrijsko određivanje [11]. Ova metoda spada u invazivne tehnike jer se koristi "probni" molekul, koji se ugrađuje u hidrofobno jezgro micide, što delom narušava strukturu micide, smanjujući vrednost kritične micelarne koncentracije od prave vrednosti.

*Subudhi* i *Mishra* [166] su ispitivali micelizaciju Na-holata i Na-deoksiholata fluorescentom metodom uz korišćenje 1,6-difenilheksatriena (DPH) kao fluorescentne probe što takođe spada u invazivnu metodu. Oni su odredili da je *CMC* za Na-holat na 25 °C 16 mM, dok na 35 i 45 °C 17 mM što je slično sa našim rezultatima (Tabele 4.1.). Kalorimetrijsko određivanje (*isothermal titration calorimetriy*, *ITC*) kritične micelarne koncentracije, odnosno njene zavisnosti od temperature, ima prednost nad gore navedenim metodama pošto se kod *ITC* metode u istom eksperimentu određuje termodinamička funkcija  $\Delta H_m$ , odnosno kritična micelarna koncentracija zajedno sa agregacionim brojem micide [167]. Nedostatak solubilizacione metode koja se koristi i u ovom radu je u tome da se  $\Delta H_m$  određuje (računa) iz temperature zavisnosti *CMC* na osnovu vant *Hoff*-ove izobare. Zbog toga je potrebna velika preciznost u određivanju *CMC* na svakoj merenoj temperaturi. Kod *ITC* ispitivanja *Gardiel-a* i saradnika [168] vrednosti kritične micelarne koncentracije za Na-holat u intervalu temperature od 11 °C do 69 °C se kreću od 12.5 mM do 15.5 mM što su niže od vrednosti koje su određene u ovom radu. Ova razlika je verovatno posledica što su *Gardiel* i saradnici [168] merenja vršili u prisustvu NaCl (0.1 M) i pufera (pH 7.5) koji kao što je poznato smanjuju vrednosti kritične micelarne koncentracije, dok su naša merenja vršena u vodi bez pufera i soli, što je preduslov ukoliko se primenjuje *Carey*-ova i *Small*-ova [155,156] metoda određivanja termodinamičke funkcije  $\Delta G_m^0$ .

Tabela 4.1. Uticaj temperature na vrednosti CMC [mM] keto derivata holne, deoksiholne i henodeoksiholne kiseline pri  $c_{NaCl} = 0$  M. Metoda solubilizacije hidrofobne boje

Žučne kiseline	$t$ [°C]						
	20	30	40	50	60	70	80
holna kiselina	19±1.0	20±1.0	20.5±2.0	22±2.0	22±1.5	25±1.0	26±2.0
7-monoketoholna kiselina	90±3.0	94±2.5	94±2.0	97±2.0	108±3.5	118±4.0	124±3
12-monoketoholna kiselina	85±1.5	89±2.0	89±1.0	95±3.0	105±4.0	115±3.0	122±2
3,7-diketoholna kiselina	137±5.0	140±3.0	140±2.5	145±3.0	150±2.0	158±2.0	174±4
7,12-diketoholna kiselina	140±3.5	144±2.0	143±2.0	148±3.0	154±3.5	162±4.0	177±2.5
3,7,12triketoholna kiselina	200±8.0	202±6.5	202±6.0	207±3.0	212±4.5	218±6.0	245±12
deoksiholna kiselina	13.5±1.0	15±1.5	15±1.0	17±1.0	20±2.0	22±0.5	24±1.0
henodeoksiholna kiselina	11±1.0	11±1.0	12±2.0	13±1.0	15±1.5	18±1.0	19±1.0
12-monoketo deoksiholna kiselina	21±2.0	22±1.0	22±1.0	24±1.0	26±1.5	28±1.0	30±1.0
7-monoketo henodeoksiholna k.	28±1.5	29±1.0	30±1.5	32±1.5	35±1.0	37±1.5	41±2.5
3,12-diketo deoksiholna kiselina	92±3.0	96±2.5	96±3.0	99±2.0	110±1.0	120±0.5	126±2.0
3,7-diketo henodeoksiholna k.	80±2.5	84±1.5	84±2.0	89±1.0	98±3.0	111±3.5	114±1.0

n = 7

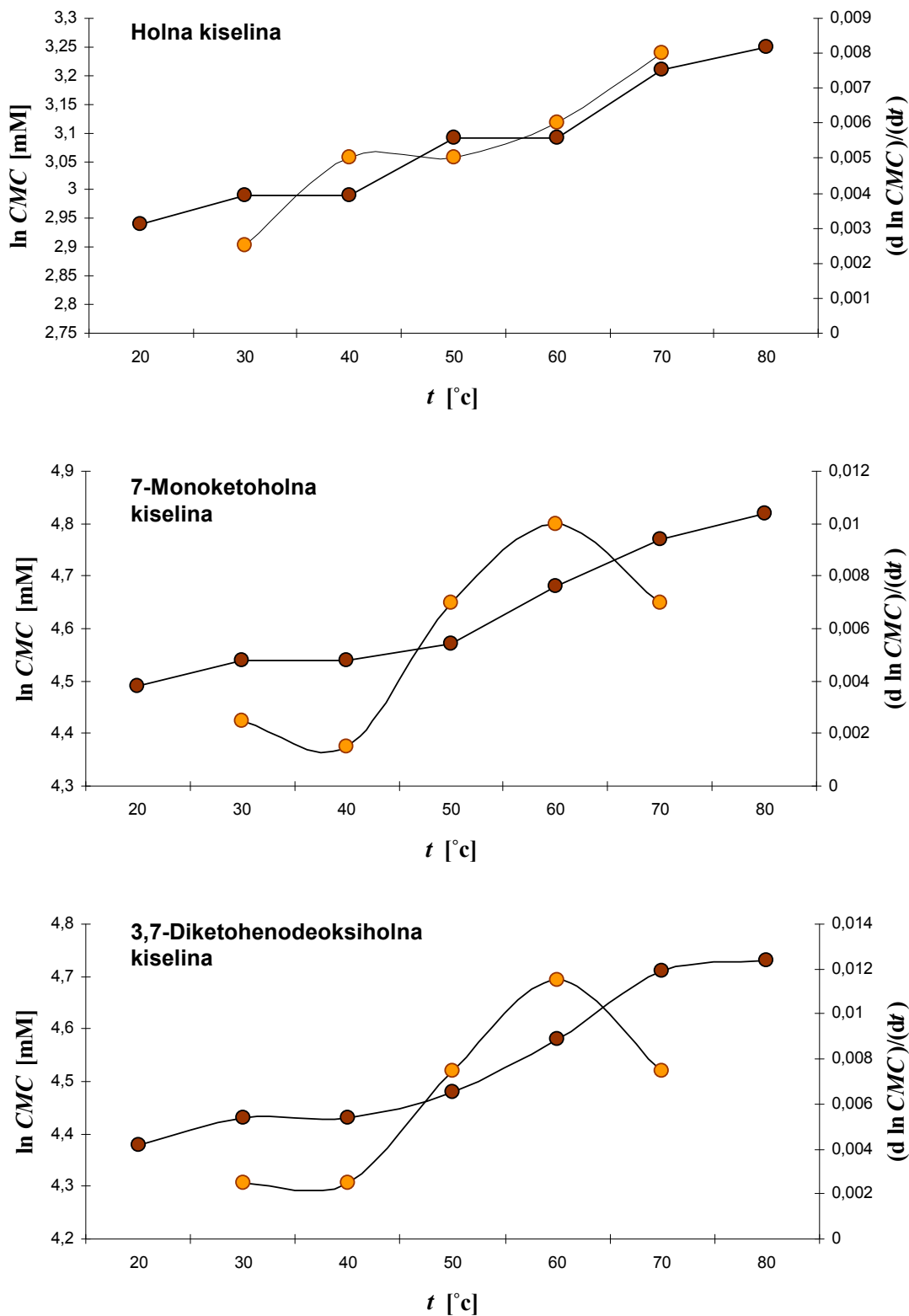
Upoređivanjem vrednosti za kritične micelarne koncentracije koje su dobivene metodom solubilizacije sa vrednostima CMC dobivene metodom direktne spektrofotometrije za keto derivate holne kiseline i same holne kiseine kao i za deoksiholnu kselinu i njene keto derivate (Tabela 4.1. i 4.2.), može se zaključiti da se one statistički ne razlikuju.

Na Slici 4.2. predstavljena je zavisnost logaritma kritične micelarne koncentracije kod nekih žučnih kiselina (holna, 7-monoketoholna i 3,7-diketohenodeoksiholna kiselina) od temperature, kao i prvi izvod funkcije koja se koristi prilikom izračunavanja standardne entalpije stvaranja miclele prema jednačini (4.5).

Tabela 4.2. Uticaj promene temperature na vrednost za CMC [mM] izabranih keto derivata holne i deoksihone kiseline pri  $c_{NaCl} = 0$  M. Metoda direktne spektrofotometrije

Žučne kiseline	$t$ [°C]		
	20	30	40
holna kiselina	18±5.0	20±3.0	20.50±3.0
12-monoketoholna kiselina	87±1.0	90±2.0	90±2.0
7,12-diketoholna kiselina	142±3.0	145±3.0	144±1.5
deoksiholna kiselina	13±2.0	14±0.5	14±1.0
12-monoketodeoksiholna kiselina	20±2.0	21±1.0	21±0.5
3,12-diketodeoksiholna kiselina	92±2.0	95±3.0	98±3.0

n = 7



Slika 4.2. Zavisnost  $\ln CMC$  od temperature  $t$  (braon kružići) i prvi izvod funkcije logaritma kritične micelarne koncentracije od temperature  $t$  (narandžasti kružići).



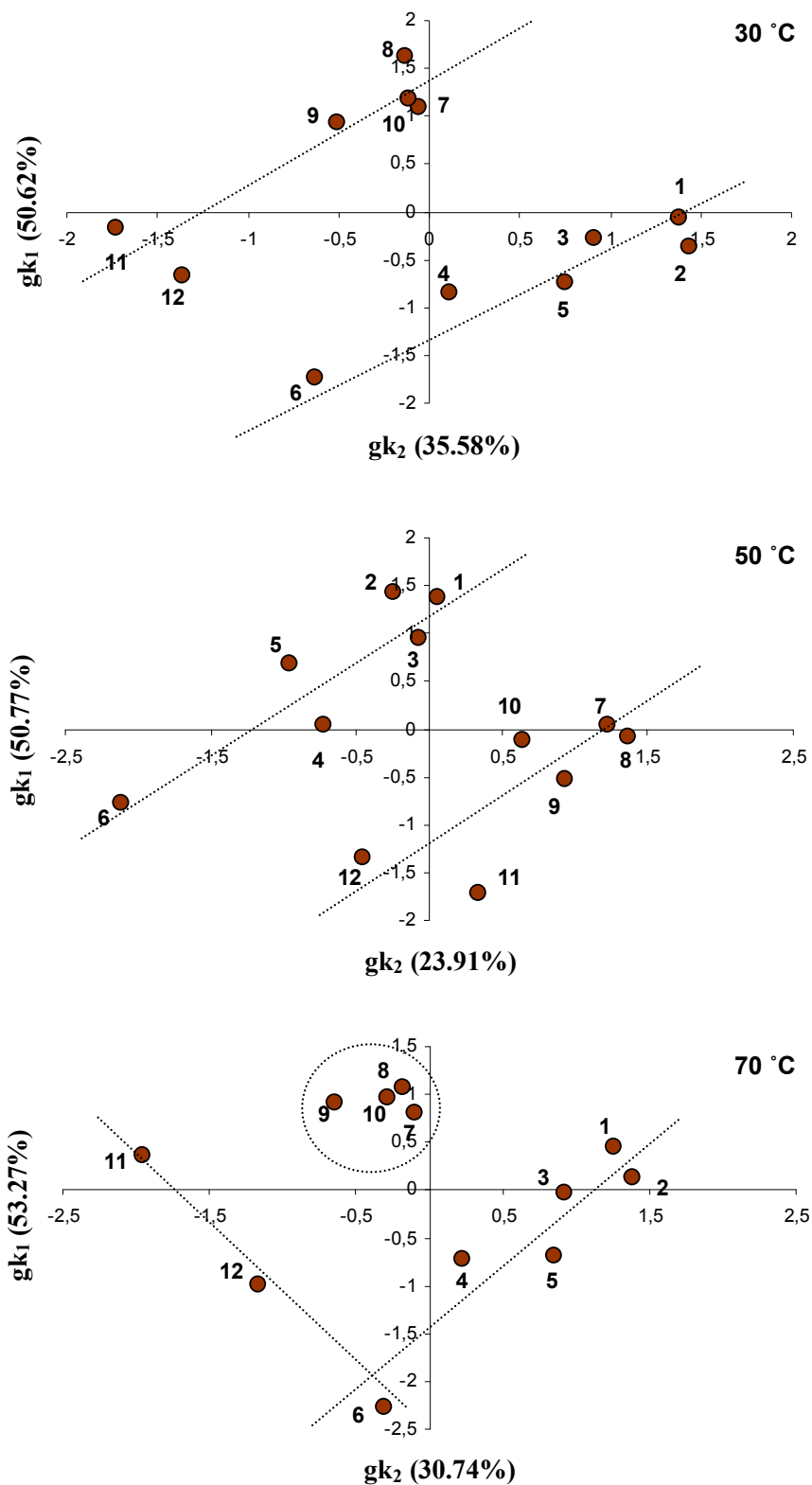
Tabela 4.3. Standardne termodinamičke funkcije formiranja micela keto derivata holne, deoksiholne i henodeoksiholne kiseline pri  $c_{NaCl} = 0 M$ 

Žučne kiseline	$t$	$\Delta G_m$	$\Delta H_m$	$T\Delta S_m$
	[°C]		[kJmol <sup>-1</sup> ]	
holna kiselina	30	-7.55	-2.90	+4.68
	50	-3.60	-3.06	+0.53
	70	-9.18	-9.10	+0.01
7-monoketoholna kiselina	30	-6.06	-1.91	+4.15
	50	-6.26	-6.07	+0.19
	70	-6.09	-6.84	-0.75
12-monoketoholna kiselina	30	-6.09	-1.52	+4.57
	50	-6.32	-7.37	-1.05
	70	-6.16	-7.33	-1.17
3,7-diketoholna kiselina	30	-4.95	-1.14	+3.80
	50	-5.18	-3.03	+2.14
	70	-5.26	-4.40	-1.58
7,12-diketoholna kiselina	30	-4.88	-0.76	+4.12
	50	-5.13	-3.03	+2.10
	70	-5.19	-6.84	-1.65
3,7,12-triketoholna kiselina	30	-4.05	-0.34	+3.67
	50	-4.23	-2.16	+2.06
	70	-4.34	-7.33	-2.99
deoksiholna kiselina	30	-10.58	-4.02	+6.56
	50	-10.94	-12.14	-1.20
	70	-8.82	-8.92	-0.10
henodeoksiholna kiselina	30	-11.36	-3.32	+8.03
	50	-11.62	-9.27	+1.65
	70	-11.45	-11.24	+0.21
12-monoketodeoksiholna kiselina	30	-8.92	-2.67	+6.25
	50	-9.24	-6.50	+2.74
	70	-9.40	-7.82	+1.58
7-monoketo henodeoksiholna kis.	30	-9.61	-1.90	+7.71
	50	-10.20	-6.93	+3.27
	70	-9.64	-7.33	+2.31
3,7-diketo deoksiholna kiselina	30	-5.90	-1.52	+4.38
	50	-6.21	-6.07	+0.14
	70	-6.05	-6.36	-0.30
3,7-diketohenodeoksi holna kiselina	30	-6.24	-1.91	+4.33
	50	-6.49	-6.58	-0.01
	70	-6.27	-7.34	-1.07

Kod svake ispitivane žučne kiseline entropija formiranja micela ( $T\Delta S_m$ ) opada sa porastom temperature, dok entalpija ( $\Delta H_m$ ) raste (Tabela 4.3.), što je u skladu sa podacima iz literatue [143,155,156]. Da bi se našla korelacija između strukture ispitivanih žučnih kiselina i  $T\Delta S_m$ , u ovom radu je prvo izvršeno njihovo grupisanje koristeći odgovarajuće molekulske dekskriptore: *Connolly*-jeva rastvaraču dostupna oblast površine (*Connolly Solvent Accessible Surface Area, CAA*); *Connolly*-jeva oblast molekulske površine (*Connolly Molecular Surface Area, CMA*); *Connolly*-jeva rastvaraču isključena zapremina (*Connolly Solvent Excluded Volumen, CSEV*); Dipol-Dipol energija (*DIPOL*); logaritam koeficijenta raspodele ( $\log P$  i  $C\log P$ ) kao i  $T\Delta S_m$  vrednosti na različitim temperaturama. Naime, prema *Tanfordu* [154,158] slobodna energija formiranja micelle  $\Delta G_m^0$  se sastoji iz dva terma. Prvi term je hidrofobna komponenta

slobodne energije za transfer molekula amfifila iz vodene sredine u hidrofobno jezgro micela. Stoga se u ovom radu kotiste deskriptori  $\log P$  i  $\text{Clog } P$  -logaritmi koeficijenta raspodele ispitivanog molekula između oktanola i vode.  $\log P$  se dobija pomoću *Crippen*-ove metode fragmentacije (*Crippen's fragmentation method*) [169] koja predstavlja takozvanu atomsku metodu bez korekcionog faktora što predstavlja nedostatak ove metode. Dok se  $\text{Clog } P$  računa prema *Leo* i *Hanch*-ovom [115] postupku fragmentacije sa korekcionim faktorima, što može da bude i prednost u odnosu na *Crippen*-ovu metodu kao i nedostatak kada su korekcionni faktori precenjeni. Stoga se u ovom radu koriste i  $\log P$  kao i  $\text{Clog } P$  za adekvatnije opisivanje koeficijenta raspodele, što je slično kada se za opisivanje polarnosti stacionarne faze u gasnoj hromatografiji koriste parametri koji se računaju na različite načine [118,170]. Nedostatak *Crippen*-ove i *Leo* i *Hanch*-ove metode je da se  $\log P$  računa za neutralni molekul odnosno da ispitivani molekuli ne smeju sadržati više od 100 atoma [124] (ispitivani molekuli u ovom radu imaju najviše 75 atoma). Drugi term - doprinos slobodnoj energiji formiranja micela - je elektrostatičke prirode, kao što je repulzivna interakcija između jonizovanih grupa ili privlačne odnosno repulzivne dipol-dipol interakcije. Stoga je za sledeći deskriptor uzeta dipol-dipol enrgija ispitivanih molekula koja se računa prema MM2 protokolu, i čije se vrednosti ne mogu uzeti kao apsolutne vrednosti, već se mogu koristiti za upoređivanje strukturno sličnih molekula, što je dovoljan uslov za metodu glavnih komponenti koji objašnjava varijaciju u uzorku [118]. Koristeći deskriptor dipol-dipol energije molekula u modelu sa ispitivanim žučnim kiselinama se naglašava značaj steroidnog jezgra u formiranju micelle (pošto dipoli C-OH i C=O veze se nalaze u steroidnom jezgru) u odnosu na bočni niz sa jonizovanom karboksilnom grupom. Međutim, kako se u ovom radu strukturne promene ispitivanih žučnih kiselina odnose na steroidno jezgro, to dipol-dipol energija adekvatno opisuje ove promene u strukturi. Oblik amfifila ima takođe važnu ulogu [158] u građenju micela, naime, on određuje veličinu solvacionog omatača što je važno sa entropijskog aspekta micelizacije (oslobađanje molekula vode iz hidratacionog sloja). Stoga su uzeti deskriptori: *CAA* i *CMA* [171], *CSEV* deskriptor koji opisuje deo molekula koji se ne može hidratirati (zbog rapavosti površine ispitivanog molekula u nivou molekula vode) [171].

Pomoću metode analize glavnih komponenti (*PCA*) za temperature 30, 50, 60 °C, dobijaju se odgovarajući **gk** vektori od kojih za grupisanje žučnih kiselina je dovoljno koristiti dva [118,132]. Sa Slike 4.3. se vidi da holna kiselina i njeni keto- derivati formiraju jednu grupu jedinjenja, dok deoksiholna i henodeoksiholna kiselina sa njihovim keto- derivatima formiraju drugu grupu žučnih kiselina. Ovo grupisanje je najizraženije na 30 i 50 °C, dok na 70 °C deoksiholna i henodeoksiholna kiselina i njihovi monoketo derivati daju jednu grupu, dok holna kiselina sa mono- i diketo derivatima formira drugu grupu. Žučne kiseline koje u svom moleklu nemaju OH grupe (3,7,12-triketoholna kiselina, 3,12-diketodeoksiholna kiselina i 3,7-diketohenodeoksiholna kiselina), na 70 °C jasno se izdvajaju od ostalih (Slika 4.3.).



Slika 4.3. Grupisanje ispitivanih molekula žučnih kselina na osnovu  $gk$  vektora 1 i 2; 1: HK; 2: 7-MKH; 3: 12-MKH; 4: 3,7-DKHK; 5: 7,12-DKHK; 6: 3,7,12-TKHK; 7: DK; 8: HDK; 9: 12-MKDK; 10: 7-MKHDK; 11: 3,12-DKDK; 12: 3,7-DKHDK.

Ukoliko se primeni višestruka linearna regresija za holnu kiselinu i njene keto derivate na 30 °C za  $T\Delta S_m(30\text{ °C})$  se dobija sledeća jednačina:

$$T\Delta S_m(30\text{ °C}) = -26.18 - 1.58\log P + 0.21C\log P - 0.12CAA + 0.22CSEV \quad (4.6)$$

$$n = 6; r = 0.9999; F = 338.1; s = 2.45 * 10^{-2}$$

Na višim temperaturama za  $T\Delta S_m(50\text{ °C})$  i  $T\Delta S_m(70\text{ °C})$  se dobijaju sledeće regresione jednačine:

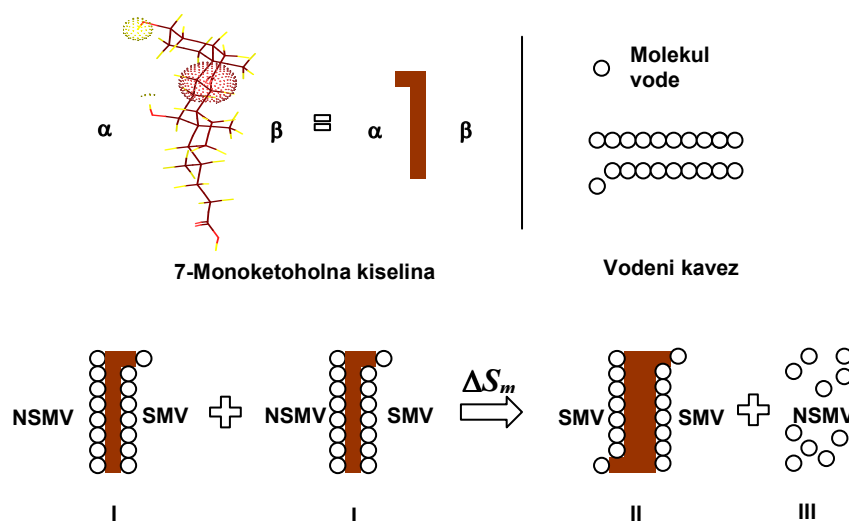
$$T\Delta S_m(50\text{ °C}) = 285.55 - 2.97\log P + 6.73C\log P - 0.78CSEV - 2.50DIPOL \quad (4.7)$$

$$n = 6; r = 0.933; F = 16.60; s = 1.06$$

$$T\Delta S_m(70\text{ °C}) = -49.05 - 1.49\log P + 1.12C\log P + 0.09CAA - 0.64DIPOL \quad (4.8)$$

$$n = 6; r = 0.9999; F = 713.39; s = 4.22 * 10^{-2}$$

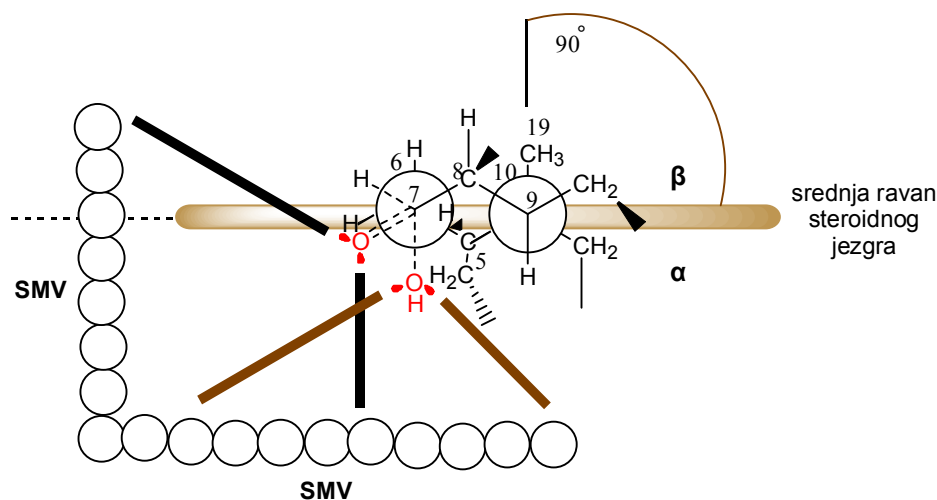
Na temperaturi od 70 °C višestruka linearna regresiona jednačina (4.8) se odnosi takođe na holnu kiselinu i njene keto derivate uključujući i 3,7,12-triketoholnu kiselinu koja na izgled formira posebnu grupu jedinjenja sa diketo-derivatima deoksiholne i henodeoksiholne kiseline (Slika 4.3. 70 °C). Međutim, visoka vrednost regresionog koeficijenta, kao i mala vrednost greške regresione jednačine (4.8), ukazuje da je moguće ovakvo grupisanje ispitivanih jedinjenja.



Slika 4.4. Shematski prikaz formiranja micela (**SMV**-stabilizovani molekuli vode i **NSMV**-nestabilizovani molekuli vode).

Iz literature [143,172,173] je poznato da na nižim temperaturama formiranje micela ima entropijski karakter koji je rezultat oslobađanja onih molekula vode koji nisu stabilizovani vodoničnim vezama (**NSMV**) i nalaze se u solvacionom omotaču sa  $\beta$

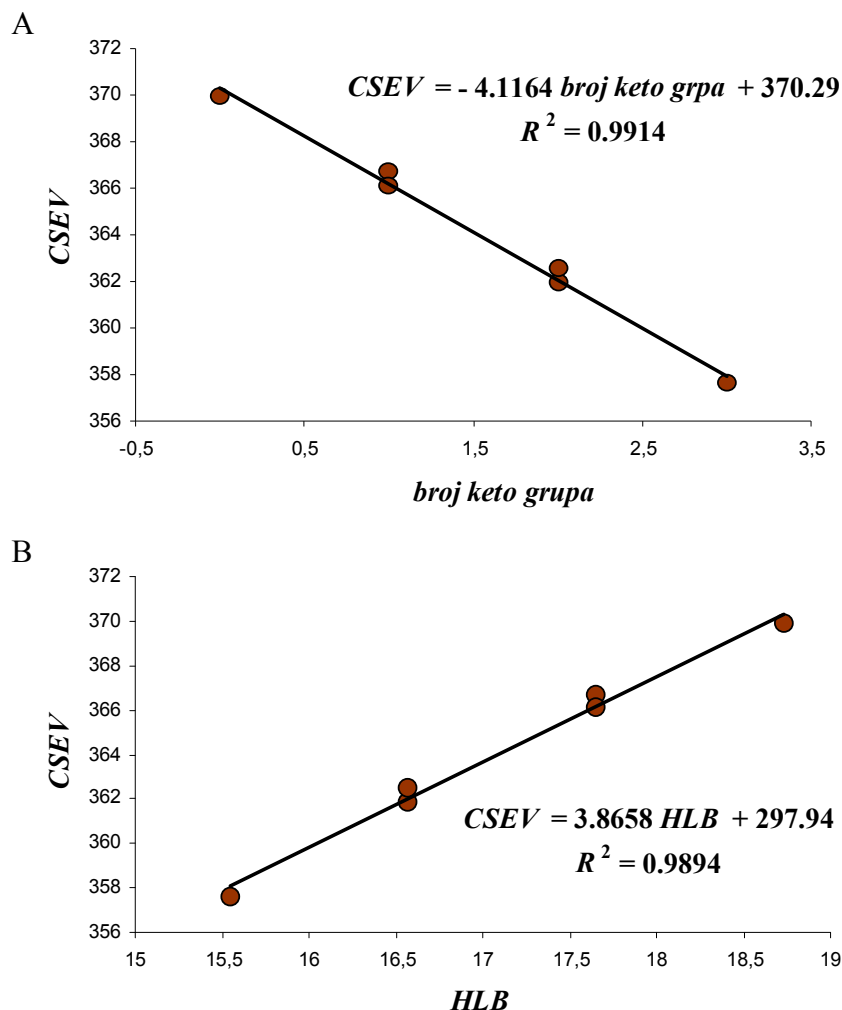
(hidrofobne) strane steroidnog skeleta monomera žučne kiseline **I** (Slika 4.4.). Kod formirane micelle **II** u solvacionom omotaču ostaju vodoničnim vezama stabilizovani molekuli vode (**SMV**), dok nestabilizovani molekuli vode iz solvacionog omotača monomera odlaze u unutrašnjost rastvora **III** (Slika 4.4.). Iz Tabele 4.2. se može uočiti da vrednosti za  $T\Delta S_m$  (30 °C) opadaju od holne kiseline prema keto derivatima tj. da supstitucija OH grupe u žučnim kiselinama sa keto grupom smanjuje entropiju nastajanja micelle  $T\Delta S_m$  (30 °C). Ovo se može objasniti pomoću orijentacije keto grupe koja ima položaj između aksijalno i ekvatrijalno orijentisane OH grupe, što znači da može da stabilizuje vodoničnim vezama molekule vode i sa  $\beta$  (hidrofobne) i sa  $\alpha$  (hidrofilne) strane steroidnog skeleta (Slika 4.5.). Ovo zatim uzrokuje da uvođenjem u molekul keto grupe opada količina nestabilizovanih molekula vode odnosno da se smanjuje količina molekula vode **III** (Slika 4.4.) koja se oslobađa prilikom formiranja molekulskih agregata, što znači da keto grupe smanjuju entropijski efekat građenja micelle. Ovo potvrđuje i regresiona jednačina (4.6) iz koje se vidi da  $T\Delta S_m$  (30 °C) ne zavisi od dipol-dipol energije ispitivanih žučnih kiselina, već od njihovog particionog koeficijenta i *Connelly*-jeve zapremine (*CSEV*) koja predstavlja zbir *van der Waals*-ove zapremine molekula i takozvane "isključene" zapremine (prostor između *van der Waals*-ove zapremine i zapremine molekula rastvarača). Ovo znači da se *Connelly*-jeva zapremina (*CSEV*) može predstaviti kao proizvod baze i visine, gde baza odgovara upravo površini molekula koja je solvatisana [171].



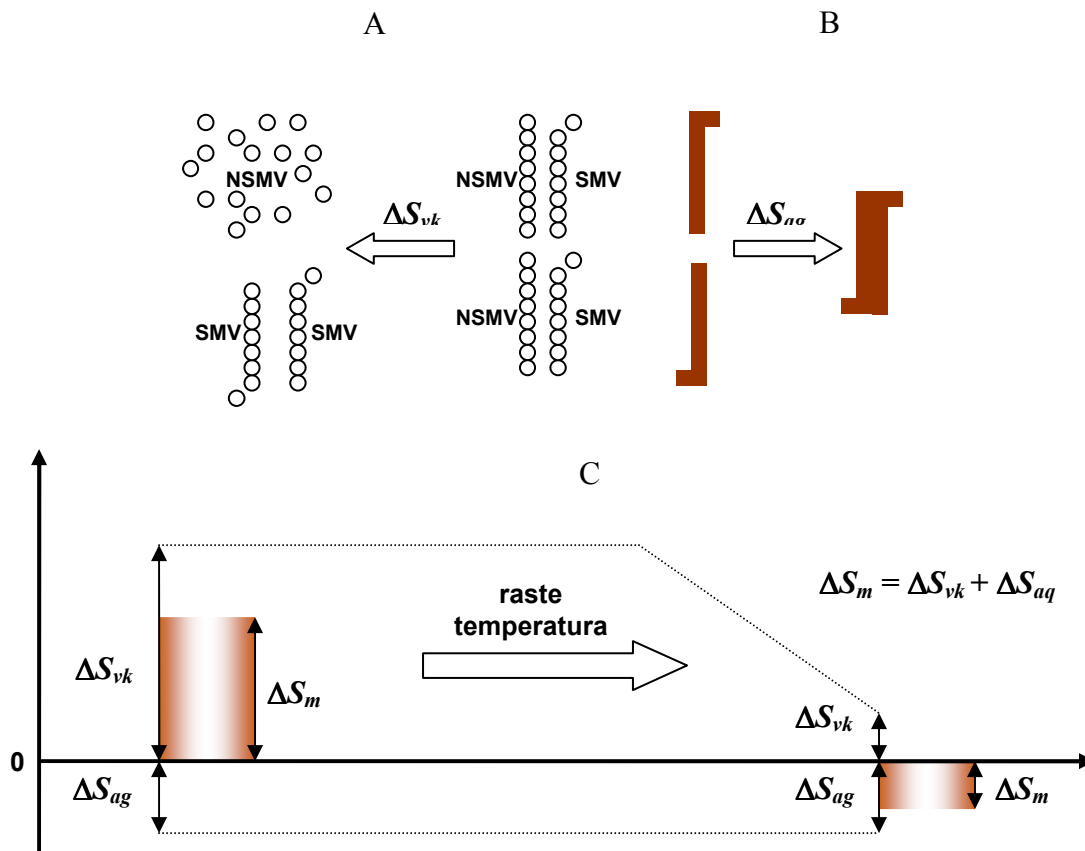
Slika 4.5. Utijac prostorne orijentacije keto grupe na građenje vodoničnih veza - stabilizacija molekula vode u solvacionom sloju (**SMV**-stabilizovani molekuli vode).

Na Slici 4.6. A predstavljena je grafička zavisnost *Connelly*-jeve zapremine (*CSEV*) od broja keto grupa kod keto derivata holne kiseline i same holne kiseline. Sa grafika se može zaključiti da se uvođenjem keto grupe u holnu kiselinu smanjuje *Connelly*-jeva zapremina nastalih keto derivata. Smanjenje *Connelly*-jeve zapremine odnosno površine molekula koja je solvatisana uzrokuje da se prilikom formiranja micelle oslobađa manji broj molekula vode **III** (Slika 4.4.), što znači da je manja i promena entropije formiranja micelle. Opadanje *Connelly*-jeve zapremine sa brojem keto grupa kod ispitivanih žučnih kiselina posledica je promene poprečnog preseka molekula, a to je posledica pomeranja kiseonika iz  $\alpha$  orijentisanih OH grupa ka steroidnom jezgru. Naime,

keto grupa je više orijentisana prema srednjoj ravni sreroidnog skeleta (Slika 4.5). Tako da na prvi pogled promene u *Connely*-jevim zapreminama odražavaju ukupnu promenu solvatacione površine molekula, a ne promenu odnosa hidrofobne i hidrofilne površine što rezultuje uvođenje keto grupe. Međutim, grafička zavisnost *Connely*-jeve zapremine (*CSEV*) od hidrofilno-lipofilnog balansa (*HLB*) ispitivanih žučnih kiselina ukazuje na njihovu veliku korelaciju (Slika 4.6. B), što znači uvođenje *Connely*-jeve zapremine u jednačinu (4.6) dovodi do zavisnosti promene vrednosti  $T\Delta S_m$  (30 °C) sa promenom ukupne površine koja se solvatiše i sa promenom odnosa hidrofilne i hidrofobne površine molekula.



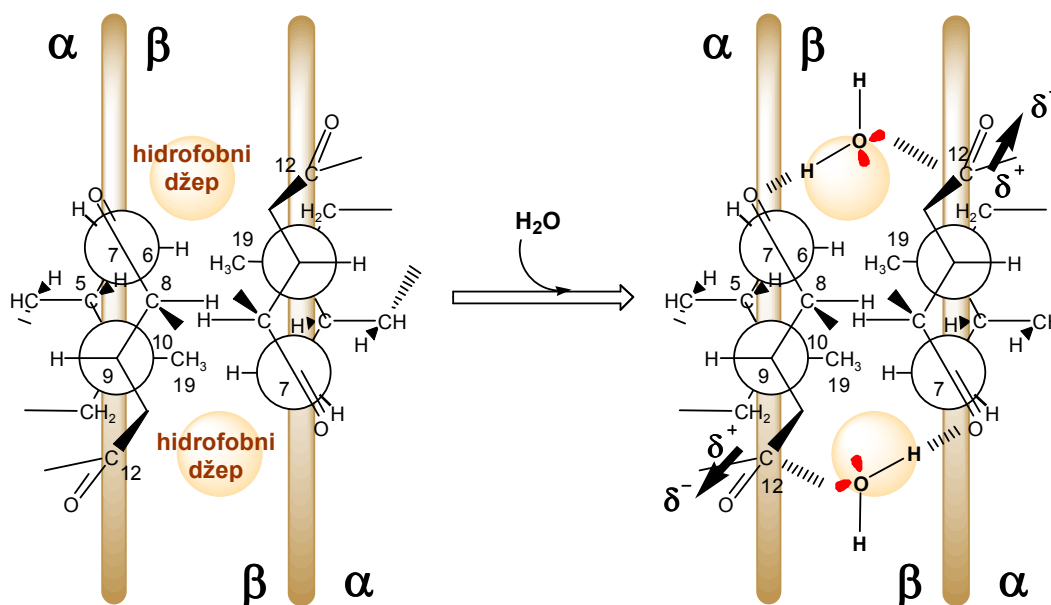
Slika 4.6. A: Grafička zavisnost *Connely*-jeve zapremine (*CSEV*) [ $\text{\AA}^3$ ] od broja keto grupa kod derivate holne kiseline. B: Grafička zavisnost *Connely*-jeve zapremine (*CSEV*) [ $\text{\AA}^3$ ] od *HLB*.



Slika 4.7. A: Oslobađanje vodoničnom vezom nestabilizovanih molekula vode (NSMV) iz solvacionog kaveza. B: Građenje molekulskog agregata iz monomera koji se nalaze unutar solvacionog kaveza-desolvatisani monomer i agregat. C: Promena udela entropije procesa A i B u ukupnoj entropiji  $\Delta S_m$  sa porastom temperature.

Na višim temperaturama promena entropije formiranja micelle  $T\Delta S_m$  (50 °C) i  $T\Delta S_m$  (70 °C) zavisi i od dipolne energije (jednačine 4.7 i 4.8), što ukazuje da je na tim temperaturama termodinamički karakter nastajanja micelle drugačiji nego na 30 °C. Regresioni koeficijent ( $r = 0.933$ ) za  $T\Delta S_m$  (50 °C) je nešto niži od regresionog koeficijenta ( $r = 0.9999$ ) za  $T\Delta S_m$  (30 °C) i  $T\Delta S_m$  (70 °C), što može da znači da se u okolini ove temperature (50 °C) menja termodinamički karakter građenja micelle iz entropijskog u entalpijski [143]. Ukoliko se formiranje micelle posmatra kao dva odvojena procesa (Slika 4.7. A i B), onda je jedan oslobađanje vodoničnom vezom nestabilizovanih molekula vode iz solvacionog kaveza koji rezultuje pozitivnu entropiju  $\Delta S_{vk}$  pri nižim temperaturama (Slika 4.7. A). Naime, sa porastom temperature molekuli vode koji nisu stabilizovani vodoničnim vezama (nestabilizovani molekul vode NSMV) dobivaju sve veću vibracionu energiju (kretanje), što umanjuje njihov entropijski doprinos prilikom prelaska u unutrašnjost rastvora. Drugi proces odgovara građenju molekulskog agregata iz monomera koji se nalaze unutar solvacionog kaveza, pošto se pri ovom procesu smanjuje broj čestice, tada on ima negativni entropijski efekat  $\Delta S_{ag}$  bez obzira na temperaturu (Slika 4.7. B). Prema Hess-ovom zakonu promena entropije

formiranja micela  $\Delta S_m$  se može predstaviti kao zbir promene entropije prilikom oslobađanja molekula vode iz solvacionog kaveza  $\Delta S_{vk}$  i promene entropije usled građenja agregata iz samih monomera  $\Delta S_{vk}$  (Slika 4.7.). Na Slici 4.7. C je prikazano kako se menja doprinos entropijskog efekta oslobađanja molekula vode iz solvacionog kaveza  $\Delta S_{vk}$  i entropijskog efekta agregacije samih monomera žučne kiseline  $\Delta S_{aq}$  u ukupnoj promeni entropije nastajanja micela  $\Delta S_m$  sa temperaturom. Dobra korelacija negativne promene entropije formiranja micela  $T\Delta S_m$  (70 °C) i dipol-dipol energije znači da povećanje dipolne energije uzrokuje veću negativnu entropiju  $\Delta S_m$  odnosno  $\Delta S_{aq}$  pošto je na ovoj temperaturi entropijski efekat posledica procesa agregacije samih monomera (Slika 4.7. B). Veća negativna entropija znači i efikasnije građenje molekulskog agregata to jest, da je proces B sa Slike 4.7. pomeren udesno.



Slika 4.8. "Fjord" efekat kod 3,7,12-triketoholne kiseline (okolina 7 i 12 keto grupa).

Mehanističko uvođenje dipol-dipol energije u regresione jednačine (4.7 i 4.8) se može objasniti sa takozvanim "fjord" efektom [174-177], koji podrazumeva da molekuli rastvarača ulaze u izvesnoj meri i u hidrofobnu unutrašnjost micela. Ovo se dešava ako se na površini micela nalazi pukotina odnosno "fjord" dovoljno velik da se molekul vode sterno uklopi. Uvođenje dipol-dipol energije u regresione jednačine  $T\Delta S_m$  (50 °C) i  $T\Delta S_m$  (70 °C) ukazuje da postoji "fjord" efekat gde molekuli vode imaju promotorni efekat na prelaz monomera u molekulski agregat. Naime, ako se pretpostavi da se na kritičnoj micelarnoj koncentraciji gradi micela tipa dimera [157], gde su karboksilne grupe monomera na suprotnim krajevima micela, tada molekuli vode u formiranom hidrofobnom džepu dipolnim interakcijama stabilizuju sistem (Slika 4.8.) i to više ukoliko je veća dipolna interakcija. Ova dodatna stabilizacija tada uzrokuje pomeranje procesa sa Slike 4.6. B ulevo, što znači da se u većoj meri smanjuje broj monomera (desolvatisanih) odnosno da je  $\Delta S_{aq}$  više negativna. U prilog "fjord" efektu može da posluži i zapažanje [166] da pri porastu temperature na krivama zavisnosti koncentracije ispitivanih žučnih kiselina od fluorescentnog intenziteta opada intenzitet fluorescencije u



saturacionom delu krive, što se objašnjava da na povišenoj temperaturi unutrašnjost micela postaje manje hidrofobna odnosno manje kruta u odnosu na stukturu micela na nižoj temperaturi.

Uvođenje dipol-dipol energije ispitivanih molekula u regresione jednačine (4.7 i 4.8) pored “fjord” efekta može se objasniti i pomoću sekundarnih micela. Sekundarne micela prema *Small*-ovom modelu [157] formiraju dihidroksi derivati žučnih kiselina pri većim koncentracijama tako što prvobitno formirane primarne micela (sa hidrofobnim jezgrom i hidrofilnom spoljašnjom stranom) međusobno grade vodonične veze. *Partay* sa saradnicima [178] u simulacijama molekularne dinamike (*Molecular Dynamics Simulation Study*) je došao do zaključka da i holna kiselina (trihidroksi derivat) gradi sekundarne micela pri većim koncentracijama. Kako jednačine (4.7) i (4.8) opisuju holnu kiselinu i njene keto derivate na 50 i 70 °C kada su povećane njihove kritične micelarne koncentracije u odnosu na vrednosti *CMC* na 20 °C (Tabele 4.1.), pa je i moguće da se iznad 50 °C i ove žučne kiseline nalaze u obliku sekundarnih micela nastalih povezivanjem primarnih micela vodoničnim vezama. Kod “fjord” efekta molekuli vode grade vodoničnu vezu odnosno stupaju u dipol-dipol interakciju sa žučnim kiselinama (Slika 4.8.), dok kod sekundarne micela žučne kiseline direktno grade međusobno vodonične veze. Kod 3,7,12-triketoholne kiseline steroidno jezgro ne sadži OH grupe pa iz tog razloga i ne grade sekundarne micela već pri povećanoj temperaturi se javlja “fjord” efekat.

I na kraju, date su višestruke linearne regresione jednačine za deoksiholnu i henodeoksiholnu kiselinu kao i njihove keto derivate:

$$T\Delta S_m (30\text{ }^\circ\text{C}) = -91.73 - 4.72\log P + 0.54CAA - 0.43CSEV - 3.28DIPOL \quad (4.9)$$

$$n = 6; r = 0.9999; F = 190.68; s = 0.13$$

$$T\Delta S_m (50\text{ }^\circ\text{C}) = -295.05 - 3.60C\log P + 0.89CAA - 0.39CSEV - 7.1DIPOL \quad (4.10)$$

$$n = 6; r = 0.995; F = 26.81; s = 0.37$$

$$T\Delta S_m (70\text{ }^\circ\text{C}) = 289.22 + 8.89C\log P + 0.41CAA - 1.48CSEV - 0.70DIPOL \quad (4.11)$$

$$n = 6; r = 0.9999; F = 148.98; s = 0.18$$

Kod druge grupe ispitivanih jedinjenja (keto derivati deoksiholne i henodeoksiholna kiseline) već na 30 °C u regresionoj jednačini (4.9) se javlja dipolna energija kao nezavisna promenljiva. Ovo je verovatno rezultat različite vrste micela od onih koje grade holna kiselina i njeni keto derivati. Prema *Small*-u [157] dihidroksi derivati žučnih kiselina kao što su deoksiholna i henodeoksiholna kiselina grade micela sa agregacionim brojem 12, pa i više, u kojima su karboksilne grupe bočnog niza susednih monomera orijentisane sa iste strane micela, koje onda kao klješta grade vodonične veze sa molekulima vode, što znači da je kod ove grupe žučnih kiselina “fjord” efekat više izražen nego kod prve grupe. *Garidel* i saradnici [168] su *ITC* metodom odredili promenu toplotnog kapaciteta demicelizacije  $\Delta C_{p_{demic}}$  za Na-deoksiholat u vodi na 25 °C ( $\Delta C_{p_{demic}} = 360 \text{ Jmol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ). Promena toplotnog kapaciteta demicelizacije je uglavnom

posledica hidratacije hidrofobne površine molekula koja dolazi u dodir sa vodom kada se micela razlaže (demicelizacija). Hidrofobna površina molekula Na-deoksiholata je oko  $8 \text{ nm}^2$  po molekulu, međutim promeni toplotnog kapaciteta demicelizacije od  $360 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$  odgovara hidrofobna površina od oko  $1.6 \text{ nm}^2$  po molekulu, što predstavlja 20% od ukupne hidrofobne površine [168,179]. Što znači, da je u *Small*-ovoj miceli sa hidrofobnim jezgrom veći deo hidrofobne površine molekula u kontaktu sa vodom, što opravdava postojanje “fjord” efekta. Šta više, na  $70 \text{ }^\circ\text{C}$   $\Delta C_{p_{demic}}$  za Na-deoksiholat je  $250 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$  što znači da sa porastom temperature raste hidrofobna površina molekula u miceli koja je izložena vodenoj sredini [149] odnosno, da micela postaje manje kompaktna (rigidna) [147]. Međutim, *Kawamura* sa saradnicima [7] u “spin-label” ispitivanjima micela Na-deoksiholata zaključuje da je struktura micela naročito rigidna, što je u suprotnosti sa ispitivanjima *Gardiela* i saradnika. Ova kontradiktornost je verovatno posledica prirode “spin-label” ispitivanja koja kao invazivna tehnika koristi probni molekul. Stoga kada hidrofobni probni molekul uđe u hidrofobni kavez micela dolazi do perturbacije u njenoj strukturi (u strukturi micela) i molekuli vode postaju isključeni, te probni molekul “vidi” hidrofobnijom-rigidnijom micelu nego što je u stvarnosti. Na temperaturi iznad  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  kada raste kritična micelarna koncentracija ispitivanih žučnih kiselina uvođenjem dipol-dipol energije molekula u regresione jednačine (4.10) i (4.11) je moguće objasniti i pojavu sekundarnih micela, primarne micela povezane vodoničnim vezama. Posebno za Na-deoksiholat je poznato formiranje sekundarnih micela. Međutim, kod diketo derivata deoksiholne i henodeoksiholne kiseline gde nedostaju OH grupe u steroidnom jezgri postojanje sekundarnih micela je malo verovatno te se verovatno kod micela diketo derivata deoksiholne i henodeoksiholne kiselina javlja “fjord” efekat.

Prema *Carey*-ovom i *Small*-ovom radu [155,156] da bi se mogla primeniti jednačina (4.4) (zavisnost *Gibs*-ove energije formiranja micelle od *CMC*) neophodno je eksperiment izvoditi u vodi bez prisustva soli odnosno pufera koji bi obezbedili katjone i time uticali na naboj micela. U našim eksperimentima pH vrednost rastvora Na-soli ispitivanih žučnih kiselina se kreće od oko 8.5 do oko 9.5 u zavisnosti od vrste žučne kiselina odnosno njene koncentracije. U pH opsegu 8.5 -9.5, pošto se primenjuju Na-soli žučnih kiselina, one su u potpunosti jonizovane, i prema *Small*-u [157] u ovom opsegu pH vrednosti se ne menja agregacioni broj njihovih micela. Primena pufera u našim eksperimentima nije moguća jer zbog relativno visokih kritičnih micelarnih koncentracija i koncentracija samog pufera bi trebala da bude velika (zbog puferskog kapaciteta), što bi onda znatno povećalo jonsku jačinu ispitivanih rastvora. U eksperimentu gde se koristi fosfatni pufer pH 7.4 koncentracije 150 mM, vrednosti *CMC* (Tabela 4.4.) su znatno smanjene u odnosu na *CMC* vrednosti koje se dobijaju u vodi bez pufera. Smanjenje *CMC* vrednosti žučnih kiselina u prisustvu 150 mM fosfatnog pufera je slično smanjenju kada se NaCl nalazi u koncentraciji između 100 i 300 mM (Tabela 4.6. i 4.7.). Ovo ukazuje da je posledica smanjenih vrednosti *CMC* rezultat povećanja koncentracije  $\text{Na}^+$  jona. Naime, ukoliko se primeni Tris pufer pH 7.4; 150 mM koncentracije smanjenja vrednosti *CMC* ispitivanih žučnih kiselina su mnogo manja (Tabela 4.5.), te su vrednosti kritične micelarne koncentracije relativno blizu onih koja su određena u vodenim rastvorima bez pufera. Ova pojava se može objasniti voluminoznošću katjona tris-(hidroksimetil)-aminometana koji je prisutan u puferu. Iz tog razloga u prostor oko karboksilatnih grupa žučnih kiselina iz micela se može smestiti manji broj ovih

voluminoznih organskih katjona nego  $\text{Na}^+$  jona, pa je i uticaj Tris pufera na naboj micela manji nego što je uticaj fosfatnog pufera. Inače na pH 7.4 od 99.0% do 99.9% molekula žučnih kiselina je jonizovano u zavisnosti od njihove strukture [78].

Tabela 4.4. Uticaj promene temperature na vrednosti CMC [mM] izabranih keto derivata žučnih kiselina na pH 7.4 u prisustvu fosfatnog pufera koncentracije 150 mM,  $\text{Na}_2\text{PO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$

Žučne kiseline	t [°C]						
	20	30	40	50	60	70	80
7-monoketoholna kiselina	37±4.0	37±2.0	38±2.0	42±3.0	52±2.5	58±3.0	64±3.5
7,12-diketoholna kiselina	68±3.0	69±2.5	69±2.0	72±1.5	76±2.5	84±2.5	87±2.0
7-monoketoheno-deoksiholna kiselina	15±1.0	15±1.0	15±1.0	16±0.5	19±1.0	22±1.0	26±2.5

n = 7

Tabela 4.5. Uticaj promene temperature na vrednosti CMC [mM] izabranih keto derivata žučnih kiselina na pH 7.4 u prisustvu Tris pufera koncentracije 150 mM

Žučne kiseline	t [°C]						
	20	30	40	50	60	70	80
7-monoketoholna kiselina	81±3.0	85±2.0	85±2.0	87±1.0	97±3.0	110±2.0	116±3.0
7,12-diketoholna kiselina	120±4.0	122±3.5	123±2.0	126±2.5	130±2.0	135±3.0	145±2.5
7-monoketoheno-deoksiholna kiselina	24±1.0	25±1.5	25±1.0	27±1.5	30±2.0	33±1.5	37±2.0

n = 7

Prilikom ispitivanja uticaja temperature na vrednosti kritične micelarne koncentracije žučnih kiselina u prisustvu elektrolita (NaCl), dobijaju se vrednosti koje ukazuju (Tabela 4.6. i 4.7.) da pri svakoj temperaturi vrednost CMC je manja u odnosu na vrednost bez prisustva soli. Ovo smanjenje je veće sa povećanjem koncentracije NaCl. Uticaj elektrolita je veći ukoliko ispitivana žučna kiselina ima više keto grupa, što je u saglasnosti sa rezultatima na sobnoj temperature [11].

Tabela 4.6. Uticaj promene temperature na vrednosti CMC [mM] izabranih keto derivata žučnih kiselina u prisustvu NaCl 0.1 M koncentracije

Žučne kiseline	t [°C]						
	20	30	40	50	60	70	80
7-monoketoholna kiselina	60±2.0	61±1.5	61±1.0	64±2.0	72±3.0	82±2.5	90±2.5
7,12-diketoholna kiselina	102±3	104±3.0	104±2.0	108±2.0	115±2.0	127±3.0	132±2
7-monoketoheno-deoksiholna kiselina	20±1.0	21±1.0	21±0.5	22±0.5	25±1.0	28±2.0	34±3.0

n = 7

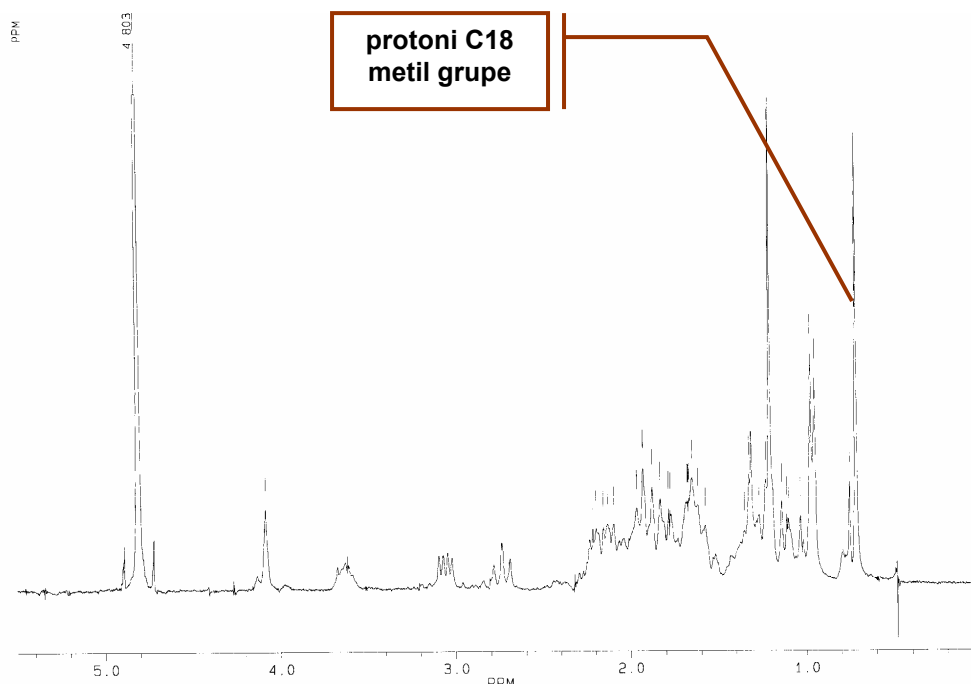
Tabela 4.7. Uticaj promene temperature na vrednosti CMC [mM] izabranih keto derivata žučnih kiselina u prisustvu NaCl 0.3 M koncentracije

Žučne kiseline	t [°C]						
	20	30	40	50	60	70	80
7-monoketoholna kiselina	31±3.0	31±2.5	32±2.5	36±1.5	41±3.5	45±2.0	54±4.0
7,12-diketoholna kiselina	55±2.5	58±1.5	58±2.0	60±1.0	71±2.50	78±4.0	85±5.5
7-monoketoheno-deoksiholna kiselina	13±1.0	14±0.5	14±0.5	15±1.0	18±0.5	23±2.0	26±1.5

n = 7

#### 4.1.3.2. ISPITIVANJE SAMOASOCIJACIJE 7-MONOKETOHOLNE I HOLNE KISELINE <sup>1</sup>H NMR RELAKSACIONOM METODOM

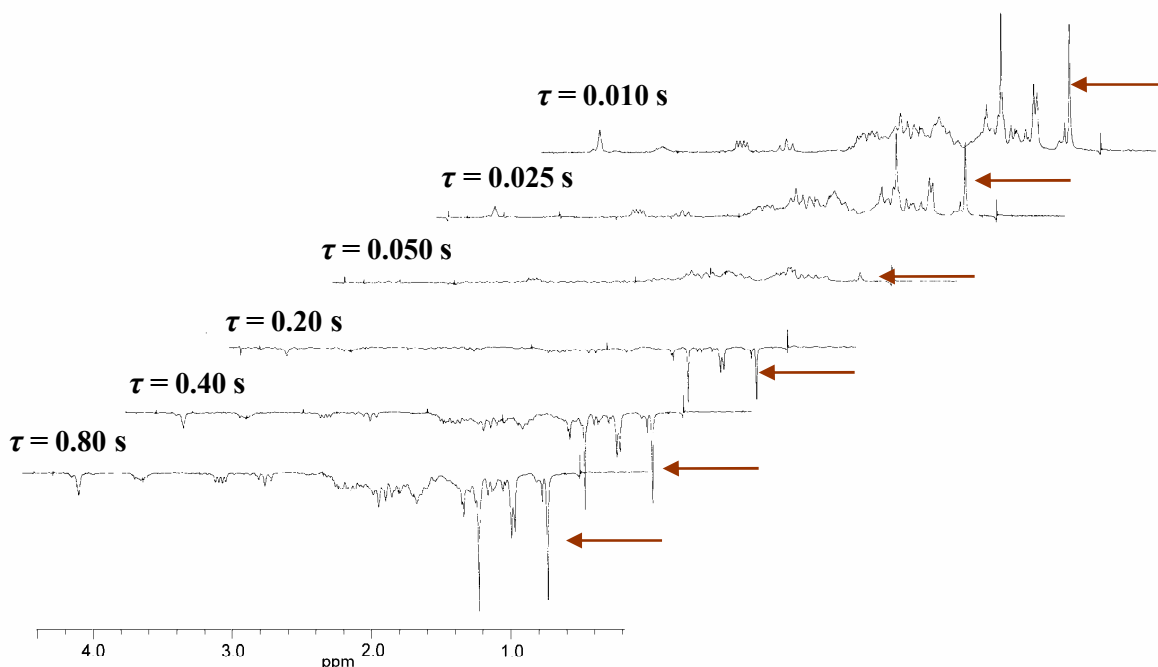
U ovom radu relaksaciono vreme  $T_1$  se određuje za singlet C18 metil grupe 7-monoketoholne kiseline na 0.74 ppm u D<sub>2</sub>O (Slika 4.9.) i na 0.70 ppm u D<sub>2</sub>O za holnu kiselinu. Određivanje relaksacionog vremena za metil grupu sa C18 je odabrano pošto pri nastajanju micela, prema *Small*-ovom modelu, žučne kiseline u miceli su spojene preko njihovih hidrofobnih površina to jest, preko β strane steroidnog skeleta, što tada dovodi do promene u okruženju angularne C18 metil grupe.



Slika 4.9. <sup>1</sup>H NMR spektar 7-monoketoholne kiseline u D<sub>2</sub>O.

Na Slici 4.10. su prikazani <sup>1</sup>H NMR spektri 7-monoketoholne kiseline u D<sub>2</sub>O pri koncentraciji od 70 mM koje se koriste za određivanje relaksacionog vremena  $T_1$  prema

metodi  $180^\circ$ - $\tau$ - $90^\circ$ -AQC [163]. Svaki spektar se snima nakon određenog vremena  $\tau$  posle primene impulsa od  $180^\circ$ , prvi spektar sa Slike 4.10 je snimljen nakon 0.010 s, dok je drugi snimljen posle 0.025 s, itd. Za ispitivanje samoasocijacije žučne kiseline neophodno je da se za svaku ispitivanu koncentraciju snimi serija spektara kao na Slici 4.10. to jest da se primeni metoda  $180^\circ$ - $\tau$ - $90^\circ$ -AQC. Na Slici 4.10. sa strelicama su označeni signali protona sa C18 ugljenika, čiji se intenziteti (površine) mere u funkciji vremena. Dok je na Slici 4.11. predstavljena promena površine signala protona sa C18 ugljenika od promene vremena nakon  $180^\circ$  impulsa, vreme  $\tau$  se meri posle prestanka delovanja impulsa od  $180^\circ$ . Svakoј tački na grafiku sa Slike 4.11. odgovara jedan spektar (integral protona sa C18 metil grupe) sa Slike 4. 10. to jest svakoj tački odgovara površina signala protona C18 metil grupe u vremenima:  $\tau = 0.010$  s;  $\tau = 0.025$  s;  $\tau = 0.050$  s;  $\tau = 0.10$  s itd.

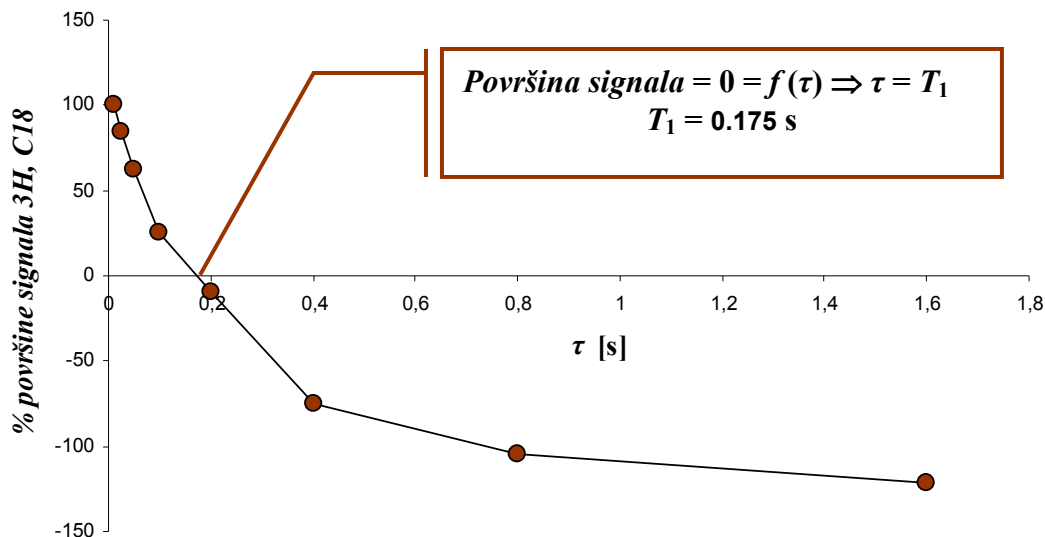


Slika 4.10.  $^1\text{H}$  NMR Spektari 7-monoketoholne kiseline (70 mM u  $\text{D}_2\text{O}$ ) snimljeni metodom  $180^\circ$ - $\tau$ - $90^\circ$ -AQC.

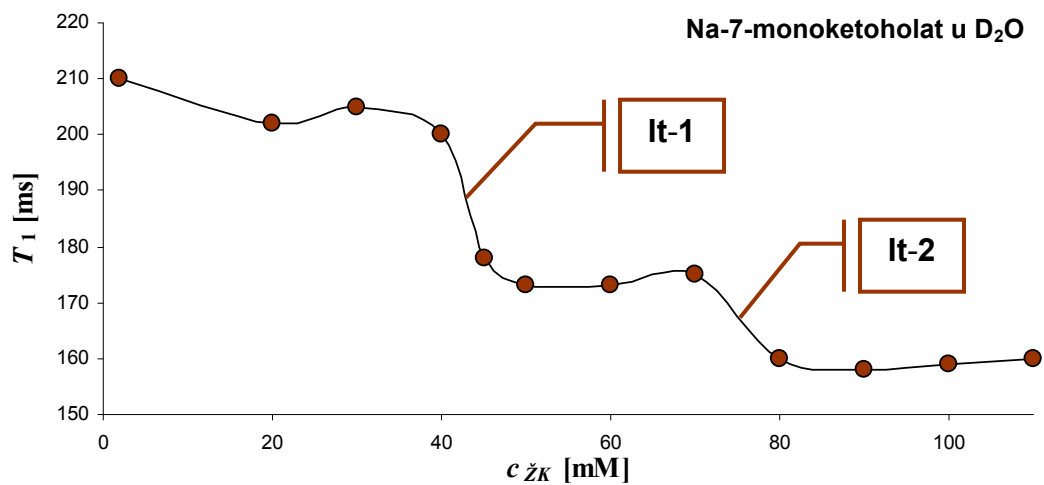
Relaksaciono vreme sa grafika sa Slike 4.11. se dobija pod uslovom kada je površina signala jednaka nuli:

$$\text{Površina signala} = 0 = f(\tau) \Rightarrow \tau = T_1$$

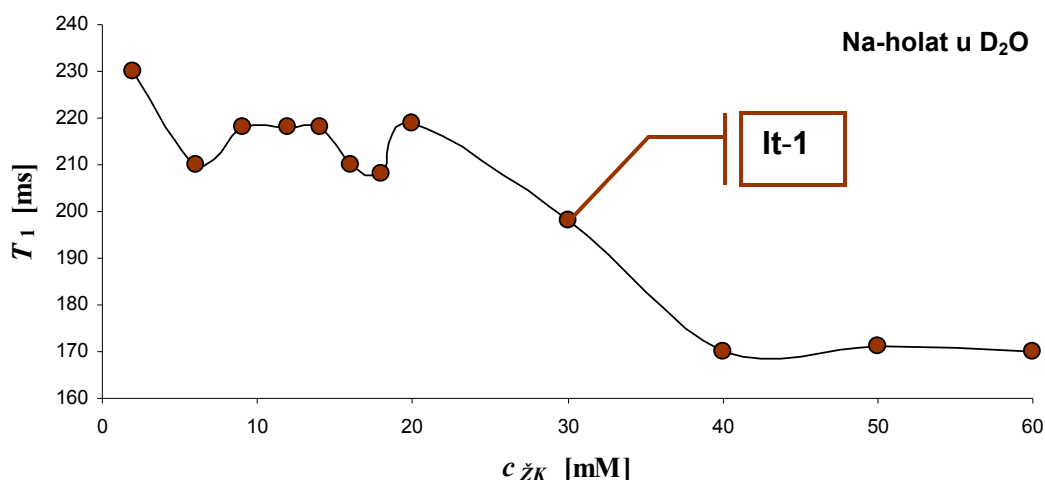
Za svaku ispitivanu koncentraciju žučne kiseline konstruiše se grafikon zavisnosti površine signala protona sa C18 ugljenika od vremena  $\tau$ , sa kojeg se onda određuje relaksaciono vreme. Prema tome, za svaku koncentraciju žučne kiseline se dobija relaksaciono vreme  $T_1$ , koje se predstavlja u funkciji koncentracije  $c_{\text{ŽK}}$  ispitivane žučne kiseline (Slika 4.12). Ukoliko u funkciji  $T_1 = f(c_{\text{ŽK}})$  postoji infleksiona tačka (nagli skok) to onda znači da je došlo do formiranja micela.



Slika 4.11. Površine signala protona C18 grupe 7-monoketoholne kiseline dobijene pri devet različitih vremena nakon primene impulsa od  $180^\circ$  (70 mM u  $D_2O$ ).

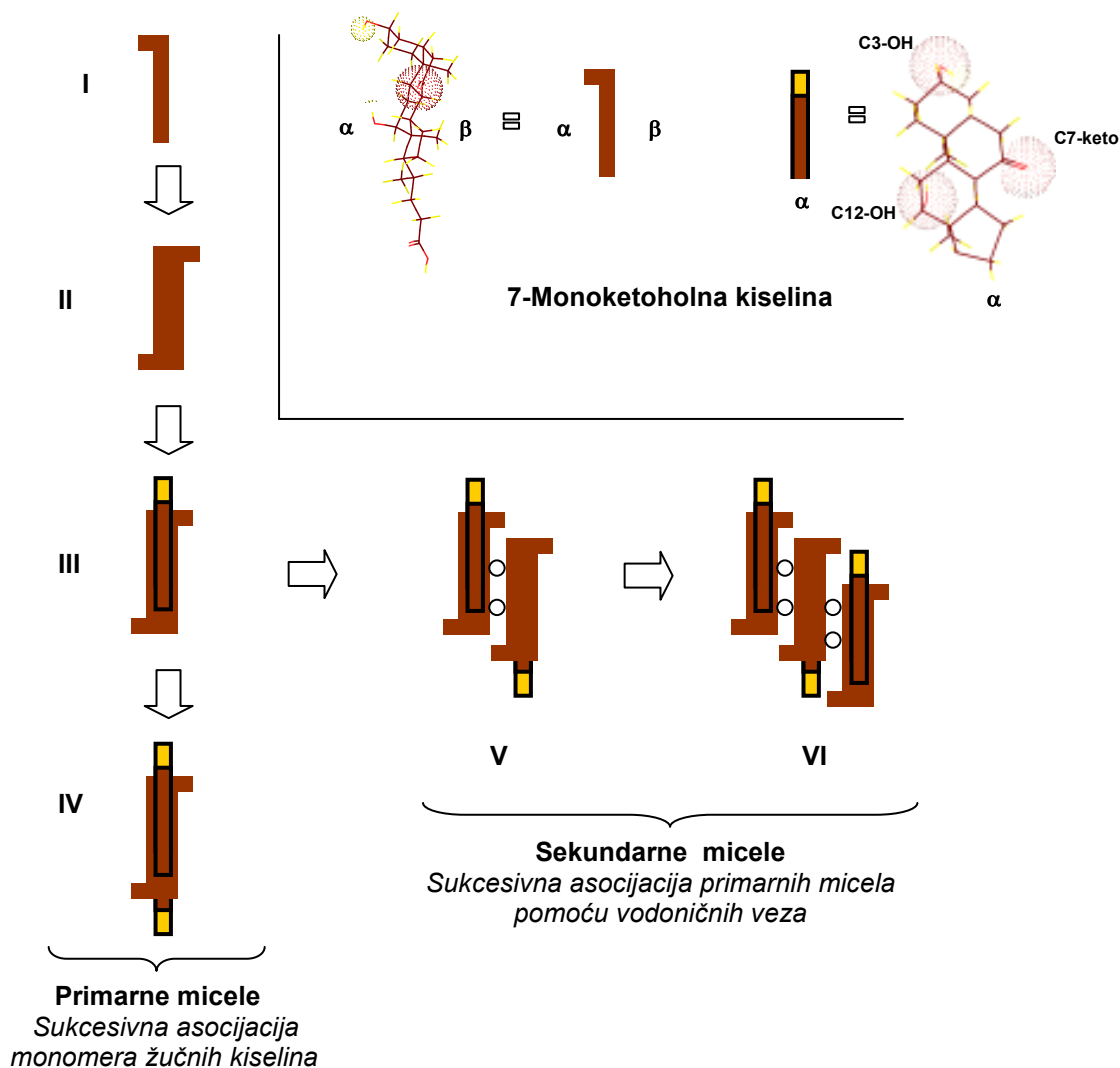


Slika 4.12. Relaksaciono vreme  $T_1$  za protone C18 metil grupe 7-monoketoholne kiseline u funkciji koncentracije.



Slika 4.13. Relaksaciono vreme  $T_1$  za protone C18 metil grupe holne kiseline u funkciji koncentracije.

Na grafiku za 7-monoketoholnu kiselinu  $T_1 = f(c_{zK})$  postoje dve infleksione tačke, jedna pri koncentraciji od 42 mM (veća promena, **It-1**, Slika 4.12.) dok druga pri koncentraciji od 75 mM (manja promena, **It-2**, Slika 4.12.), za razliku od holne kiseline koja ima samo jednu tačku infleksije pri koncentraciji 30 mM (**It-1**, Slika 4.13.). Ova razlika u  $T_1 = f(c_{zK})$  funkcijama je posledica građenja različitih micela. Naime, kod 7-monoketoholne kiseline kiseonik C7 keto grupe je pomeren prema srednjoj ravni steroidnog skeleta u odnosu na kiseonik C7 OH grupe holne kiseline (Slika 4.5.), pa 7-monoketoholna kiselina ima manju hidrofobnu površinu od holne kiseline. Primarne micelle prema *Small*-ovom modelu nastaju povezivanjem hidrofobnih površina žučnih kiselina i prema ovom modelu ukoliko neka žučna kiselina ima veću hidrofobnu površinu onda nastaju primarne micelle sa većim agregacionim brojem. Kako holna kiselina ima veću hidrofobnu površinu od 7-monoketoholne kiseline, to će sa porastom koncentracije žučne kiseline sukcesivno da se formiraju primarne micelle sa sve većim agregacionim brojem (Slika 4.14. **II-IV**), što dokazuje i razvučenost  $T_1 = f(c_{zK})$  krive holne kiseline u blizini tačke infleksije (Slika 4.13.). Nasuprot ovome, kriva 7-monoketoholne kiseline (Slika 4.12.) sa oštrijim promenama oko prve infleksione tačke upućuje da ova žučna kiselina gradi primarne micelle sa manjim agregacionim brojevima. Dok druga tačka infleksije na grafiku  $T_1 = f(c_{zK})$  7-monoketoholne kiseline upućuje na građenje sekundarnih micela (primarne micelle povezane vodoničnim vezama, Slika 4.14. **V-VI**). Pošto 7-monoketoholna kiselina ima veću hidrofилnu površinu od holne kiseline to primarne micelle ove žučne kiseline mogu graditi sekundarne micelle. Oštar skok oko druge tačke infleksije upućuje da u izgradnji sekundarnih micela učestvuju nekoliko primarnih micela.



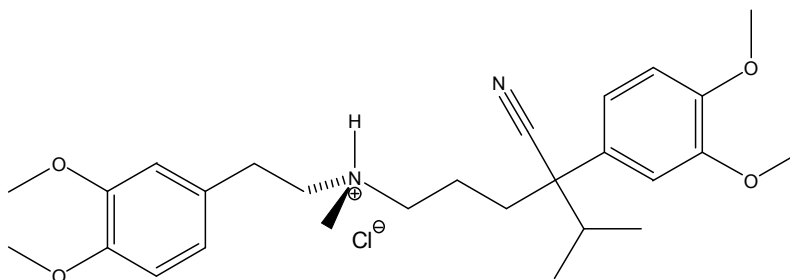
Slika 4.14. Građenje primarnih micela od monomera žučne kiseline I hidrofobnim interakcijama I-IV; građenje sekundarnih micela sukcesivnom asocijacijom primarnih micela vodničnim vezama V-VI (○ označavaju vodonične veze).

Kako je proces spin-rešetka relaksacije posledica postojanja lokalnih magnetnih polja usled fluktuirajućeg kretanja ispitivanih molekula, to znači da na fluktuirajuća kretanja molekula utiče i sredina, "rešetka", gde se molekuli nalaze. Kod građenja sekundarnih micela dolazi do opadanja fluktuirajućeg kretanja monomera iz agregata. Naime, vodonične veze između dva monomera žučne kiseline iz susednih primarnih micela u sekundarnim micelama ometaju vibraciono kretanje monomera koje je usmereno ka spoljašnjoj strani primarne micelle.

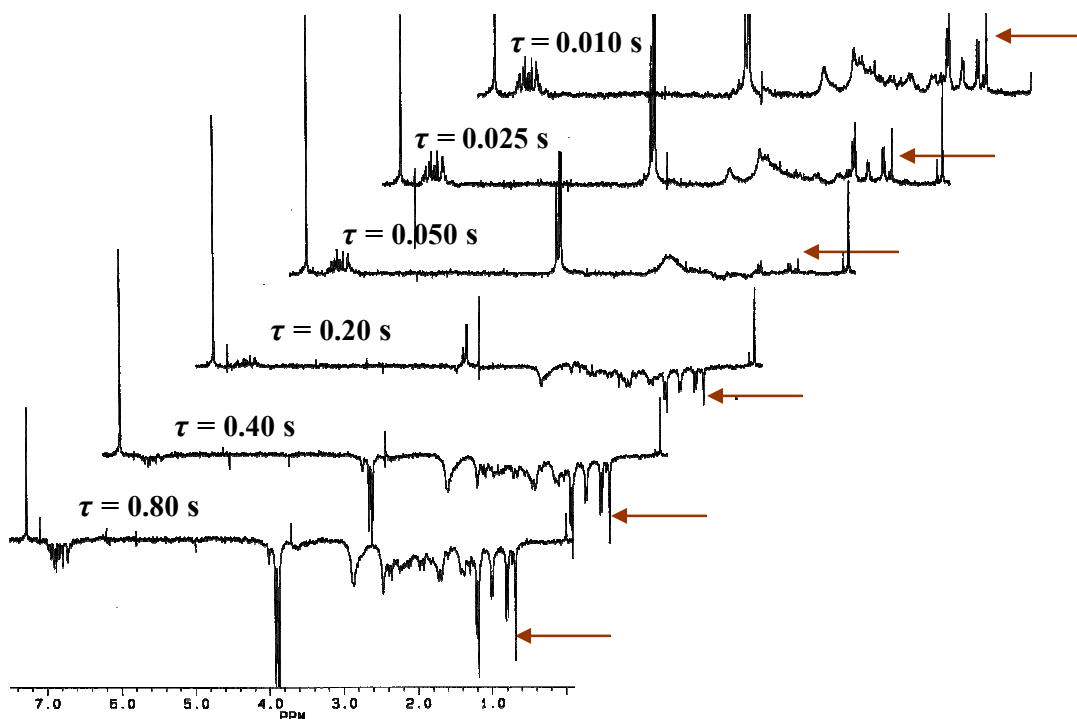
Ovom istom metodom je ispitivano nastajanje agregata 7-monoketoholne kiseline u deutrerisanom hloroformu u prisustvu verapamila 4 mM koncentracije (da bi se izbegla samoasocijacija, koncentracija verapamila na sme biti veća od 4 mM). Naime, verapamil s jedne strane je katjonski hidrofobni lek, iz *Schvartz*-ovog rada je poznato da katjonski hidrofobni lekovi stupaju u interakcije sa micelama žučnih kiselina [12], s druge strane



verapamil u svojoj strukturi ima dve 2,3-metoksifenilne grupe koji su razdvojene sa "spejserom" (Slika 4.15.) od sedam atoma, stoga ovaj lek ima fleksibilnu strukturu koja omogućuje istovremeno građenje vodoničnih veza sa dva molekula žučne kiseline (predhodno ispitivanje na osnovu *Dreding*-ovih molekulskih modela). Iz tog razloga je pretpostavljeno da verapamil može da ima promotorni efekat na nastajanje sekundarnih micela žučnih kiselina. Inače, verapamil se koristi kao lek kod srčanih aritmija jer se vezuje za potencijal zavisne Ca-kanale (HVA-Ca) i time sprečava sprovođenje električnih impulsa u srčanom mišiću - antiaritmik.

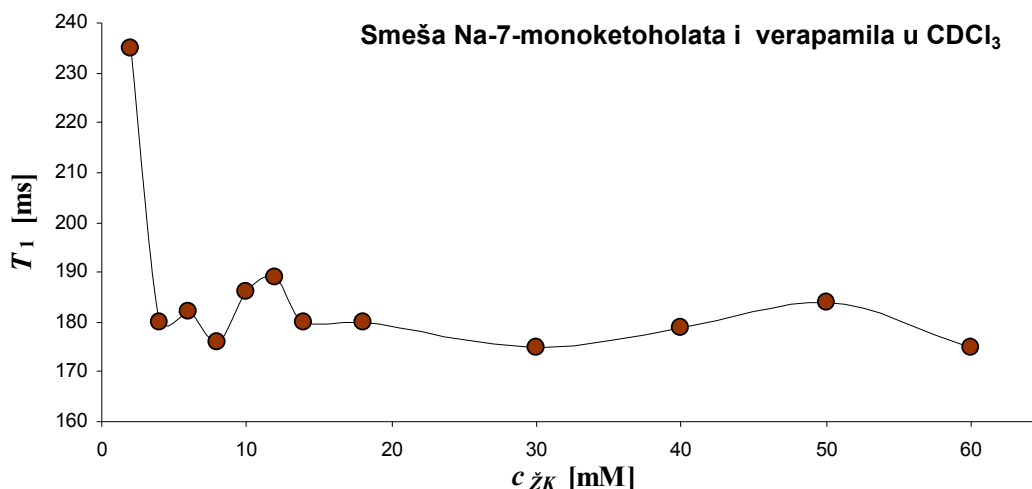


Slika 4.15. Verapamil hidrohlorid, 5-[2-(3,4-dimetoksifenil)-1-metilaminitil]-(3,4-dimetoksifenil)-2-izopropilvaleronitril.



Slika 4.16.  $^1\text{H}$  NMR spektri smeše 7-monoketoholne kiseline (60 mM u  $\text{CDCl}_3$ ) i verapamila (4 mM), koji su dobiveni metodom  $180^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ\text{-AQC}$ . Svaki spektar je snimljen u različitom vremenu  $\tau$ , nakon inverzije ( $180^\circ$ ).

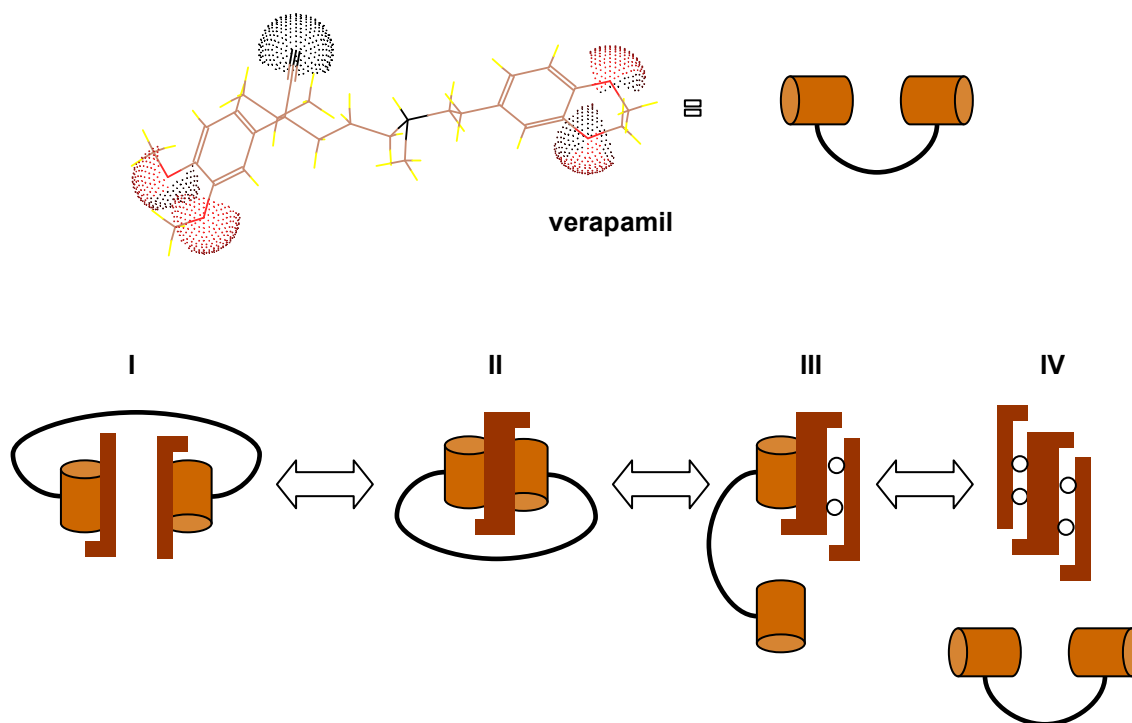
Na Slici 4.16. dati su  $^1\text{H}$  NMR spektri smeše 7-monoketoholne kiseline (60 mM) i verapamila (4 mM) koji su određeni metodom  $180^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ\text{-AQC}$ . Na Slici 4.17. predstavljena je funkcija koncentracione zavisnosti spin-rešetka relaksacionog vremena  $T_1$  protona C18 metil grupe 7-monoketoholne kiseline kada se nalazi sa verapamilom u deuterisanom hloroformu. Sa grafika Slike 4.17 se vidi da posle koncentracije žučne kiseline od 2 mM nastupa nagli skok, što upućuje na promenu fluktuirajućeg kretanja 7-monoketoholne kiseline. Ovo se može objasniti *Oakenful*-ovim modelom nastajanja micide žučne kiseline prema kojem prvo dolazi do izgradnje micide gde su monomeri žučne kiseline povezani vodoničnim vezama (primarne micide), a pri daljem povećanju koncentracije dolazi do asocijacije primarnih micela pomoću hidrofobnih interakcija [80-82]. Stoga, 7-monoketoholna kiselina već pri koncentraciji od 2 mM u  $\text{CDCl}_3$  postoji kao agregat gde su monomeri povezani vodoničnim vezama, dok pri većoj koncentraciji od 2 mM dolazi do formiranja hidrofobnih sekundarnih micela (*Oakenful*-ov model). *Partay* je sa saradnicima pomoću simulacije molekulske dinamike potvrdio *Oakenful*-ov model [178].





Slika 4.17. Relaksaciono vreme  $T_1$  za protone C18 metil grupe 7-monoketoholne kiseline u funkciji koncentracije.

Verapamil u deuterisanom hloroformu verovatno deluje kao katalizator u formiranju sekundarne micide 7-monoketoholne kiseline tipa *Oakenful*. Naime, verapamil ima dve metoksi grupe na fenilnim grupama i jednu nitrilnu grupu blizu fenilne grupe (Slika 4.16.). Fenilne grupe su razdvojene "spejserom" od 7 atoma (6C i 1N), te verapamil može da gradi vodonični kompleks sa dva molekula 7-monoketoholne kiseline Slika 4.18. I. Kada se molekuli 7-monoketoholne kiseline vežu vodoničnim vezama za metoksi grupe obe fenilne grupe verapamila I tada zbog povoljnog entropijskog efekta (oslobođenje molekula  $\text{CDCl}_3$  iz solvacionog sloja i efekat blizine u prostoru) može da nastane kompleks II, gde su žučne kiseline povezane hidrofobnim interakcijama. Sa povećanjem koncentracije 7-monoketoholne kiseline nastaje agregat III gde su metoksi grupe jedne fenilne grupe zamenjene molekulom žučne kiseline. Sa daljim povećanjem koncentracije žučne kiseline zamenjuju se i metoksi grupe druge fenilne grupe žučnom

kiselinom pri čemu nastaje sekundarna micela *Oakenful*-ovog tipa kod koje su primarne micelle povezane hidrofobnim interakcijama **IV**.



Slika 4.18. Promotorna uloga verapamila u formiranju sekundarne micelle 7-monoketoholne kiseline tipa *Oakenful* u hloroformu. (  u modelu verapamila predstavlja fenilnu grupu sa dve metoksi funkcije,  označavaju vodonične veze).

## 4.2. Ispitivanje interakcija između žučnih kiselina i odabranih lekova

U našim ranijim ispitivanjima [4] uticaja žučnih kiselina na lokalno anestetičko delovanje lidokaina u infiltracionoj anesteziji repa pacova utvrđeno je da holna kiselina i njeni monoketoderivati statistički značajno smanjuju latentno vreme anestezije (vreme od aplikacije leka do uspostavljanja potpune anestezije) odnosno produžuju vreme trajanja lokalne anestezije. Predložen je i mehanizam delovanja žučnih kiselina po kome u lipidnoj fazi membrane ili na površini membrane nastaje kompleks sa vodoničnim vezama između žučne kiseline i lidokaina. Stoga je cilj u ovom radu da se pomoću  $^1\text{H}$  NMR spektrometrijskih merenja potvrdi predloženi mehanizam interakcija ispitivanih žučnih kiselina i lidokaina. Za kvantifikaciju ovih interakcija koristi se ravnotežna konstanta nastajanja vodonične veze između amidnog vodonika lidokaina i proton akceptora većeg broja strukturno različitih žučnih kiselina u  $\text{CDCl}_3$ .

Isto tako, je bio cilj da se odredi uticaj žučnih kiselina na transport lidokaina i verapamila iz vodene sredenine u organski rastvarač (koji modeluje membranu), kada se žučne kiseline nalaze u organskom rastvaraču. Pomoću ovih oglada se modeluje predtretman bioloških sistema sa žučnim kiselinama. Naime, u većini slučajeva kada se ispituje promotorno delovanje žučnih kiselina kod eksperimentalnih životinja, žučne kiseline se apliciraju pre ispitivanog leka [1-3]. Takođe, je bio cilj da se povežu promene kinetičkih parametara uzrokovane prisustvom žučnih kiselina sa konstantom ravnoteže kompleksa žučne kiseline i lidokaina, te da se postavi nov model-jednačina (višestruka regresija i metoda glavnih komponenti) za interakciju lidokaina i žučnih kiselina.

Dalji cilj je bio određivanje uticaja žučnih kiselina na adsorpciju lidokaina i verapamila na aktivnom uglju. Ovaj deo ispitivanja modeluje površinsko delovanje žučnih kiselina na graničnoj površini voda / ćelijska membrana, gde se žučne kiseline adsorbuju i tako modifikuju graničnu površinu voda / ćelijska membrana.

#### 4.2.1A. ODREĐIVANJE KOMPLEKSA SA VODONIČNIM VEZAMA IZMEĐU ŽUČNIH KISELINA I LIDOKAINA U HLOROFORMU

Ukoliko se pretpostavi, da se u nastalom kompleksu, sa vodoničnim vezama, lidokain i žučna kiselina nalaze u odnosu 1 : 1, tada se može napisati sledeća reakcija:



Konstanta ravnoteže za gornju reakciju data je izrazom:

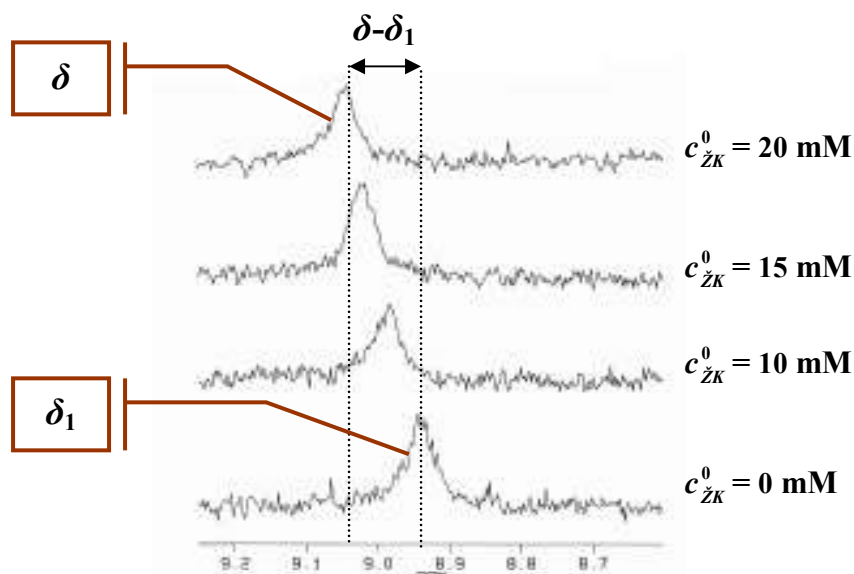
$$K = \frac{c_{L\check{Z}K}}{c_L c_{\check{Z}K}} \quad (4.13)$$

U gornjoj jednačini  $c_{L\check{Z}K}$  predstavlja ravnotežnu koncentraciju kompleksa lidokaina i žučne kiseline,  $c_L$  je ravnotežna koncentracija lidokaina, i  $c_{\check{Z}K}$  je ravnotežna koncentracija žučne kiseline. Prema *Becker*-u [180] ako se ravnotežna koncentracija kompleksa predstavi kao razlika između početne koncentracije lidokaina  $c_L^0$  i ravnotežne koncentracije lidokaina:  $c_{L\check{Z}K} = c_L^0 - c_L$  i ako se uvede odnos:  $c_L^0 < c_{\check{Z}K}^0$  gde je  $c_{\check{Z}K}^0$

početna koncentracije žučne kiseline, tada se jednačina (4.13) može napisati u sledećem obliku:

$$K = \frac{c_L^0 - c_L}{c_L c_{\text{ŽK}}^0} \quad (4.14)$$

$\delta_1$  Predstavlja hemijsko pomeranje amidnog protona u slobodnom lidokainu, dok je  $\delta_2$  hemijsko pomeranje amidnog protona u vodoničnoj vezi. Zbog brzine izmene okruženja protona u spektru se javlja srednji signal  $\delta$  umesto dva odvojena za monomer lidokaina i za kompleks lidokaina i žučne kiseline (Slika 4.19.) [181,182].



Slika 4.19. Promena položaja amidnog protona lidokaina u prisustvu žučnih kiselina.  $\delta_1$  je hemijsko pomeranje amidnog vodonika lidokaina bez žučnih kiselina, dok je  $\delta$  hemijsko pomeranje istog protona u prisustvu žučnih kiselina (7-monoketoholne kis.).

Hemijsko pomeranje  $\delta$  za srednji signal određen je izrazom:

$$\delta = \frac{c_L \delta_1 + c_{L\text{ŽK}} \delta_2}{c_L^0} \quad (4.15)$$

Ukoliko se u jednačini (4.15) uvede zamena:  $c_{L\text{ŽK}} = c_L^0 - c_L$  onda se za hemijsko pomeranja srednjeg signala dobija:

$$\delta = \frac{c_L}{c_L^0} \delta_1 + \frac{c_L^0 - c_L}{c_L^0} \delta_2 \quad (4.16)$$

Kombinacijom jednačina (4.16) i (4.14) dobija se:

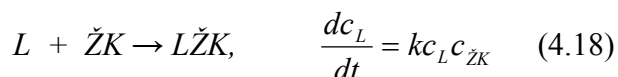
$$\frac{1}{\delta - \delta_1} = \frac{1}{K(\delta_2 - \delta_1)} \frac{1}{c_{\check{Z}K}^0} + \frac{1}{\delta_2 - \delta_1} \quad (4.17)$$

Ako se leva strana gornje jednačine (4.17) predstavi u funkciji recipročne ukupne koncentracije žučne kiseline, iz nagiba i odsečka prave se može izračunati konstanta ravnoteže.

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{1}{K(\delta_2 - \delta_1)} ; \quad \text{odseč.} = \frac{1}{\delta_2 - \delta_1}$$

#### 4.2.1B. UTICAJ ŽUČNIH KISELINA NA TRANSPORT ISPITIVANIH LEKOVA IZ VODENE FAZE I UTICAJ NA NJIHOVU ADSORPCIJU NA AKTIVNOM UGLJU

Ako se posmatra reakcija građenja kompleksa sa vodoničnim vezama ( $L\check{Z}K$ ) između ispitivanog leka ( $L$ ) i žučne kiseline ( $\check{Z}K$ ) (reakcija drugog reda) i napiše izraz za promenu koncentracije leka ( $dc_L/dt$ ), onda se dobija nelinearna diferencijalna jednačina sa konstantom brzine  $k$ :



Međutim, ako je koncentracija žučne kiseline  $c_{\check{Z}K}$  mnogo veća od koncentracije ispitivanog leka  $c_L$  onda se ona može smatrati konstantnom, te gornja jednačina (4.18) onda prelazi u linearnu homogenu diferencijalnu jednačinu [183-185]. Pod pretpostavkom da je proces linearan ( $c_{\check{Z}K} \gg c_L$ ) opadanje koncentracije leka u vodenoj fazi se može izraziti:

- monoeksponencijalnom jednačinom:  $c_{L_v} = x_0 \exp[-kt] + [L_v]$  odnosno
- bieksponecijalnom jednačinom:  $c_{L_v} = X \exp[-\lambda_1 t] + Y \exp[-\lambda_2 t] + [L_v]$

$c_{L_v}$  je koncentracija ispitivanog leka u vodenoj fazi nakon vremena  $t$ ,  
 $[L_v]$  predstavlja ravnotežnu koncentraciju ispitivanog leka u vodenoj fazi,  
 $k$  predstavlja koeficijent brzine monoeksponencijalnog opadanja koncentracije ispitivanog leka u vodenoj fazi,  
 $x_0$  je deo ukupne koncentracije leka koji monoeksponencijalno opada u vodenoj fazi,  
 $\lambda_1$  i  $\lambda_2$  su eksponencijalni parametri u bieksponecijalnoj funkciji koji su sastavljeni od konstanti brzine parcijalnih procesa,  
 $X$  je deo ukupne (početne) koncentracije ispitivanog leka koji opada prema funkciji  $\exp[-\lambda_1 t]$ , dok je  $Y$  deo ukupne (početne) koncentracije ispitivanog leka koji opada prema funkciji  $\exp[-\lambda_2 t]$ .

Kada se posmatra adsorpcija ispitivanih lekova iz vodene faze na aktivnom uglju u prisustvu Na-soli žučne kiseline u vodenoj fazi, onda zbog adsorpcije žučne kiseline nastaje modifikovana površina adsorbata koja nije energetski homogena. Stoga se za opisivanje adsorpcije primenjuje *Freundlich*-ova adsorpciona izoterma [186,187]. Eksperimentalno je konstantovano da adsorbovana količina adsorbata ne raste neograničeno sa porastom molariteta adsorbata u rastvoru već se pri nekom molaritetu dostiže granična vrednost kada je površina adsorbenta zasićena adsorbatom.

## 4.2.2. MATERIJAL I METODA

### 4.2.2.1. ODREĐIVANJE VODONIČNE VEZE IZMEĐU ŽUČNIH KISELINA I LIDOKAINA U HLOROFORMU

Ispitivane žučne kiseline su tako odabrane da pružaju što veću međusobnu strukturnu razliku, koja je neophodna za matematičko opisivanje zavisnosti ravnotežne konstante od strukture. Pored toga, drugi kriterijum za odabir žučnih kiselina je bila i njihova rastvorljivost u hloroformu.

**Hidroksi derivat holanske kiseline:**  $3\alpha,7\alpha$ -dihidroksi- $5\beta$ -holanska kiselina (henodeoksiholna kiselina, HDK).

**Hidroksi i keto derivati holanske kiseline:**  $3\alpha$ -hidroksi-7-keto- $5\beta$ -holanska kiselina (7-monoketohenodeoksiholna kiselina, 7-MKHDK);  $3\alpha$ -hidroksi-12-keto- $5\beta$ -holanska kiselina (12-monoketodeoksiholna kiselina, 12-MKDK) i  $3\alpha$ -hidroksi-7,12-diketo- $5\beta$ -holanska kiselina (7,12-diketoholna kiselina, 7,12-DKH).

**Keto derivati holanske kiseline:** 3,7,12-triketo- $5\beta$ -holanska kiselina (3,7,12-triketoholna kiselina, 3,7,12-TKH) i 3,12-diketo- $5\beta$ -holanska kiselina (3,12-diketodeoksiholna kiselina, 3,12-DKDK).

**Acetoksi i keto derivati holanske kiseline:**  $3\alpha$ -acetoksi-7,12-diketo- $5\beta$ -holanska kiselina ( $3\alpha$ -acetil-7,12-diketoholna kiselina,  $3\alpha$ -Ac-7,12-DKH) i  $3\alpha,12\alpha$ -diacetoksi-7-keto- $5\beta$ -holanska kiselina ( $3\alpha,12\alpha$ -diacetil-7-monoketoholna kiselina,  $3\alpha,12\alpha$ -DiAc-7-MKH);

**Metil estri acetoksi i keto derivata holanske kiseline** metil  $3\alpha,12\alpha$ -diacetoksi-7-keto- $5\beta$ -holanat (metil estar  $3\alpha,12\alpha$ -diacetil-7-monoketoholne kiseline, Me- $3\alpha,12\alpha$ -DiAc-7-MKH) i metil 3,7,12-triketo- $5\beta$ -holanat (metil estar 3,7,12-triketoholne kiseline, Me-3,7,12-TKH).

Metanol (J.T Baker, >99,9%), aceton (J.T Baker, >99,9%), deuterisani hloroform (Merk, >99,9%), lidokain (Galenika, >99,9%), acetanilid (Sigma, >99%).



#### 4.2.2.1.1. Određivanje ravnotežne konstante vodonične veze $^1\text{H}$ NMR metodom

Za  $^1\text{H}$  NMR spektrometrijska merenja se koristi Bruker AC-250 spektrometar sa standardnim Bruker softverom. Ispitivani rastvori se snimaju u NMR tubama (Aldrich) od 5 mm [188].

Napravi se pet rastvora žučnih kiselina i lidokaina tako da je rastvor najmanje koncentracije žučne kiseline pet puta veći od koncentracije lidokaina (3 mM). Najveća koncentracija žučne kiseline određena je njenom rastvorljivošću u hloroformu. Svaki rastvor žučne kiseline sadrži lidokain u koncentraciji od 3 mM (da bi se izbegla samoasocijacija lidokaina). Rastvor samog lidokaina (bez žučnih kiselina) takođe ima koncentraciju od 3 mM. Rastvori se prave u  $\text{CDCl}_3$ . Za određivanje hemijskog pomeranja služi referentna supstanca tetrametilsilan (TMS,  $\delta_H=0.00$ ) u deuterisanom hloroformu.

#### 4.2.2.2. UTICAJ ŽUČNIH KISELINA NA TRANSPORT ISPITIVANIH LEKOVA IZ VODENE FAZE U HLOROFORM I UTICAJ NA NJIHOVU ADSORPCIJU NA AKTIVNOM UGLJU

Kod eksperimenata koji se odnose na određivanje uticaja žučnih kiselina na transport lekova iz vodene faze u hloroform koriste se one žučne kiseline za koje su određene konstante ravnoteže vodoničnog kompleksa sa lidokainom (poglavlje 4.2.2.1.). U eksperimentima gde se posmatra uticaj žučnih kiselina na adsorpciju lidokaina i verapamila iz vodene faze, zbog rastvorljivosti u vodi, žučne kiseline se primenjuju u obliku Na-soli:

**Hidroksi derivat holanske kiseline:**  $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihidroksi- $5\beta$ -holanska kiselina (holna kiselina, HK).

**Hidroksi i keto derivati holanske kiseline:**  $3\alpha,12\alpha$ -dihidroksi-7-keto- $5\beta$ -holanska kiselina (7-monoketoholna kiselina, 7-MKH);  $3\alpha$ -hidroksi-7,12-diketo- $5\beta$ -holanska kiselina (7,12-diketoholna kiselina, 7,12-DKH);  $3\alpha$ -hidroksi-7-keto- $5\beta$ -holanska kiselina (7-monoketohenodeoksiholna kiselina, 7-MKHDK).

**Keto derivat holanske kiseline:** 3,7,12-triketo- $5\beta$ -holanska kiselina (3,7,12-triketoholna kiselina, 3,7,12-TKH).

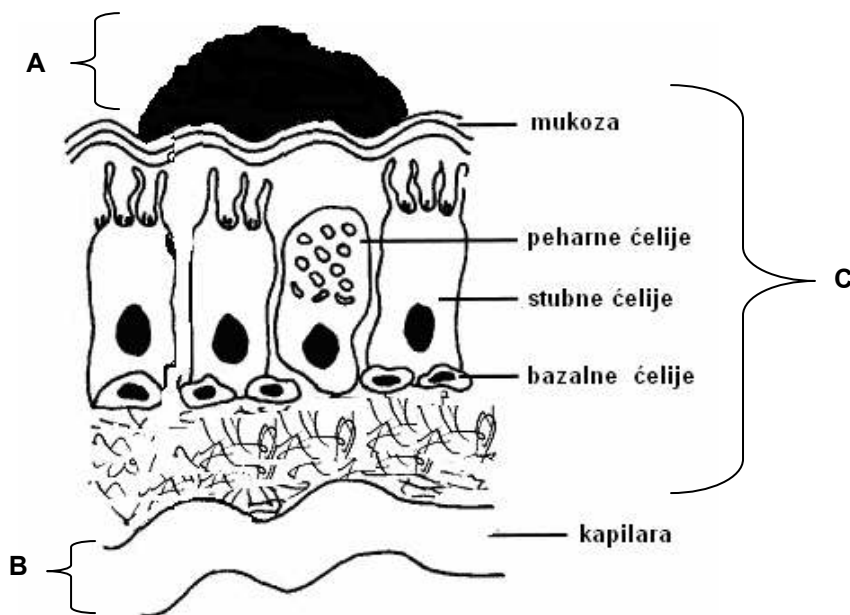
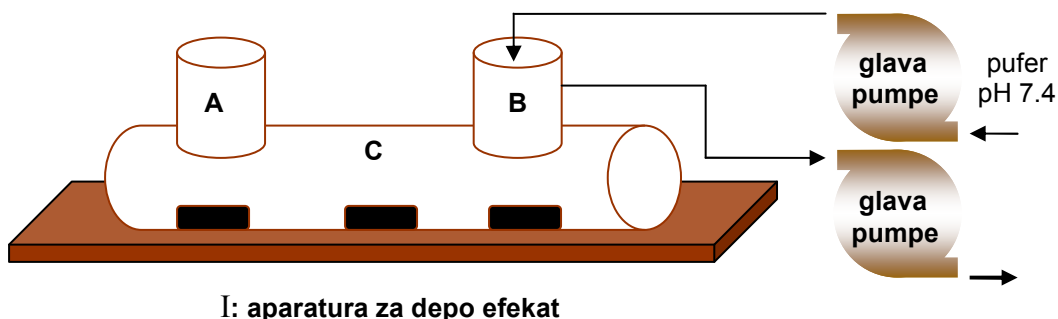
Hloroform (J.T Baker, >99,9%), lidokain hidrohlorid (Galenika, >99,9%), verapamil hidrohlorid (Galenika, >99,9%), aktivni ugalj (Aldrich).

##### 4.2.2.2.1. Određivanje brzine opadanja koncentracije lidokaina u vodenoj fazi

Naprave se rastvori žučne kiseline u hloroformu koncentracije: 6, 9, 12, 18, 30 i 36 mM. Kontrola je hloroform bez žučne kiseline. Rastvori žučnih kiselina u hloroformu (2 ml) i puferovani vodeni rastvori (fosfatni puferi pH 6.5; 5.5 i 7.4) lidokaina ili verapamila početne koncentracije od 3 mM (2ml) se stavljaju u erlenmajere (10 ml) pri sobnoj temperaturi i mešaju na 300 obrtaja u minuti. Za ispitivanje uticaja žučne kiseline određene koncentracije potrebno je postaviti onoliko oglada koliko se planira tačaka na krivoj  $c(\text{lidokain}) = f(t)$ . Uzorci se uzimaju u sledećim vremenskim intervalima: 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 25 i 30 minuta, odnosno ako se ravnoteža ne uspostavi

do 30 minuta onda nakon tog vremena uzorci se uzimaju svakih 15 minuta. Nakon određenog vremena, uzima se uzorak od 750  $\mu$ l iz vodene faze. Koncentracije ispitivanih lekova se određuje spektrofotometrijski (Agilent 8453 ) (kalibraciona kriva) na talasnoj dužini od 264 nm za lidokain, odnosno na 295 nm za verapamil [189]. Slepna proba je puferovana vodena sredina. Svaki ogled je sedam puta ponovljen.

#### 4.2.2.2. Model depo efekta lidokaina u hloroformu sa žučnim kiselinama



Slika 4.20. Depo efekat lidokaina u hloroformu sa žučnim kiselinama.

Eksperiment se izvodi u aparaturi napravljenoj za ovu svrhu koja se sastoji od dve vertikalne staklene cevi **A** i **B** postavljene na stakleni cilindar **C** (Slika 2, I). U cavi **A** se nalazi vodeni rastvor lidokaina (5 ml, 40 mM, pH 7.4) i predstavlja rastvor lidokaina koji se primenjuje u površinskoj infiltracionoj anesteziji-na primer: rastvor anestetika raspršen na površini nazalne mukoze (Slika 4.20. II, **A**). Kod kontrolnog oglada u horizontalnom cilindru **C** se nalazi hloroform, dok kod oglada sa žučnim kiselinama

rastvor žučne kiseline u hloroformu koncentracije 18 mM kod jednog eksperimenta i 36 mM kod drugog eksperimenta. Horizontalnom cilindru **C** u biološkom sistemu odgovara kompleksna struktura membrane (na primer nazalna membrana Slika 4.20. II, **C**), gde je cilj da se lokalni anestetik zadrži što duže. U cevi **B** je pufer (5 ml, pH 7.4). Staklena cev **B** je povezana sa glavom perilstatičke pumpe koja dovodi pufer pH 7.4, odnosno sa glavom pumpe (Master flex 7523-60, glave pumpe: L/S-Easy-Load II 77200-60, L/S-Tubing 13) koja odvodi rastvor iz cevi **B**. Protok pumpe je  $2 \text{ ml min}^{-1}$  i ne menja zapreminu rastvora u cevi **B**. Na ovaj način se modeluje protok krvi u kapilari oko tkiva (Slika 4.20. II, **B**). U horizontalnom cilindru **C** se nalaze 3 magneta jedan u sredini, dok su dva na kontaktnim mestima sa vertikalnim cevima, 300 o/min. Nakon 3 sata iz horizontalne cevi **C** se vadi (kroz cev **A**) hloroformni rastvor u kome se određuje koncentracija lidokaina spektrofotometrijskom metodom.

#### 4.2.2.2.3. Određivanje uticaja ispitivanih žučnih kiselina na adsorpciju verapamila i lidokaina na aktivniom uglju

Prave se sledeći rastvori verapamila i lidokaina koncentracije: 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50  $\text{mg ml}^{-1}$  i pH 6.5. Ovi rastvori sadrže i Na-soli ispitivanih žučnih kiselina u sledećim koncentracijama: 0.5 CMC i CMC. Kontrola je rastvor leka bez žučne kiseline. U svaki rastvor kontrole, odnosno leka i žučne kiseline se doda 20 mg aktivnog uglja i suspenzija se meša u toku 30 minuta. Posle centrifugiranja (3000 obrtaja u minuti, 10 minuta) koncentracija verapamila i lidokaina se spektrofotometrijski određuje iz supernatanta. Rezultati se predstavljaju kao ravnotežna količina adsorbovanog leka na jediničnoj masi adsorbensa u funkciji ravnotežne koncentracije leka u supernatantu.

U ranijim našim ispitivanjima je utvrđeno da žučne kiseline (rastvorene u hloroformu) povećavaju stepen ekstrakcije gvožđe(III)- i hrom(III)-jona iz vodenog rastvora u hloroform. Što se može objasniti sa građenjem kompleksa ispitivanih žučnih kiselina i gvožđe(III)- odnosno hrom(III)-jona u hloroformu, tako što se metalni joni vezuju preko OH i keto grupa žučnih kiselina. Kako OH i keto grupe žučnih kiselina imaju ključne uloge i u vezivanju lidokaina i verapamila, stoga je ispitivana kompetencija gvožđe(III)- i hrom(III)-jona sa verapamilom i lidokainom prema modifikovanoj površini adsorbata.

Ukoliko su prisutne i soli gvožđa(III)- i hroma(III)-jona onda se ispitivani lekovi ekstrahuju hloroformom (2x5 ml) iz supernatanta pH 3.5, zatim se ekstrakt propusti kroz kolonu za ekstrakciju na čvrstoj fazi (Oesis) koji vezuje eventualno prisutne metalne jone u hloroformu. Koncentracija verapamila i lidokaina se određuje spektrofotometrijski iz hloroforma.

Takođe u ovom radu se ispituje kako deluju glukoza i saharoza na adsorpciju verapamila i lidokaina na površinu aktivnog uglja koja je modifikovana sa žučnim kiselinama, sa ciljem da modelovanje površinskog delovanja žučnih kiselina bude što realnije uslovima iz bioloških sistema.

Ukoliko su prisutne glukoza i saharoza tada se verapamil i lidokain takođe ekstrahuje hloroformom (2x5 ml) iz supernatanta pH 3.5. Voda se uklanja sa anhidrovanim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (100 mg), a koncentracije ispitivanih lekova se takođe određuje iz hloroforma spektrofotometrijski.

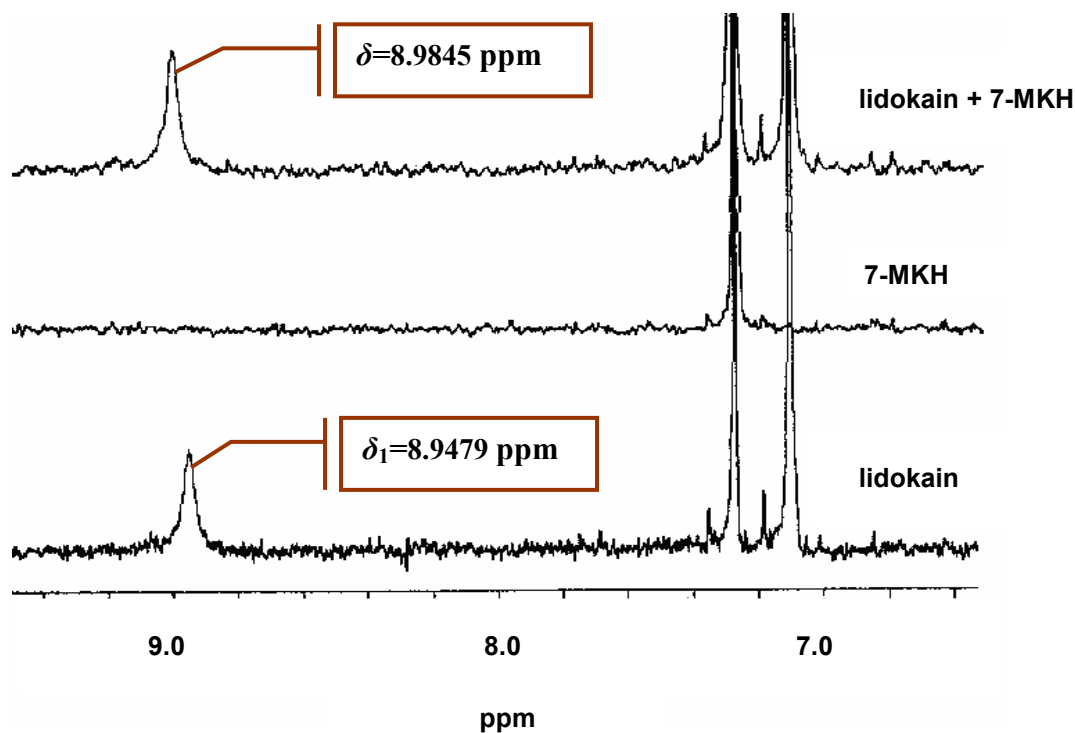
#### 4.2.2.2.4. Obrada podataka

Molekulski deskriptori žučnih kiselina se dobijaju pomoću programa Chem 3D Ultra 7.0. Rezultati su statistički obrađeni pomoću programa SPSS 10.0 for Windows, koji je korišćen i za dobijanje višestruke linearne regresije kao i za analizu glavnih komponenti (PCA).

### 4.2.3. REZULTATI I DISKUSIJA

#### 4.2.3.1. VODONIČNA VEZA IZMEĐU LIDOKAINA I ŽUČNIH KISELINA U HLOROFORMU

Na Slici 4.21. je predstavljen deo  $^1\text{H}$  NMR spektra lidokaina (3mM) na kome je obeležen signal amidnog protona. Takođe na Slici 4.21. je prikazan  $^1\text{H}$  NMR spektar 7-monoketoholne kiseline (10 mM) i smeše lidokaina (3mM) i 7-monoketoholne kiseline (10 mM) u opsegu od 6.5 do 9.5 ppm. Sa Slike 4.21. se vidi da je hemijsko pomeranje amidnog protona lidokaina 8.9479 ppm, dok 7-monoketoholna kiselina (kao i ostale ispitivane žučne kiseline: HDK; 7-MKHDK; 12-MKDK; 7,12-DKH; 3,7,12-TKH; 3,12-DKDK; 3 $\alpha$ -Ac-7,12-DKH; 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -DiAc-7-MKH; Me-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -DiAc-7-MKH i Me-3,7,12-TKH) u toj oblasti spektra nema signala. Zbog toga je moguće odrediti konstantu ravnoteže vodoničnog kompleksa lidokaina i žučne kiseline, mereći promenu hemijskog pomeranja amidnog protona u prisustvu različitih koncentracija žučne kiseline.



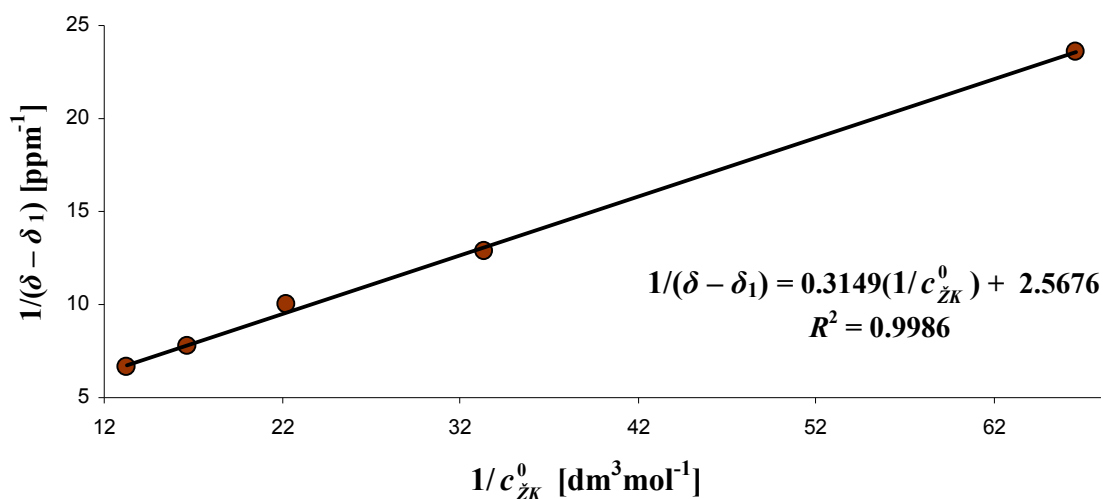
Slika 4.21. Deo  $^1\text{H}$  NMR spektra lidokaina (3mM), 7-monoketoholne kiseline (7-MKH, 10 mM) i smeše lidokaina (3mM) i 7-monoketoholne kiseline (7-MKH, 10 mM).

#### 4.2.3.1.1. Ravnotežna konstanta vodonične veze između 3,7,12-triketoholne kiseline i lidokaina

Tabela 4.8. Hemijsko pomeranje amidnog protona lidokaina u prisustvu 3,7,12-triketoholne kiseline

$c_{\text{žK}}^0$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	$1/c_{\text{žK}}^0$ [dm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> ]	$\delta$ [ppm]	$\delta - \delta_1$ [ppm]	$1/(\delta - \delta_1)$ [ppm <sup>-1</sup> ]
15	66.66	8.9830	0.0424	23.58
30	33.33	9.0186	0.0780	12.82
45	22.22	9.0479	0.1010	9.99
60	16.66	9.0699	0.1291	7.75
75	13.33	9.0918	0.1510	6.62

$$\delta_1 = 8.9406 \text{ ppm}$$



Slika 4.22. Grafička zavisnost  $1/(\delta - \delta_1)$  [ppm<sup>-1</sup>] od  $1/c_{\text{žK}}^0$  [dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup>] za sistem lidokaina i 3,7,12-triketoholne kiseline u CDCl<sub>3</sub>.

$$n^4 = 1$$

$$K = 1 / (\text{tga}(\delta_2 - \delta_1)) = \text{odsečak} / \text{tga} = 2.5676 \text{ ppm}^{-1} / 0.3149 \text{ ppm}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} = 8.15 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$$

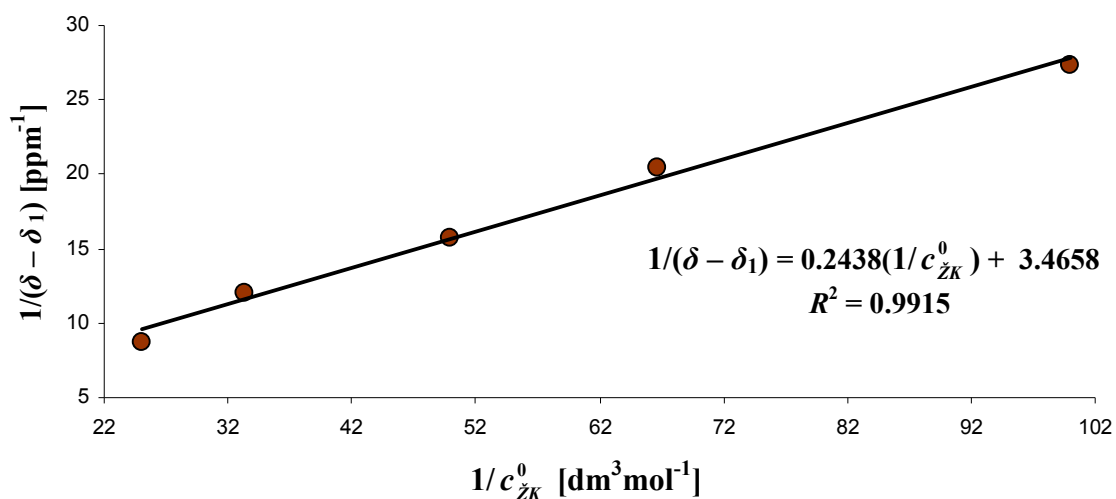
<sup>4</sup> Označava broj molekula lidokaina koji se veže za molekul žučne kiseline.

#### 4.2.3.1.2. Ravnotežna konstanta vodonične veze između 7-monoketoholne kiseline i lidokaina

Tabela 4.9. Hemijsko pomeranje amidnog protona lidokaina u prisustvu 7-monoketoholne kiseline

$c_{\text{žK}}^0$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	$1/c_{\text{žK}}^0$ [dm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> ]	$\delta$ [ppm]	$\delta - \delta_1$ [ppm]	$1/(\delta - \delta_1)$ [ppm <sup>-1</sup> ]
10	100.00	8.9845	0.0366	27.32
15	66.66	8.9967	0.0488	20.49
20	50.00	9.0113	0.0634	15.77
30	33.33	9.0308	0.0829	12.06
40	25.00	9.0626	0.1147	8.72

$\delta_1 = 8.9479$  ppm



Slika 4.23. Grafička zavisnost  $1/(\delta - \delta_1)$  [ppm<sup>-1</sup>] od  $1/c_{\text{žK}}^0$  [dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup>] za sistem lidokaina i 7-monoketoholne kiseline u CDCl<sub>3</sub>.

$n = 1$

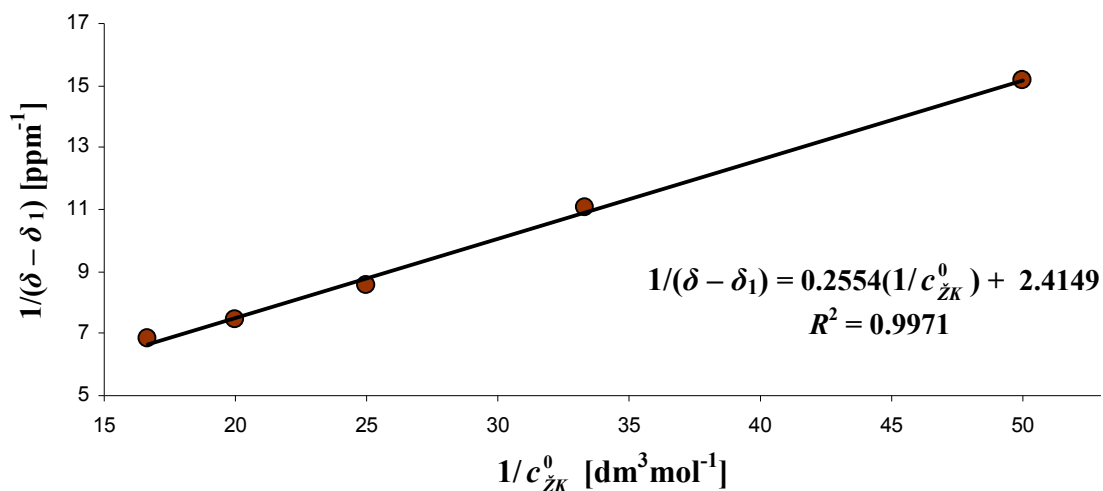
$K = 1 / (\text{tg} \alpha (\delta_2 - \delta_1)) = \text{odsečak} / \text{tg} \alpha = 3.4658 \text{ ppm}^{-1} / 0.2438 \text{ ppm}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} = 14.22 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$

#### 4.2.3.1.3. Ravnotežna konstanta vodonične veze između 12-monoketodeoksiholne kiseline i lidokaina

Tabela 4.10. Hemijsko pomeranje amidnog protona lidokaina u prisustvu 12-monoketodeoksiholne kiseline

$c_{\text{žK}}^0$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	$1/c_{\text{žK}}^0$ [dm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> ]	$\delta$ [ppm]	$\delta - \delta_1$ [ppm]	$1/(\delta - \delta_1)$ [ppm <sup>-1</sup> ]
20	50.00	8.9990	0.0658	15.19
30	33.33	9.0235	0.0903	11.07
40	25.00	9.0504	0.1172	8.53
50	20.00	9.0674	0.1340	7.46
60	16.66	9.0796	0.1464	6.86

$$\delta_1 = 8.9332 \text{ ppm}$$



Slika 4.24. Grafička zavisnost  $1/(\delta - \delta_1)$  [ppm<sup>-1</sup>] od  $1/c_{\text{žK}}^0$  [dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup>] za sistem lidokaina i 12-monoketodeoksiholne kiseline u CDCl<sub>3</sub>.

$$n = 1$$

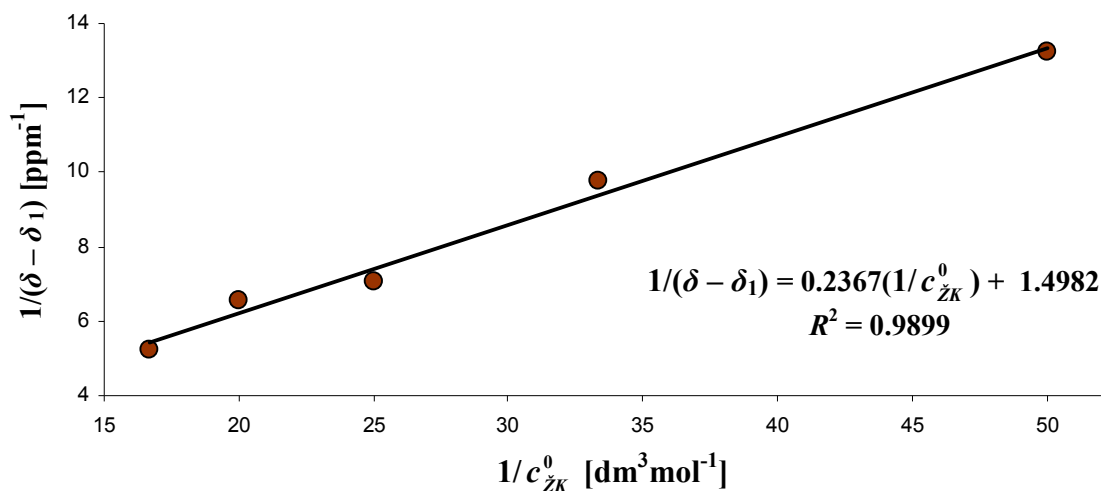
$$K = 1 / (\text{tg} \alpha (\delta_2 - \delta_1)) = \text{odsečak} / \text{tg} \alpha = 2.4149 \text{ ppm}^{-1} / 0.2554 \text{ ppm}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} = 9.45 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$$

#### 4.2.3.1.4. Ravnotežna konstanta vodonične veze između 3,12-diketodeoksiholne kiseline i lidokaina

Tabela 4.11. Hemijsko pomeranje amidnog protona lidokaina u prisustvu 3,12-diketodeoksiholne kiseline

$c_{\text{žK}}^0$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	$1/c_{\text{žK}}^0$ [dm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> ]	$\delta$ [ppm]	$\delta - \delta_1$ [ppm]	$1/(\delta - \delta_1)$ [ppm <sup>-1</sup> ]
20	50.00	9.0089	0.0757	13.21
30	33.33	9.0357	0.1025	9.75
40	25.00	9.0748	0.1416	7.06
50	20.00	9.0796	0.1538	6.54
60	16.66	9.1236	0.1904	5.25

$\delta_1 = 8.9332$  ppm



Slika 4.25. Grafička zavisnost  $1/(\delta - \delta_1)$  [ppm<sup>-1</sup>] od  $1/c_{\text{žK}}^0$  [dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup>] za sistem lidokaina i 3,12-diketodeoksiholne kiseline u CDCl<sub>3</sub>.

$n = 1$

$K = 1 / (\text{tg}\alpha (\delta_2 - \delta_1)) = \text{odsečak} / \text{tg}\alpha = 1.4982 \text{ ppm}^{-1} / 0.2367 \text{ ppm}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} = 6.33 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$

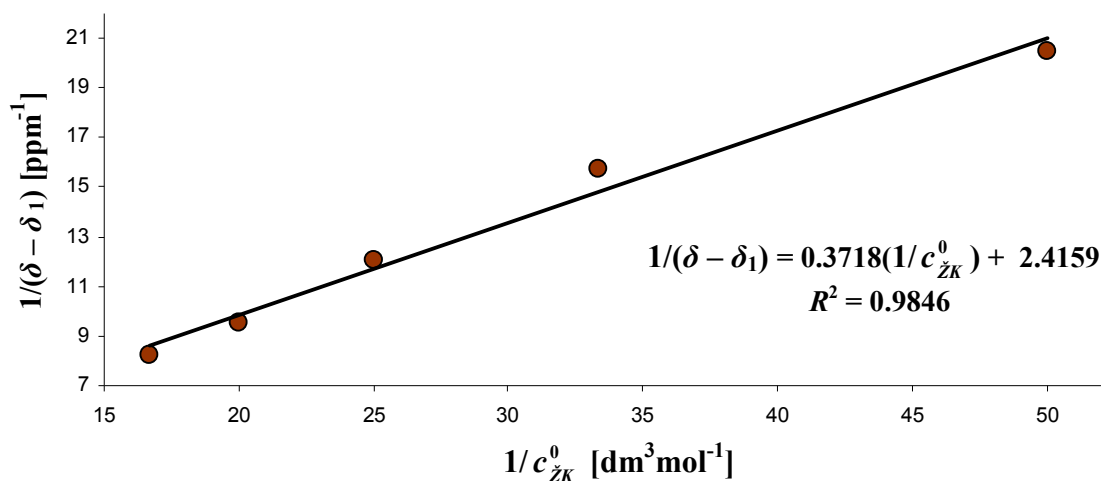


#### 4.2.3.1.5. Ravnotežna konstanta vodonične veze između 7-monoketohenodeoksiholne kiseline i lidokaina

Tabela 4.12. Hemijsko pomeranje amidnog protona lidokaina u prisustvu 7-monoketohenodeoksiholne kiseline

$c_{\text{žK}}^0$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	$1/c_{\text{žK}}^0$ [dm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> ]	$\delta$ [ppm]	$\delta - \delta_1$ [ppm]	$1/(\delta - \delta_1)$ [ppm <sup>-1</sup> ]
20	50.00	8.9820	0.0488	20.49
30	33.33	8.9967	0.0635	15.74
40	25.00	9.0164	0.0830	12.05
50	20.00	9.0382	0.1050	9.52
60	16.66	9.0552	0.1220	8.19

$\delta_1 = 8.9332$  ppm



Slika 4.26. Grafička zavisnost  $1/(\delta - \delta_1)$  [ppm<sup>-1</sup>] od  $1/c_{\text{žK}}^0$  [dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup>] za sistem lidokaina i 7-monoketohenodeoksiholne kiseline u CDCl<sub>3</sub>.

$n = 1$

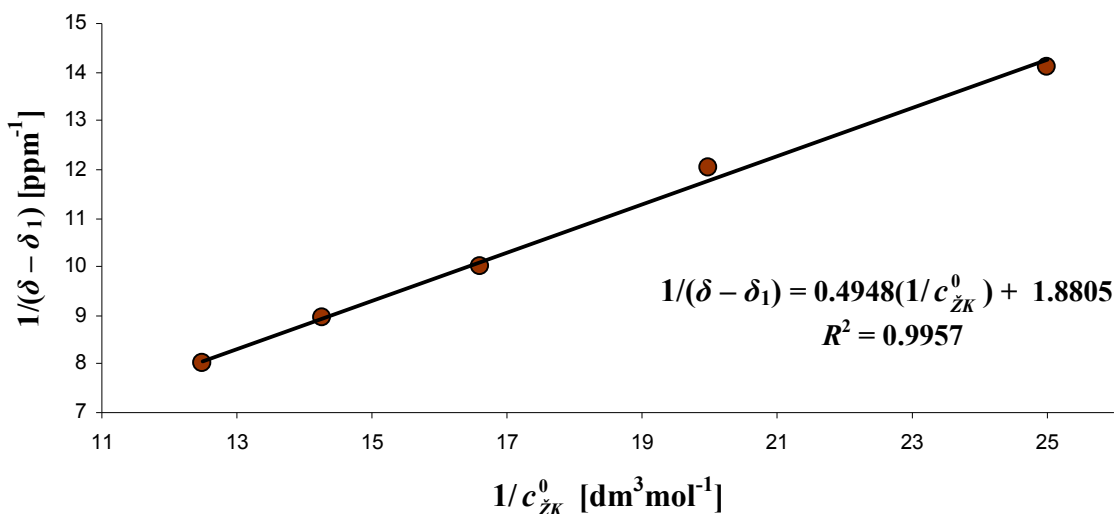
$K = 1 / (\text{tg} \alpha (\delta_2 - \delta_1)) = \text{odsečak} / \text{tg} \alpha = 2.4159 \text{ ppm}^{-1} / 0.3718 \text{ ppm}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} = 6.50 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$

#### 4.2.3.1.6. Ravnotežna konstanta vodonične veze između henodeoksiholne kiseline i lidokaina

Tabela 4.13. Hemijsko pomeranje amidnog protona lidokaina u prisustvu henodeoksiholne kiseline

$c_{\text{žK}}^0$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	$1/c_{\text{žK}}^0$ [dm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> ]	$\delta$ [ppm]	$\delta - \delta_1$ [ppm]	$1/(\delta - \delta_1)$ [ppm <sup>-1</sup> ]
40	25.00	8.9967	0.0708	14.12
50	20.00	9.0089	0.0830	12.05
60	16.60	9.0260	0.1001	9.99
70	14.28	9.0308	0.1049	8.94
80	12.50	9.0504	0.1245	8.03

$\delta_1 = 8.9259$  ppm



Slika 4.27. Grafička zavisnost  $1/(\delta - \delta_1)$  [ppm<sup>-1</sup>] od  $1/c_{\text{žK}}^0$  [dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup>] za sistem lidokaina i henodeoksiholne kiseline u CDCl<sub>3</sub>.

$n = 1$

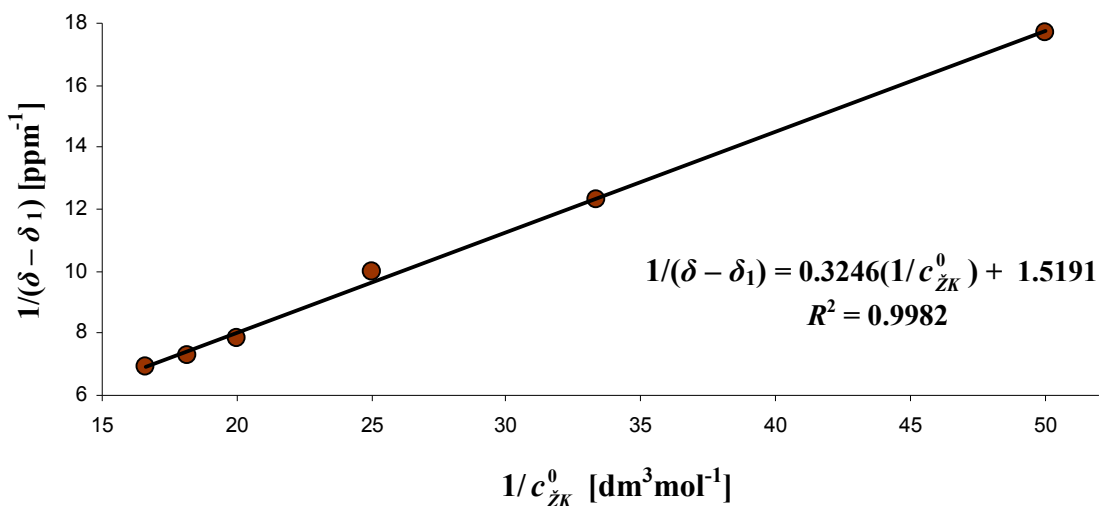
$K = 1 / (\text{tg}\alpha (\delta_2 - \delta_1)) = \text{odsečak} / \text{tg}\alpha = 1.8805 \text{ ppm}^{-1} / 0.4948 \text{ ppm}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} = 3.77 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$

#### 4.2.3.1.7. Ravnotežna konstanta vodonične veze između 7,12-diketoholne kiseline i lidokaina

Tabela 4.14. Hemijsko pomeranje amidnog protona lidokaina u prisustvu 7,12-diketoholne kiseline

$c_{\text{ŽK}}^0$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	$1/c_{\text{ŽK}}^0$ [dm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> ]	$\delta$ [ppm]	$\delta - \delta_1$ [ppm]	$1/(\delta - \delta_1)$ [ppm <sup>-1</sup> ]
20	50.00	8.9845	0.0565	17.69
30	33.33	9.0091	0.0811	12.33
40	25.00	9.0284	0.1004	9.96
50	20.00	9.0552	0.1272	7.86
55	18.20	9.0650	0.1370	7.29
60	16.60	9.0723	0.1443	6.93

$\delta_1 = 8.9280$  ppm



Slika 4.28. Grafička zavisnost  $1/(\delta - \delta_1)$  [ppm<sup>-1</sup>] od  $1/c_{\text{ŽK}}^0$  [dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup>] za sistem lidokaina i 7,12-diketoholne kiseline u CDCl<sub>3</sub>.

$$n = 1$$

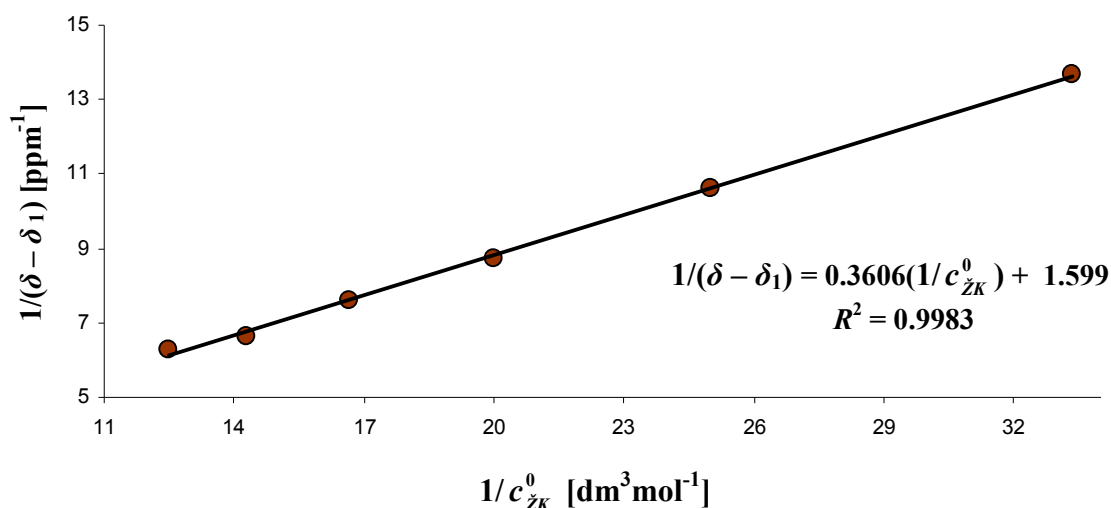
$$K = 1 / (\text{tg} \alpha (\delta_2 - \delta_1)) = \text{odsečak} / \text{tg} \alpha = 1.5191 \text{ ppm}^{-1} / 0.3246 \text{ ppm}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} = 4.66 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$$

#### 4.2.3.1.8. Ravnotežna konstanta vodonične veze između 3 $\alpha$ -acetil-7,12-diketoholne kiseline i lidokaina

Tabela 4.15. Hemijsko pomeranje amidnog protona lidokaina u prisustvu 3 $\alpha$ -acetil-7,12-diketoholne kiseline

$c_{\text{žK}}^0$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	$1/c_{\text{žK}}^0$ [dm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> ]	$\delta$ [ppm]	$\delta - \delta_1$ [ppm]	$1/(\delta - \delta_1)$ [ppm <sup>-1</sup> ]
30	33.33	8.9967	0.0732	13.66
40	25.00	9.0176	0.0941	10.62
50	20.00	9.0382	0.1147	8.72
60	16.66	9.0552	0.1317	7.59
70	14.28	9.0748	0.1513	6.61
80	12.50	9.0821	0.1586	6.30

$\delta_1 = 8.9235$  ppm



Slika 4.29. Grafička zavisnost  $1/(\delta - \delta_1)$  [ppm<sup>-1</sup>] od  $1/c_{\text{žK}}^0$  [dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup>] za sistem lidokaina i 3 $\alpha$ -acetil-7,12-diketoholne kiseline u CDCl<sub>3</sub>.

$$n = 1$$

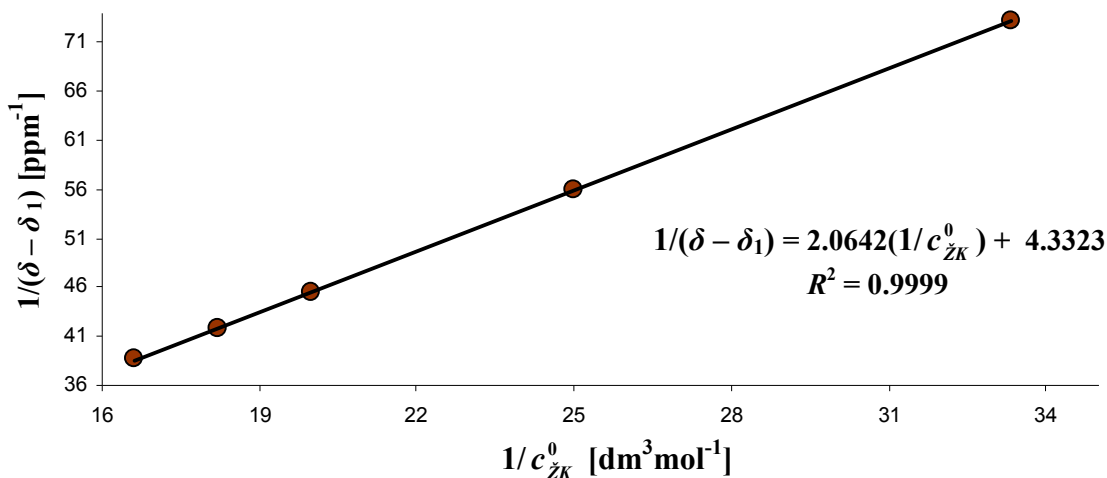
$$K = 1 / (\text{tga}(\delta_2 - \delta_1)) = \text{odsečak} / \text{tga} = 1.599 \text{ ppm}^{-1} / 0.3606 \text{ ppm}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} = 4.44 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$$

#### 4.2.3.1.9. Ravnotežna konstanta vodonične veze između 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -diacetil-7-monoketoholne kiseline i lidokaina

Tabela 4.16. Hemijsko pomeranje amidnog protona lidokaina u prisustvu 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -diacetil-7-monoketoholne kiseline

$c_{\text{ŽK}}^0$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	$1/c_{\text{ŽK}}^0$ [dm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> ]	$\delta$ [ppm]	$\delta - \delta_1$ [ppm]	$1/(\delta - \delta_1)$ [ppm <sup>-1</sup> ]
30	33.33	8.9416	0.0136	73.15
40	25.00	8.9458	0.0178	55.92
50	20.00	8.9499	0.0219	45.58
55	18.20	8.9518	0.0238	41.86
60	16.66	8.9538	0.0258	38.67

$\delta_1 = 8.9280$  ppm



Slika 4.30. Grafička zavisnost  $1/(\delta - \delta_1)$  [ppm<sup>-1</sup>] od  $1/c_{\text{ŽK}}^0$  [dm<sup>3</sup>mol<sup>-1</sup>] za sistem lidokaina i 3 $\alpha$ ,12  $\alpha$ -diacetil-7-monoketoholne kiseline u CDCl<sub>3</sub>.

$n = 1$

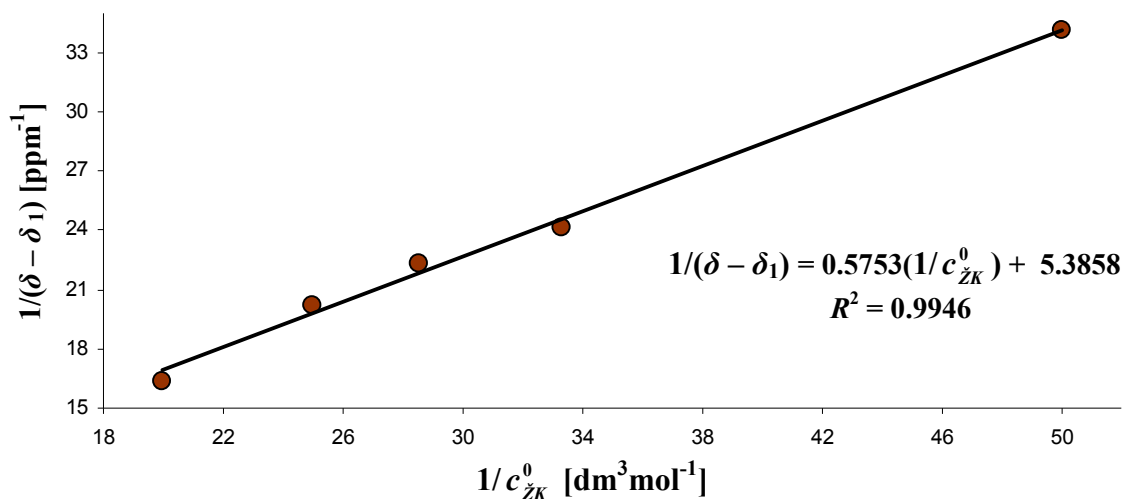
$K = 1 / (\text{tg}\alpha (\delta_2 - \delta_1)) = \text{odsečak} / \text{tg}\alpha = 4.3323 \text{ ppm}^{-1} / 2.0642 \text{ ppm}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} = 2.04 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$

#### 4.2.3.1.10. Ravnotežna konstanta vodonične veze između metil estra 3 $\alpha$ -acetil-7-monoketoholne kiseline i lidokaina

Tabela 4.17. Hemijsko pomeranje amidnog protona lidokaina u prisustvu metil estra 3 $\alpha$ -acetil-7-monoketoholne kiseline

$c_{\text{žK}}^0$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	$1/c_{\text{žK}}^0$ [dm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> ]	$\delta$ [ppm]	$\delta - \delta_1$ [ppm]	$1/(\delta - \delta_1)$ [ppm <sup>-1</sup> ]
20	50.00	8.9650	0.0293	34.13
30	33.33	8.9772	0.0415	24.10
35	28.57	8.9747	0.0390	22.33
40	25.00	8.9851	0.0494	20.24
50	20.00	8.9967	0.0610	16.39

$\delta_1 = 8.9357$  ppm



Slika 4.31. Grafička zavisnost  $1/(\delta - \delta_1)$  [ppm<sup>-1</sup>] od  $1/c_{\text{žK}}^0$  [dm<sup>3</sup>mol<sup>-1</sup>] za sistem lidokaina i metil estra 3 $\alpha$ -acetil-7-monoketoholne kiseline u CDCl<sub>3</sub>.

$n = 1$

$K = 1 / (\text{tg}\alpha (\delta_2 - \delta_1)) = \text{odsečak} / \text{tg}\alpha = 5.3858 \text{ ppm}^{-1} / 0.5753 \text{ ppm}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} = 9.36 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$

#### 4.2.3.1.11. Ravnotežna konstanta vodonične veze između metil estra 3,7,12-triketoholne kiseline i lidokaina

Tabela 4.18. Hemijsko pomeranje amidnog protona lidokaina u prisustvu metil estra 3,7,12-triketoholne kiseline

$c_{\text{žK}}^0$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	$1/c_{\text{žK}}^0$ [dm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> ]	$\delta$ [ppm]	$\delta - \delta_1$ [ppm]	$1/(\delta - \delta_1)$ [ppm <sup>-1</sup> ]
15	66.66	8.9406	0	
30	33.33	8.9406	0	
45	22.22	8.9406	0	
50	20	8.9503	0.0097	103.09
75	13.33	8.9503	0.0097	103.09

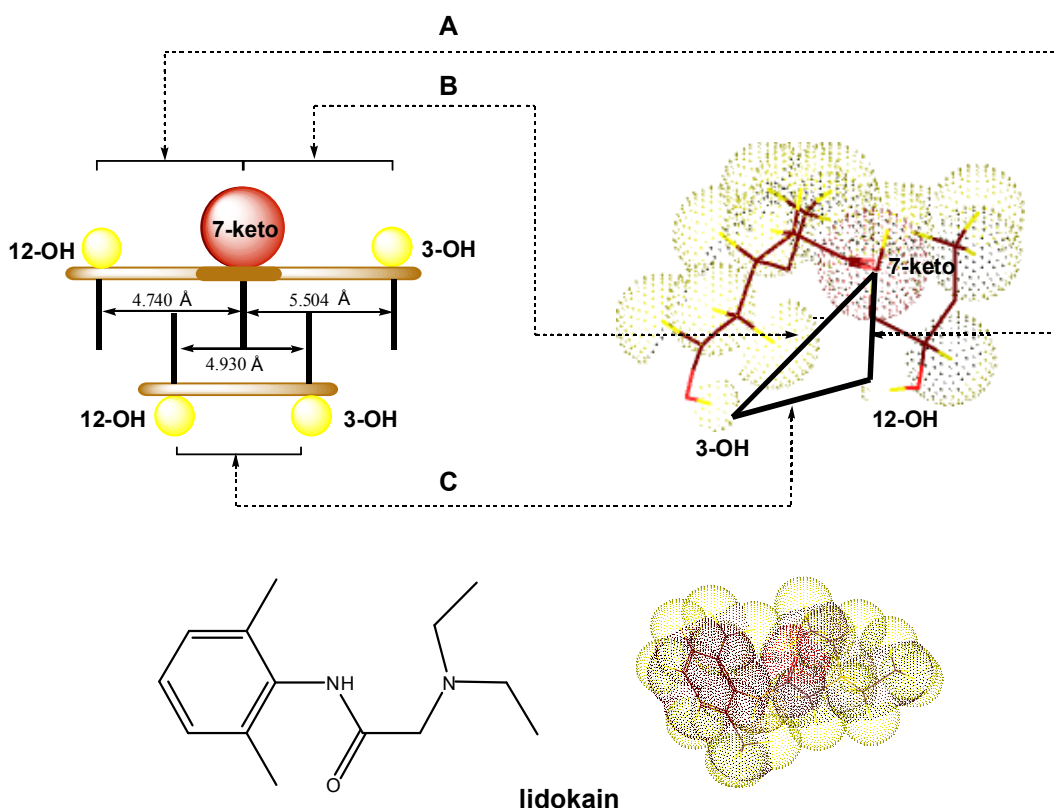
$\delta_1=8.9406$  ppm

Tabela 4.19. Zbirna tabela: Vrednosti ravnotežne konstante građenja kompleksa lidokaina i ispitivanih molekula

Ispitivani molekuli	$K$ [dm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> ]
metanol	0.00
aceton	0.00
3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroksi-7-keto-5 $\beta$ -holanska kiselina (7-monoketoholna kiselina)	14.22
3,7,12-triketo-5 $\beta$ -holanska kiselina (3,7,12-triketoholna kiselina)	8.15
3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\beta$ -holanska kiselina (henodeoksiholna kiselina)	3.77
3 $\alpha$ -hidroksi-7-keto-5 $\beta$ -holanska kiselina (7-monoketohenodeoksiholna kiselina)	6.50
3 $\alpha$ -hidroksi-12-keto-5 $\beta$ -holanska kiselina (12-monoketodeoksiholna kiselina)	9.45
3,12-diketo-5 $\beta$ -holanska kiselina (3,12-diketodeoksiholna kiselina)	6.33
7,12-diketo-5 $\beta$ -holanska kiselina (7,12-diketoholna kiselina)	4.66
metil estar 3 $\alpha$ -acetoksi-12 $\alpha$ -hidroksi-7-keto-5 $\beta$ -holanske kiseline	9.36
3 $\alpha$ -acetoksi-7,12-diketo-5 $\beta$ -holanska kiselina	4.44
3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -diacetoksi-7-keto-5 $\beta$ -holanska kiselina	2.04
metil estar 3,7,12-triketo-5 $\beta$ - holanske kiseline	0.00

#### 4.2.3.1.12. Korelacija strukture žučne kiseline sa vrednostima ravnotežne konstante nastajanja kompleksa sa vodoničnim vezama žučne kiseline i lidokaina

Prilikom  $^1\text{H}$  NMR merenja zapaženo je da pomeranje signala amidnog protona lidokaina u rastvoru hloroforma ne dolazi u prisustvu acetona i metanola, dok u prisustvu žučnih kiselina dolazi (Tabela 4.19.). Ovo se može objasniti time što žučne kiseline za vezivanje lidokaina koriste više od jedne funkcionalne grupe, pa se javlja efekat susednih grupa kao i entropijski efekat zbog međusobne blizine vezivnih grupa [40].



Slika 4.32. Linearni model  $\alpha$ -strane steroidnog skeleta 7-monoketoholne kiseline (žute sfere označavaju van der Wals-ove zapremine vodonika) i struktura lidokaina.

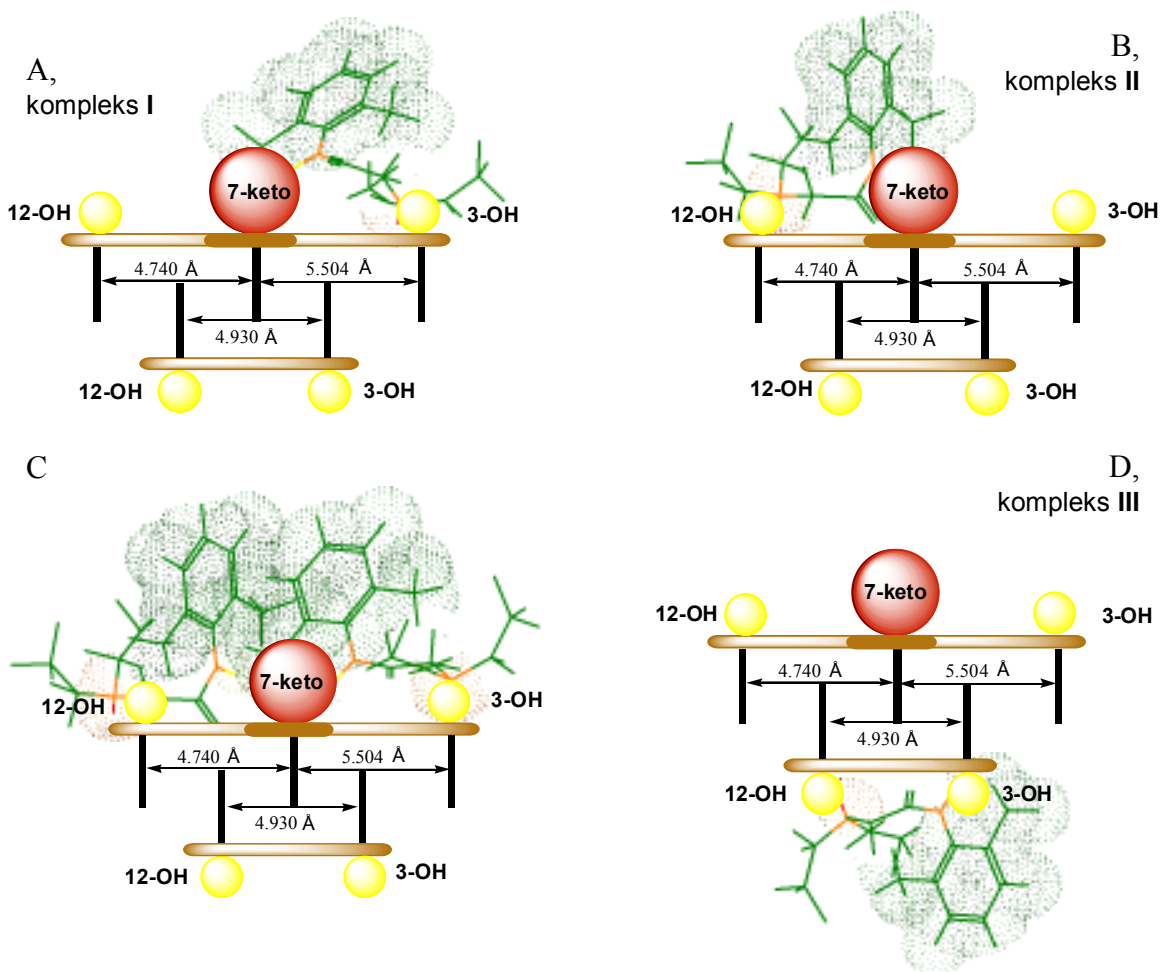
Od ispitivanih keto derivata žučnih kiselina najveću vrednost ravnotežne konstante građenja kompleksa sa lidokainom ima 7-monoketoholna kiselina ( $K=14.22 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}$ ). Za lakše razumevanje načina vezivanja lidokaina za 7-monoketoholnu kiselinu u ovom radu je dat linearni model pretpostavljene prostorne oblasti vezivanja žučne kiseline. Na Slici 4.32. predstavljen je linearni model  $\alpha$ -strane steroidnog sistema 7-monoketoholne kiseline sa odgovarajućim rastojanjima između funkcionalnih grupa. Sa **A** je označeno najkraće rastojanje između C7 keto grupe i protona C12 OH grupe (4.740 Å), koje se dobija pomoću 3D modela 7-monoketoholne kiseline (energetski najpovoljnija) i ova struktura je dobijena prema MOPAK protokolu. Oznaka **B** predstavlja najkraće rastojanje između protona C3 OH grupe i C7 keto grupe (5.504 Å).



Oznakom **C** je predstavljeno rastojanje između protona OH grupe vezane za C7 i protona OH grupe vezane za C12 ugljenik (4.930 Å).

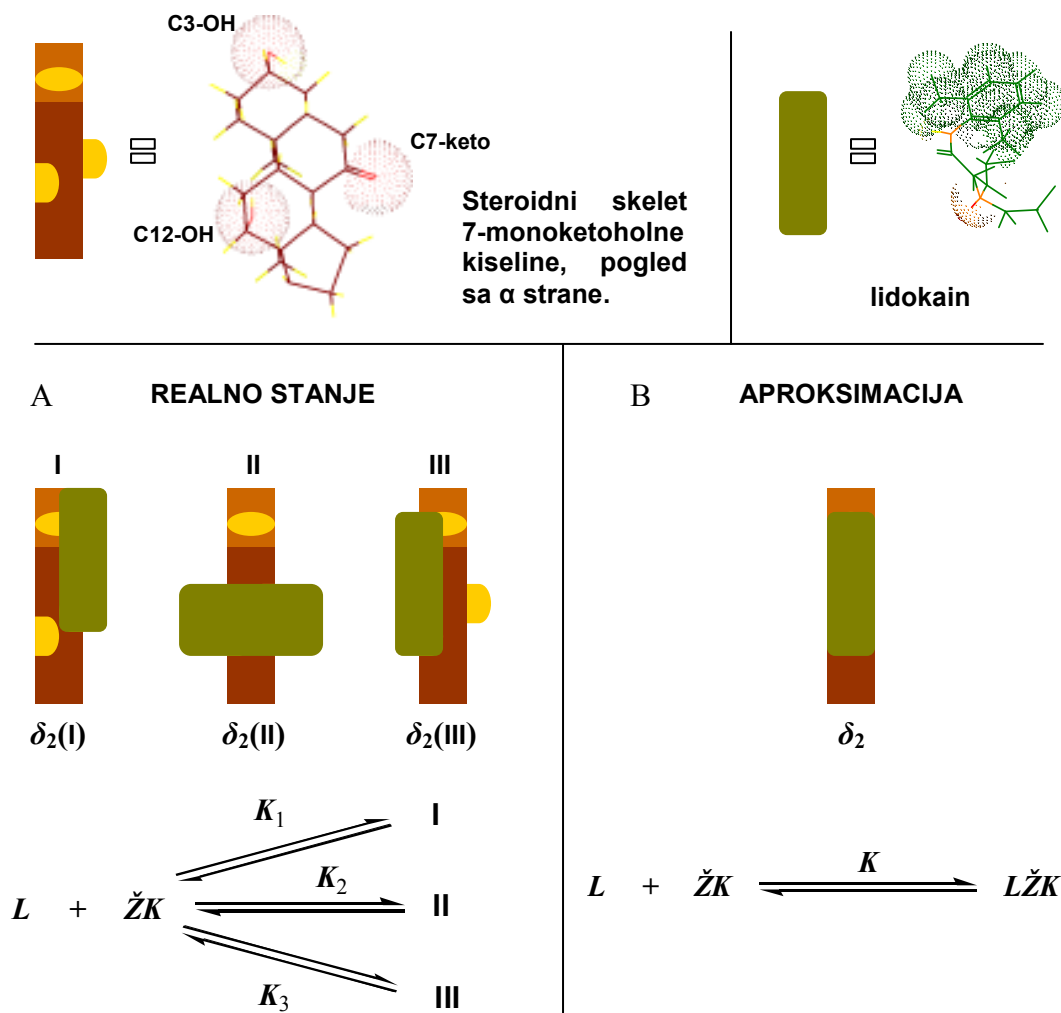
Ukoliko se lidokain nalazi u energetske najstabilnijoj konformaciji onda je rastojanje između centra amidnog azota i centra tercijarnog amina 2.967 Å, koje se u toku njegovog vezivanja za žučnu kiselinu može menjati, pošto prema Livingstone-u [124] energija vezivanja dozvoljava postojanje i energetske manje stabilnih konformacija.

Vezivanje lidokaina za 7-monoketoholnu kiselinu je moguće na više načina i na Slici 4.33. A predstavljeno je vezivanje lidokaina za 7-monoketoholnu kiselinu gde se amidni proton lidokaina vezuje za proton akceptorsku C7 keto grupu, dok se elektronski par tercijarnog azota ispitivanog leka vezuje za vodonik C3 OH. Tercijarni azot lidokaina takođe može da gradi vodoničnu vezu i sa protonom C12 OH grupe 7-monoketoholne kiseline (Slika 4.33. B). Predpostavlja se, da istovremeno vezivanje dva molekula lidokaina za 7-monoketoholnu kiselinu, gde su njihovi amidni protoni vezani za C7 keto grupu, a njihovi tercijarni amini za C3 odnosno C12 OH grupe nije moguće zbog repulzivnih interakcija diortofenilnih grupa u okolini keto grupe (Slika 4.33. C).



Slika 4.33. Stereohemija vezivanja lidokaina za 7-monoketoholnu kiselinu (žute sfere označavaju van der Wals-ove zapremine vodonika).

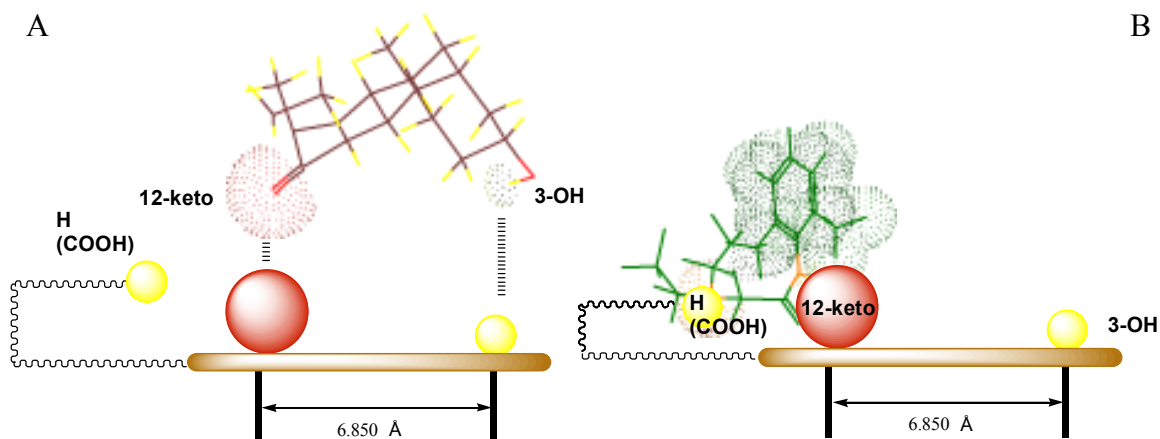
Lidokain se može vezati za 7-monoketoholnu kiselinu i preko dve OH grupe (C3 i C7) kao što je prikazano na Slici 4.33. D. Međutim, ovaj način vezivanja ispitivanog leka verovatno je od manjeg značaja u odnosu na vezivanje gde učestvuje i keto grupa, pošto OH grupa ima manju proton akceptorsku sposobnost. Vezivanje lidokaina preko dve OH grupe 7-monoketoholne kiseline je moguće ukoliko se ispitivani lek još nije vezao preko C7 keto grupe, pošto tada u vezivanju lidokaina učestvuje i jedna OH (proton) grupa sa C3 ili C12 ugljenika (Slika 4.33 A i B).



Slika 4.34. Monomeri kompleksa lidokaina i 7-monoketoholne kiseline.

Na osnovu gore izloženog može se predpostaviti da postoje tri vrste kompleksa lidokaina i 7-monoketoholne kiseline, gde se za ispitivanu žučnu kiselinu vezuje 1 molekul leka. To su kompleksi gde se amidni proton lidokaina vezuje za C7 keto grupu, dok se tercijarni azot (elektronski par) vezuje za proton C3 OH grupe (Slika 4.33. A, kompleks I) ili za proton C12 OH grupe (Slika 4.33. B, kompleks II). Kod poslednjeg kompleksa u vezivanju leka učestvuju samo OH grupe (Slika 4.33. D, kompleks III). Ovo znači da hemijsko pomeanje  $\delta_2$  amidnog protona lidokaina u vodoničnoj vezi (jednačina 4.15) predstavlja srednje (prosečno) hemijsko pomeranje za tri moguća kompleksa  $\delta_2(I)$  za kompleks I,  $\delta_2(II)$  za kompleks II i  $\delta_2(III)$  za kompleks III (Slika 4.34. A). Od tri

navedena hemijska pomeranja verovatno su  $\delta_2(\text{I})$  i  $\delta_2(\text{II})$  veća od  $\delta_2(\text{III})$  pošto je OH grupa slabiji proton akceptor od keto grupe (keto grupa ima veći dipolni momenat). Svakako da su ova hemijska pomeranja vrlo bliska, pa se u eksperimentu registruje njihov srednji signal  $\delta_2$  (Slika 4.34. B) zajedno sa signalom amidnog protona slobodnog lidokaina  $\delta_1$  (jednačina 4.15). Isto tako, između kompleksa I, II i III postoji ravnoteža preko zajedničkog depoa žučne kiseline i lidokaina (Slika 4.34. A). Prilikom ovih merenja određuje se srednja vrednost ravnotežne konstante  $K$  građenja kompleksa između lidokaina i 7-monoketoholne kiseline (Slika 4.34. B), čija je vrednost verovatno najbliža vrednostima  $K_1$  i  $K_2$  i koje odgovaraju građenju kompleksa kada keto grupa gradi vodoničnu vezu sa amidnim protonom lidokaina. Ovo potvrđuje i eksperiment gde je određena vrednost ravnotežne konstante kompleksa lidokaina i metil estra 3 $\alpha$ -acetoksi-12 $\alpha$ -hidroksi-5 $\beta$ -holanske kiseline ( $K=9.36 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}$ ) čija je vrednost relativno velika. Kod ove žučne kiseline proton C3 OH grupe je zamenjen sa acetilnom funkcijom, što znači da kompleks I i kompleks III ne mogu da nastanu, jedino se kompleks II može formirati (Slika 4.34. A i Slika 4.33. B). Velika vrednost ravnotežne konstante  $K$  kod 7-monoketoholne kiseline se može protumačiti i sa stanovišta statističke termodinamike [190] gde je neko makroskopsko stanje utoliko verovatnije ukoliko ima više mikrostanja. Ovde monomeru<sup>5</sup> vodonično vezanog kompleksa lidokaina i 7-monoketoholne kiseline odgovaraju tri mikrostanja (I, II i III) (Slika 4.34. A), dok kod ostalih keto derivata ispitivanih žučnih kiselina postoji samo jedno mikrostanje.



Slika 4.35. Stereohemija vezivanja lidokaina za 12-monoketodeoksiholnu kiselinu (žute sfere označavaju van der Wals-ove zapremine vodonika).

Kod 12-monoketodeoksiholne kiseline najkraće rastojanje između C12 keto grupe i protona C3 OH grupe je  $6.850 \text{ \AA}$  što je preveliko rastojanje da bi istovremeno i amidni proton i elektronski par azota tercijarnog amida lidokaina učestvovali u vodoničnoj vezi (Slika 4.35. A). Rezultat većeg rastojanja između kiseonika 12-keto grupe i protona C3 hidroksilne grupe 12-monoketodeoksiholne kiseline u odnosu na rastojanje između dva protona OH grupa sa C3 i C12 ugljenika kod 7-monoketoholne kiseline je posledica pomeranja kiseonika keto grupe prema srednjoj ravni steroidnog skeleta sa kojom

<sup>5</sup> U ovom radu termin monomer osnačava vezivanje lidokaina i žučne kiseline u odnosu 1 : 1.

zaklapa ugao od  $45^\circ$ , dok kiseonik aksijalne OH grupe zaklapa  $90^\circ$ . Da bi se lidokain vezao za 12-monoketodeoksiholnu kiselinu u hlorofomu potrebne su dve funkcionalne grupe, što potvrđuju naši eksperimenti sa acetonom i metanolom, kod kojih nije došlo do pomeranja signala amidnog protona ispitivanog leka. Kod 12-monoketodeoksiholne kiseline pored C12 keto grupe druga funkcionalna grupa koja može da bude uključena u vezivanje lidokaina je karboksilna OH grupa bočnog niza. Naime, odavno je poznato da karboksilna funkcija bočnog niza može da gradi vodonične veze sa grupama u položaju C12 [191], kao i da učestvuje u odgovarajućim reakcijama sa istim grupama iz položaja C12 i C11 [48]. Na Slici 4.35. B prikazano je vezivanje lidokaina za 12-monoketodeoksiholnu kiselinu gde je amidni proton vezan vodoničnom vezom za keto grupu dok je tercijarni amin vezan vodoničnom vezom za karboksilnu OH grupu bočnog niza. Na Slici 4.32. nije predstavljeno rastojanje između protona COOH grupe i kiseonika keto grupe, pošto dužina ovog rastojanja varira zbog fleksibilnosti (slobodna rotacija) bočnog niza. Prema tome, lidokain se za ovu žučnu kiselinu vezuje u odnosu 1:1, monomerni oblik, (Slika 4.35. B). Kod 12-monoketodeoksiholne kiseline postoji samo jedna vrsta monomernog oblika za razliku od 7-monoketoholne kiseline sa tri monomerna oblika.

Kompleks 3,7,12-triketoholne kiseline i lidokaina ( $K=8.15 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}$ ) takođe predstavlja monomerni tip (1:1 stehiometriju) kao i kompleks kod 12-monoketodeoksiholne kiseline (Slika 4.35. B), pošto jedino keto grupa sa C12 ima u svojoj okolini OH grupu iz COOH bočnog niza. Ovo potvrđuje i eksperiment sa metil estrom 3,7,12-triketoholne kiseline (Tabela 4.19.), gde nije došlo do promene položaja signala amidnog protona lidokaina, što takođe potvrđuje da je za vezivanje lidokaina potrebno prisustvo dve funkcionalne grupe koje se međusobno nalaze na odgovarajućim rastojanjima, i da jedna grupa pored keto mora da bude hidroksilna.

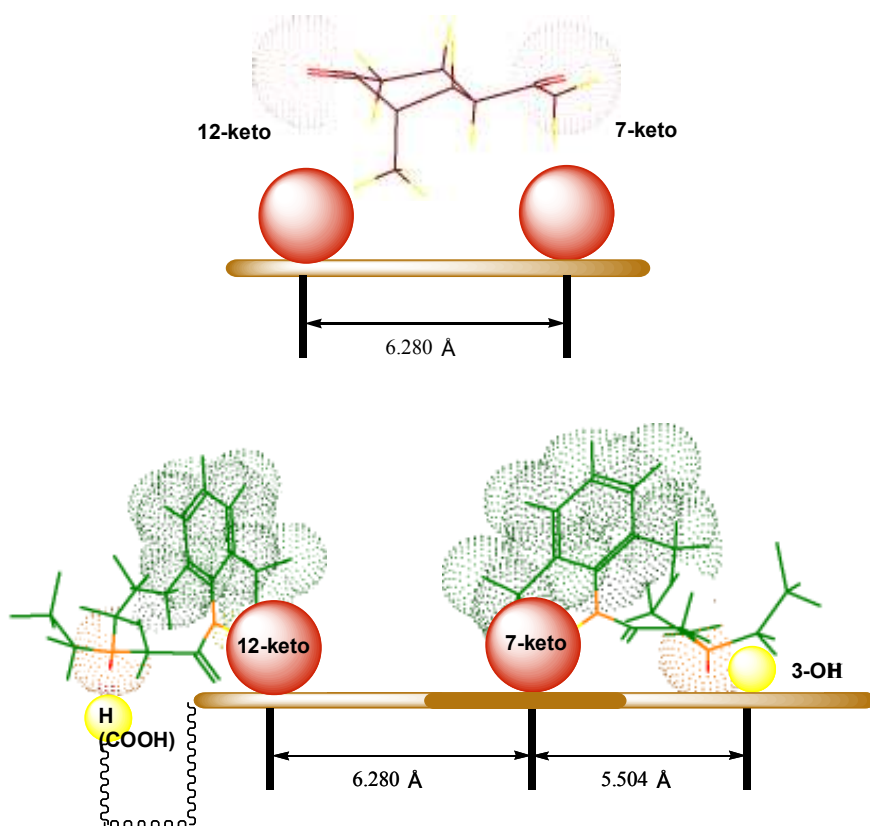
3,12-Diketodeoksiholna kiselina sa lidokainom gradi kompleks sa vodoničnim vezama ( $K=6.33 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}$ ) koji je istog tipa kao kod 12-monoketodeoksiholne i 3,7,12-triketoholne kiseline. Kod ova tri keto derivata postoji sledeći niz za vrednosti  $K$ :

$$3,12\text{-diketodeoksiholna } k. < 3,7,12\text{-triketoholna } k. < 12\text{-monoketodeoksiholna } k.$$

Iako kod sve tri kiseline u gornjem nizu postoji zajednički strukturni element za vezivanje lidokaina (Slika 4.35. B), ipak one imaju različite vrednosti za konstantu  $K$ . Ovo ukazuje da i ostale grupe koje direktno ne učestvuju u izgradnji vodonične veze imaju određeni efekat na vezivanje lidokaina. Najveći efekat ima OH grupa sa C3 ugljenika kod 12-monoketodeoksiholne kiseline. Njen efekat se ogleda verovatno u tome, da kao proton donor i proton akceptor pri sudaru sa molekulom lidokaina ona može da gradi vodoničnu vezu i sa amidnim protonom kao i sa azotom tercijarnog amina. Ovako nastali "prelazni" kompleks se reorganizuje rotacijom molekula lidokaina na površini ( $\alpha$ -strana) žučne kiseline u položaj gde se vezuje za C12 keto odnosno COOH grupu bočnog niza (Slika 4.35. B). Sledeća žučna kiselina po veličini vrednosti  $K$  u gornjem nizu je 3,7,12-triketoholna kiselina što ukazuje da veći broj keto grupa pogodno utiče na vrednost konstante. Ovo se takođe može objasniti teorijom sudara. Naime, amidni proton lidokaina prvo može da se veže za keto grupu C7 ugljenika, a potom se lidokain premešta na deo površine žučne kiseline sa grupama gde se istovremeno vezuje i amidni proton odnosno tercijarni azot.

Kod 7-monoketohenodeoksiholne kiseline rastojanje između protona C3 OH grupe i kiseonika C7 keto grupe je 5.504 Å, što je identično sa rastojanjem istih grupa kod 7-monoketoholne kiseline, iz čega proizlazi da kompleks ( $K=6.50 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}$ ) lidokaina i 7-monoketohenodeoksiholne kiseline ima 1 : 1 stehiometriju (monomerni tip).

Henodeoksiholna kiselina sa lidokainom gradi monomerni kompleks (1:1) čija je ravnotežna konstanta  $K=3.77 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}$ , što znači da ima manji afinitet za vezivanje lidokaina od ostalih žučnih kiselina gde postoji i keto grupa pored hidroksilne odnosno karboksilne grupe. Oblast vezivanja henodeoksiholne kiseline je OH grupa sa C3 i OH grupa sa C7 ugljenika. Kiseonici ovih OH grupa su međusobno udaljeni 4.41 Å.



Slika 4.36. Stereohemija vezivanja lidokaina za 7,12-diketoholnu kiselinu (žute sfere označavaju van der Waals-ove zapremine vodonika).

Kod 7,12-diketoholne kiseline rastojanje između protona C3 OH grupe i kiseonika C12 keto grupe je 6.830 Å, što znači da OH grupa sa C3 i keto grupa sa C12 ne mogu da formiraju vezivnu regiju molekula. Ovo rastojanje je isto kao i rastojanje istih grupa kod 12-monoketodeoksiholne kiseline (Slika 4.35. B), pa stoga lidokain ne može da gradi vodoničnu vezu istovremeno sa obe grupe. Međutim rastojanje između protona C3 OH grupe i kiseonika C7 keto grupe (5.504 Å) dozvoljava građenje dve vodonične veze između lidokaina i 7,12-diketoholne kiseline (Slika 4.36. B). Slika 4.36. A predstavlja linearni model okoline C7 i C12 keto grupe, najkraće rastojanje između dva kiseonika keto grupa je 6.280 Å, što omogućuje istovremeno vezivanje dva molekula

lidokaina, bez repulzivnih sternih interakcija (Slika 4.36. B). Drugi molekul lidokaina se vezuje za regiju 7,12-diketoholne kiseline koja je identična sa regijom vezivanja lidokaina kod 12-monoketodeoksiholne kiseline, 3,7,12-triketoholne kiseline i 3,12-diketodeoksiholne kiseline. (Slika 4.36. B i Slika 4.35. B).

Kod 7-monoketoholne kiseline lidokain bi se mogao vezati takođe vodoničnim vezama za C12 hidroksilnu i karboksilnu grupu bočnog niza kao kod 12-monoketodeoksiholne, 3,7,12-triketoholne i 3,12-diketodeoksiholne kiseline, što bi značilo vezivanje 2 molekula lidokaina za 7-monoketoholnu kiselinu. Drugi molekul lidokaina vezao bi se za C3 OH i C7 keto grupu, međutim mi smo ovo vezivanje odbacili odnosno smatramo da je malo verovatno iz sledećih razloga:

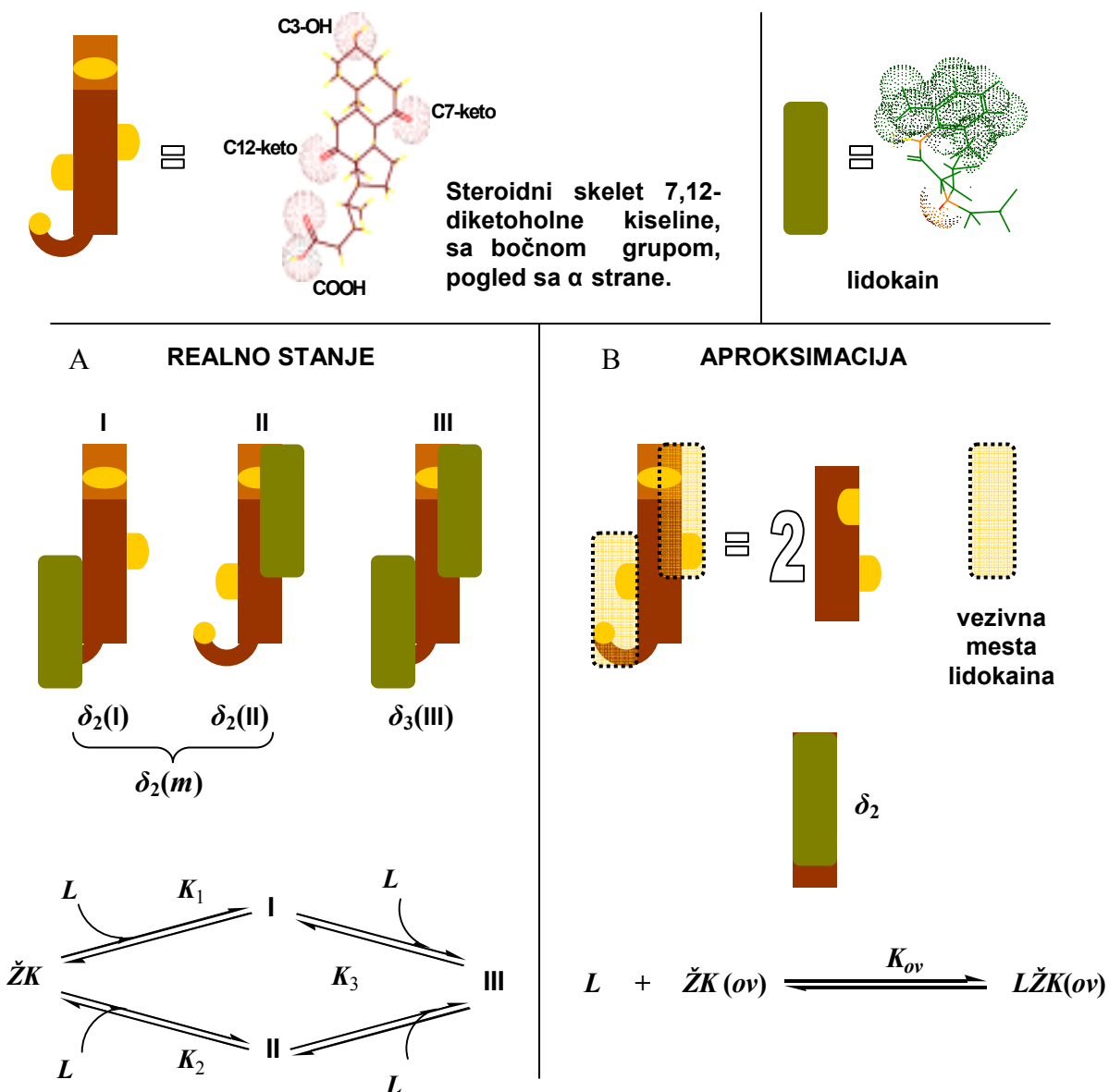
- Kod 7-monoketoholne kiseline C12 OH grupa učestvuje u vezivanju lidokaina zajedno sa C7 keto grupom (Slika 4.33. B, kompleks II).
- Isto tako C12 OH grupa zajedno sa C3 OH grupom takođe učestvuju u vezivanju lidokaina (Slika 4.33. D, kompleks III).
- Struktura kompleksa II je naročito favorizovana pošto u vezivanju lidokaina učestvuje i keto grupa, što potvrđuju i merenja sa metil estrom 3 $\alpha$ -acetil-7-monoketoholne kiseline. Naime, lidokain i metil ester 3 $\alpha$ -acetil-7-monoketoholne kiseline grade kompleks sa vodoničnim vezama čija je konstanta ravnoteže relativno velika ( $K=9.36 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ ). Kod ove žučne kiseline proton C3 OH grupe je zamenjen sa acetilnom funkcijom, što znači da kompleks I i kompleks III ne mogu da nastaju, jedino kompleks II (Slika 4.33. B), što potvrđuje zauzetost OH grupe sa C12.

Stoga je malo verovatno formiranje kompleksa 7-monoketoholne kiseline i lidokaina u stehiometrijskom odnosu 1 : 2.

Kod 7,12-diketoholne kiseline postoje sledeći kompleksi sa lidokainom:

- Vodonični kompleks I gde je lidokain vezan pomoću C12 keto grupe i COOH grupe bočnog niza. Hemijsko pomeranje amidnog protona u ovom kompleksu je  $\delta_2(\text{I})$  (Slika 4.37. A).
- Drugi tip kompleksa je takođe monomerni kompleks II, gde u vezivanju lidokaina učestvuje C7 keto i C3 hidroksilna grupa. U ovom kompleksu hemijsko pomeranje amidnog protona lidokaina je  $\delta_2(\text{II})$  (Slika 4.37. A).
- Treća vrsta kompleksa je dimerni<sup>6</sup> tip (kompleks III) gde se prvi molekul lidokaina vezuje za C12 keto i COOH grupe ispitivane žučne kiseline, dok drugi molekul se vezuje za C7 keto i C3 OH grupe (Slika 4.37. A).

<sup>6</sup> U ovom radu termin dimerni kompleks osnačava vezivanje lidokaina i žučne kiseline u odnosu 2 : 1.



Slika 4.37. Kompleksi lidokaina i 7,12-diketoholne kiseline.

Za hemijsko pomeranje amidnog protona u kompleksu I i II se može pretpostaviti da su međusobno identični (Slika 4.37. A):

$$\delta_2(\text{I}) = \delta_2(\text{II}) = \delta_2(m) \quad (4.19)$$

Isto tako hemijsko pomeranje amidnog protona lidokaina  $\delta_3(\text{III})$  u dimernom kompleksu III odgovara hemijskom pomeranju  $\delta_2(\text{I})$  i  $\delta_2(\text{II})$  pošto su molekuli lidokaina kod dimernog kompleksa vezani za iste regije kao kod monomernog oblika I i II.

$$\delta_2(m) = \delta_3(\text{III}) = \delta_2 \quad (4.20)$$

Srednje hemijsko pomeranje  $\delta$  (jednačina 4.21) amidnog protona lidokaina koje se registruje u toku  $^1\text{H}$  NMR merenja za realni sistem (Slika 4.37. A), dato je sledećom jednačinom:

$$c_L^0 \delta = c_L \delta_1 + c_{L\check{Z}K_m} \delta_2(m) + 2 c_{L\check{Z}K_d} \delta_3(\text{III}) \quad (4.21)$$

U gornjoj jednačini  $c_{L\check{Z}K_m}$  predstavlja ravnotežnu koncentraciju kompleksa I i II (njihova zbirna koncentracija), dok  $c_{L\check{Z}K_d}$  je ravnotežna koncentracija kompleksa III. U jednačini (4.21) ravnotežna koncentracija dimernog kompleksa ( $c_{L\check{Z}K_d}$ ) se množi sa 2, pošto jedan mol kompleksa III sadrži 2 mola lidokaina. Ukoliko se primeni uslov iz jednakosti (4.20), tada će jednačina (4.21) imati sledeći oblik:

$$c_L^0 \delta = c_L \delta_1 + c_{L\check{Z}K_m} \delta_2 + 2 c_{L\check{Z}K_d} \delta_2 \quad (4.22)$$

Odnosno:

$$c_L^0 \delta = c_{LH} \delta_1 + (c_{L\check{Z}K_m} + 2 c_{L\check{Z}K_d}) \delta_2 \quad (4.22a)$$

U gornjem izrazu ( $c_{L\check{Z}K_m} + 2 c_{L\check{Z}K_d}$ ) predstavlja ukupnu koncentraciju lidokaina u ravnotežnom stanju koja se nalazi u monomernom kompleksu i može se izraziti kao razlika ukupne koncentracije lidokaina  $c_L^0$  i ravnotežne koncentracije slobodnog lidokaina  $c_L$ : ( $c_{L\check{Z}K_m} + 2 c_{L\check{Z}K_d}$ ) =  $c_L^0 - c_L$ . Tako da se jednačina (4.22a) svodi na već poznatu jednačinu (4.15, strana 114).

Da bi se mogla rešiti jednačina (4.15) uz uslove postojanja ravnoteže između slobodnog lidokaina i kompleksa I i II, odnosno istih kompleksa monomera i kompleksa III (dimerni oblik), u ovom radu se molekul 7,12-diketoholne kiseline aproksimira sa svojim oblastima vezivanja lidokaina, a to su C3 OH grupa sa C7 karbonilnom grupom kao prva oblast vezivanja odnosno C12 karbonilna grupa sa OH grupom bočne karboksilne grupe kao druga oblast vezivanja, tako da se posmatra ravnoteža između vezivnih oblasti žučne kiseline  $\check{Z}K_{(ov)}$  i molekula lidokaina (Slika 4.37. B). Prema tome koncentracija oblasti vezivanja lidokaina 7,12-diketoholne kiseline  $c_{ov}$  je dva puta veća od koncentracije iste žučne kiseline  $c_{\check{Z}K}^0$ :

$$2 c_{\check{Z}K}^0 = c_{ov} \quad (4.23)$$

Konstanta ravnoteže kompleksa lidokaina i oblasti vezivanja 7,12-diketoholne kiseline  $K_{ov}$  se dobija ako se jednakost (4.23) uvede u jednačinu (4.14):

$$K_{ov} = \frac{1}{2} K \quad (4.24)$$

$K$  je konstanta ravnoteže monomernog kompleksa lidokaina i ispitivane žučne kiseline, kada isključivo nastaju kompleksi tipa 1 : 1, i tada je  $K_{ov} = 2.33 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$  dok je  $K = 4.66 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ . Manja vrednost  $K_{ov}$  od vrednosti  $K$  kod ostalih ispitivanih žučnih kiselina (Tabela 4.20.) je verovatno posledica da kada molekul lidokaina prilazi kompleksu I i II



7,12-diketoholne kiseline (Slika 4.37. A) tada već vezani molekul lidokaina otežava prilaz novom molekulu ka vezivnoj oblasti, što znači da su realne konstante  $K_1$  i  $K_2$  formiranja monomernih kompleksa I i II znatno veće od vrednosti konstante  $K_3$  formiranja dimernog kompleksa III. Vrednosti konstante  $K_{ov}$  dobijene iz eksperimentalnih rezultata daju prosečne vrednosti  $K_1$ ,  $K_2$  i  $K_3$ .

Vrednost ravnotežne konstante kompleksa lidokaina i 3 $\alpha$ -acetil-7,12-diketoholne kiseline je  $K = 4.44 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ . Kod ove kiseline proton u akceptorsko-donorskoj OH grupi je zamenjen acetilnom proton akceptorskom grupom, tako da sada ova kiselina ima samo jednu vezivnu regiju za lidokain, C12 keto grupu i COOH grupu bočnog niza. Prema tome, ova žučna kiselina gradi monomerni tip kompleksa. Manja vrednost ravnotežne konstante u odnosu na ostale keto derivate ispitivanih žučnih kiselina je verovatno posledica sterne interakcije. Naime, voluminozna acetilna grupa na C3 ugljeniku otežava prilaz lidokainu ka  $\alpha$ -strani ispitivane žučne kiseline. Ukoliko ispitivana žučna kiselina sadrži dve acetilne grupe kao kod 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -diacetil-7-monoketoholne kiseline ( $K = 4.44 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ ) onda vrednost ravnotežne konstante opada verovatno zbog sternih smetnji. Vezivnu oblast za lidokain kod 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -diacetil-7-monoketoholne kiseline čine OH grupa bočne karboksilne funkcije i proton akceptorska C12 acetoksi grupa.

Za indirektnu potvrdu povezanosti ravnotežne konstante kompleksa lidokaina sa vezivnim oblastima žučnih kiselina u ovom radu se koriste regresione jednačine ravnotežne konstante kao funkcije topoloških deskriptora.

Topološki parametri žučnih kiselina se dobijaju pomoću programa 3D Chem Drew 7.0. Od topoloških parametara se koriste oni deskriptori [120,121] koji opisuju ispitivane žučne kiseline u celosti: Winer-ov indeks (*Wind*), ovalnost (*Oval*), topološki indeks molekula (*MTI*), strukturni atribut (*SAtrib*), kao i oni deskriptori koji opisuju određene delove molekula žučne kiseline (oblasti vezivanja): rastojanje između kiseonika C3 i C7 ugljenika ( $d(o3-o7)$ ), rastojanje između kiseonika C3 i C12 ugljenika ( $d(o3-o12)$ ), rastojanje između kiseonika C7 i C12 ugljenika ( $d(o7-o12)$ ). Za razlikovanje tipa kiseonika koji su vezani za C3, C7 i C12 ugljenikove atome u ovom radu su uvedene sledeće numeričke vrednosti. Ako atom kiseonika pripada OH grupi onda je njegova numerička vrednost 1, ako kiseonik pripada keto grupi, tada je njegova numerička vrednost 2, dok kiseoniku acetilne grupe odgovara 3. Ako nema kiseonika na gore naznačenim C atomima tada je numerička vrednost jednaka 0 [118].

Tabela 4. 20. Vrednosti topoloških deskriptora žučnih kiselina

Ž.K.	$K$	$d(o3-o7)$	$d(o3-o12)$	$d(o7-o12)$	$g_3$	$g_7$	$g_{12}$	<i>Oval</i>	<i>MTI</i>	<i>WInd</i>	<i>SAtrib</i>
	[ $\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ ]	[Å]									
1	14,22	6,05	5,05	5,02	1,00	2,00	1,00	1,78	14772,00	2045,00	27,03
2	9,45	0,00	7,46	0,00	1,00	0,00	2,00	1,39	13966,00	1901,00	26,04
3	8,15	6,29	7,69	6,22	2,00	2,00	2,00	1,40	14772,00	2045,00	27,03
4	6,50	6,03	0,00	0,00	1,00	2,00	0,00	1,39	14016,00	1910,00	26,04
5	6,33	0,00	7,76	0,00	2,00	0,00	2,00	1,39	13966,00	1901,00	26,04
6	3,77	4,41	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,38	14016,00	1910,00	26,04
7	4,44	6,06	7,35	6,23	3,00	2,00	2,00	1,46	20004,00	2800,00	30,03

U gornjoj tabeli  $g_3$ ,  $g_7$ ,  $g_{12}$  označavaju vrstu kiseonika na C3, C7 i C12 ugljeniku, dok brojevi predstavljaju ispitivane žučne kiseline: 1: 7-MKH; 2: 12-MKDK; 3: 3,7,12-TKH; 4: 7-MKHDK; 5: 3,12-DKDK; 6: HDK; 7: 3 $\alpha$ -Ac-7,12-DKH.

Na osnovu podataka iz Tabele 4.20. pomoću regresione metode eliminisanja od kraja [118,192] dobija se sledeća višestruka linearna regresiona jednačina:

$$K = -16.46 - 0.53 d(o7-o12) - 3.94k_3 + 2.53g_7 + 4.21g_{12} + 15.71Oval \quad (4.25)$$

$$n = 7, \quad r = 0.992, \quad s_d = 0.76, \quad F = 25.11$$

Tabela 4.21. Vrednosti ravnotežne konstante formiranja kompleksa lidokaina dobivene na osnovu regresione jednačine (4.25)

Žučne kiseline	$K$ [dm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> ] (eksperimentalno)	$K$ [dm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> ] (izračunato)	$\Delta K$
7-monoketoholna kiselina	14.22	14.21	0.01
12-monoketodeoksiholna kiselina	9.45	9.86	-0.41
3,7,12-triketoholna kiselina	8.15	6.92	1.23
7-monoketohenodeoksiholna kiselina	6.50	5.22	1.28
3,12-diketodeoksiholna kiselina	6.33	6.75	-0.42
henodeoksihola kiselina	3.77	5.05	-1.28
3 $\alpha$ -acetoksi-7,12-diketoholna kiselina	4.44	4.84	-0.40

Iz Tabele 4.21 se vidi da vrednosti ravnotežne konstante kompleksa (sa vodoničnim vezama) lidokaina dobijenih na osnovu regresione jednačine (4.25) odstupaju od eksperimentalnih vrednosti, izuzev za kompleks lidokaina i 7-monoketoholne kiseline. Stoga u Tabelu 4.20. su dodane i vrednosti za deskriptor (*koef*) koji opisuje koliko 1:1 kompleksa lidokaina i žučne kiseline se može formirati kod svake ispitivane žučne kiseline. Kod 7-monoketoholne kiseline moguće je formirati tri 1:1 kompleksa (Slika 4.33.) i zato je vrednost deskriptora *koef* = 3, dok kod ostalih žučnih kiselina *koef* = 1. Ukoliko se ponovo primeni regresiona metoda eliminisanja od kraja [118,192] na proširenu Tabelu 4.20. (sa deskriptorom *koef*), onda se dobija sledeća regresiona jednačina:

$$K = 1.98 + 1.12 d(o3-o12) - 0.57 d(o7-o12) - 3.38g_3 - 2.46koef \quad (4.26)$$

$$n = 7, \quad r = 0.9999, \quad s_d = 0.068, \quad F = 3359.67$$

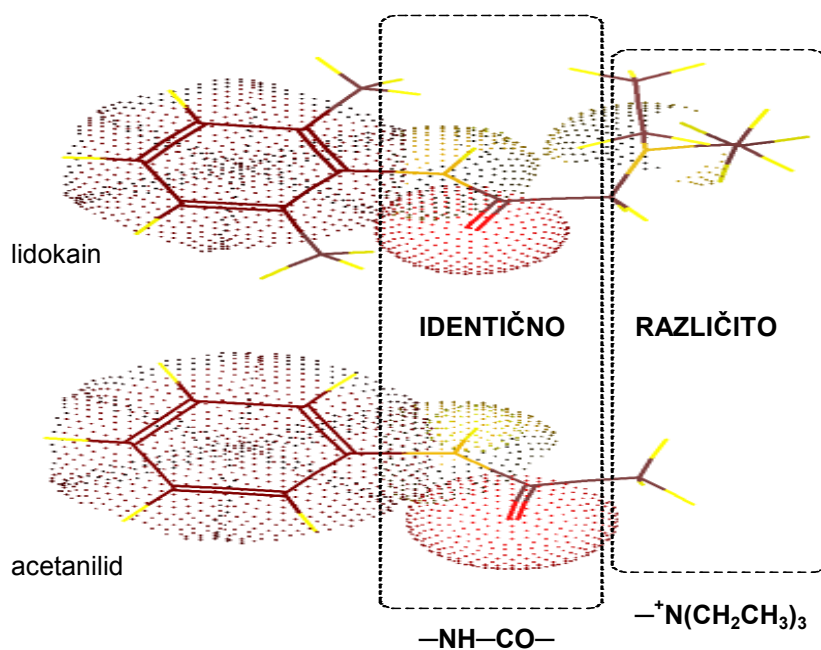
Tabela 4.22. Vrednosti ravnotežne konstante formiranja kompleksa lidokaina dobivene na osnovu regresione jednačine (4.26)

Žučne kiseline	$K$ [dm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> ] (eksperimentalno)	$K$ [dm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> ] (izračunato)	$\Delta K$
7-monoketoholna kiselina	14.22	14.22	0.00
12-monoketodeoksiholna kiselina	9.45	9.41	0.04
3,7,12-triketoholna kiselina	8.15	8.18	-0.03
7-monoketohenodeoksiholna kiselina	6.50	6.49	0.01
3,12-diketodeoksiholna kiselina	6.33	6.36	-0.03
henodeoksihola kiselina	3.77	3.77	0.00
3 $\alpha$ -acetoksi-7,12-diketoholna kiselina	4.44	4.41	0.03

Statistički podaci za regresionu jednačinu (4.26) su mnogo bolji od podataka za regresionu jednačinu (4.25). Iz Tabela 4.22. se vidi da se ravnotežne konstante izračunte preko jednačine (4.26) statistički ne razlikuju od eksperimentalno dobivenih vrednosti. Jednačina (4.26) potvrđuje značaj vezivnih oblasti žučnih kiselina pošto u jednačinu ulaze deskriptori oblasti vezivanja. Takođe jednačina (4.26) ukazuje na to da kod 7-

monoketoholne kiseline je moguće formirati tri kompleksa sa lidokainom stehiometrije 1:1, dok kod ostalih žučnih kiselina samo jedan.

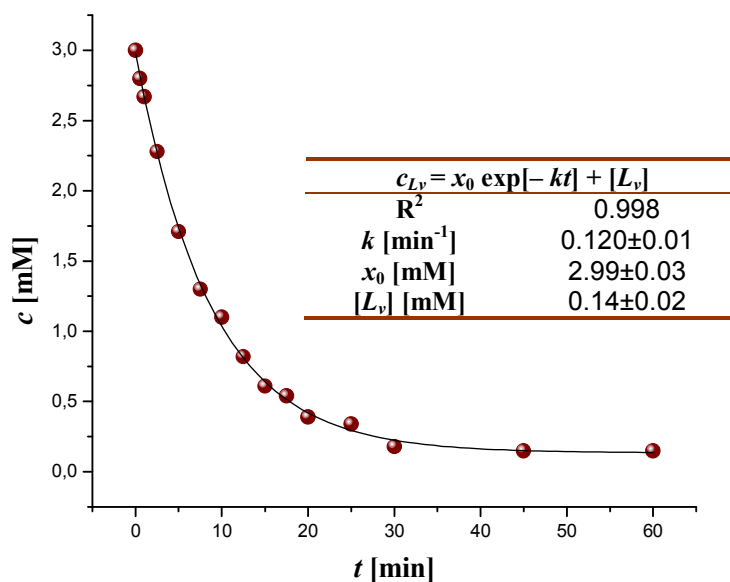
Kod eksperimenta gde je korišćen acetanilid umesto lidokaina sa ispitivanim žučnim kiselinama nije došlo do promene u položaju signala amidnog protona acetanilida u hloroformu ( $\text{CDCl}_3$ ). Ovi rezultati potvrđuju da molekul gosta mora da ima dve odgovarajuće funkcionalne grupe, odnosno da se lidokain veže za ispitivane žučne kiseline pomoću dve vodonične veze. Naime acetanilid, ima samo amidni proton kao i lidokain, ali mu nedostaje tercijarni azot (Slika 4.35.).



Slika 4.38. Struktura lidokaina i acetanilida.

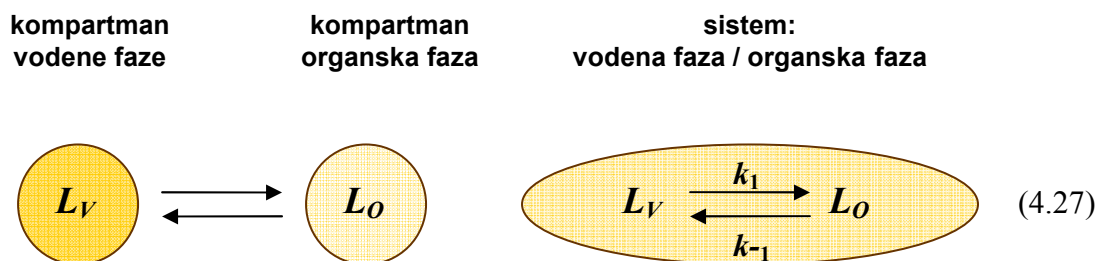
#### 4.2.3.2. UTICAJ ŽUČNIH KISELINA NA TRANSPORT ISPITIVANIH LEKOVA IZ VODENE FAZE I UTICAJ NA NJIHOVU ADSORPCIJU NA AKTIVNOM UGLJU

Promenu koncentracije lidokaina i verapamila u vodenoj fazi (pH 5.5; 6.5; 7.4) bez prisustva žučnih kiselina u organskoj fazi opisuje monoeksponencijalna funkcija (Slika 4.39.).



Slika 4.39. Promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5; bez žučnih kiselina u organskoj fazi.

Transfer lidokaina, odnosno verapamila iz vodene faze u organsku fazu se može analizirati primenom kompartmana ili posmatrati kao monomolekulska reverzibilna reakcija<sup>7</sup>. U ovom radu se koristi drugi slučaj.



Slika 4.40. Transfer ispitivanog leka iz vodene u organsku fazu.

<sup>7</sup> Ako se koristi kompartmanska analiza tada se za potpuni opis sistema moraju koristiti i odgovarajuće zapremine kompartmana, što dodatno komplikuje izvođenje eksperimenta.

Ako se posmatra reakcija (4.27) (Slika 4.40.), tada se promena koncentracije ispitivanog leka u vodenoj fazi može prikazati pomoću sledeće jednačine:

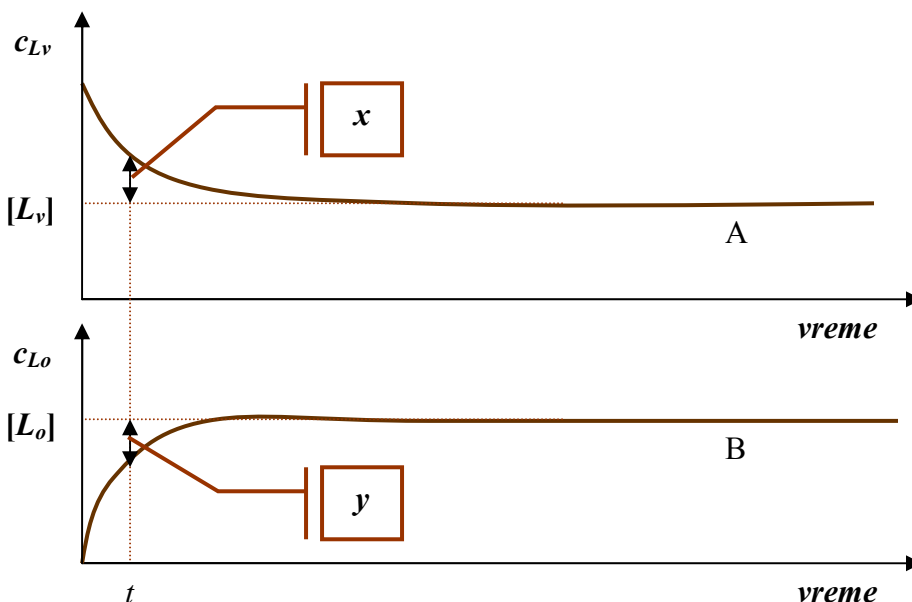
$$dc_{Lv}/dt = k_{-1}c_{Lo} - k_1c_{Lv} \quad (4.28)$$

U gornjoj jednačini  $c_{Lo}$  i  $c_{Lv}$  predstavljaju koncentracije ispitivanog leka u vodenoj odnosno organskoj fazi nakon vremena  $t$ ,  $k_{-1}$  je koeficijent brzine transfera leka iz organske u vodenu fazu dok je  $k_1$  koeficijent brzine transfera leka iz vodene u organsku fazu.

Ako je ravnotežna koncentracija ispitivanog leka u vodenoj odnosno organskoj fazi  $[L_v]$  i  $[L_o]$ , u nekom vremenu  $t$  (od početka eksperimenta) onda  $x$  i  $y$  predstavljaju odstupanja od ravnotežne koncentracije u vodenoj odnosno organskoj fazi (Slika 4.41.). Prema tome, koncentraciju leka u vremenu  $t$  možemo predstaviti na sledeći način:

$$\text{U vodenoj fazi: } c_{Lv} = [L_v] + x \quad (4.29)$$

$$\text{U organskoj fazi: } c_{Lo} = [L_o] - y \quad (4.30)$$



Slika 4.41.

Uvođenjem jednačina (4.29) i (4.30) u jednačinu promene koncentracije leka u vodenoj fazi (4.28), dolazi se do sledećeg izraza:

$$d[L_v]/dt + dx/dt = k_{-1}[L_o] - k_{-1}y - k_1[L_v] - k_1x \quad (4.31)$$

Zbog stehiometrije važi:  $x = y$ , prema tome jednačina (4.31) ima sledeći oblik:

$$d[L_v]/dt + dx/dt = k_{-1}[L_o] - k_1[L_v] - x(k_{-1} + k_1) \quad (4.32)$$

Pri dostizanju ravnoteže ne postoji ukupna promena u koncentracijama:

$$d[L_v]/dt = k_{-1}[L_o] - k_1[L_v] = 0$$

Stoga se konačni oblik jednačine (4.32) može napisati kao:

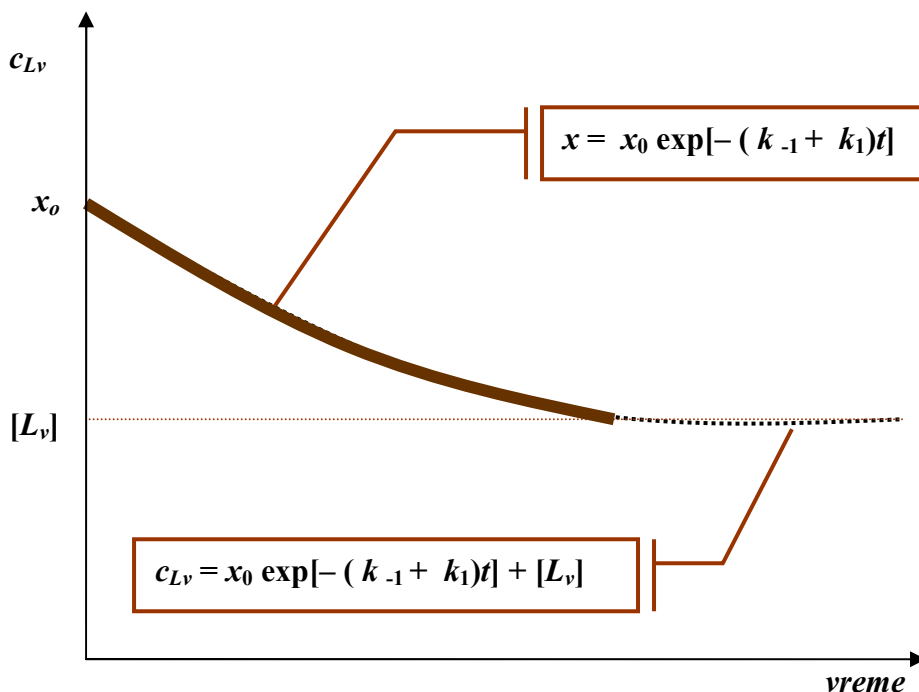
$$dx/dt = -x(k_{-1} + k_1) \quad (4.33)$$

Rešenje gornje jednačine je funkcija (4.34) koja eksponencijalno opada do ravnotežne koncentracije ispitivanog leka u vodenoj fazi  $[L_v]$  (Slika 4.41. A i Slika 4.42.):

$$x = x_0 \exp[-(k_{-1} + k_1)t] \quad (4.34)$$

Recipročnu vrednost eksponencijalnog člana monoeksponencijalne funkcije (4.34)  $(k_{-1} + k_1)^{-1}$  Seakins i Pilling [184] nazivaju relaksaciono vreme i označavaju je sa  $\tau$ , te procese koji se opisuju pomoću jednačine (4.34) (proces koji se monoeksponencijalno približavaju ravnotežnom stanju) oni nazivaju relaksacionim procesima. Ako sa obema stranama jednačine (4.34) doda ravnotežna koncentracija ispitivanog leka u vodenoj fazi  $[L_v]$ , tada se dobija funkcija (4.35) koja se koristi u ovom radu za fitovanje eksperimentalnih podataka kada u sistemu nisu prisutne žučne kiseline (Slika 4.39.):

$$c_{L_v} = x_0 \exp[-(k_{-1} + k_1)t] + [L_v] \text{ odnosno } c_{L_v} = x_0 \exp[-(1/\tau)t] + [L_v] \quad (4.35)$$



Slika 4.42.

Ako se odredi  $\tau$  odnosno  $k = k_1 + k_{-1}$  iz fitovane krive (4.35) zajedno sa konstantom ravnoteže (raspodele)  $K_d = k_1/k_{-1}$  može se izračunati konstanta brzina transfera leka iz

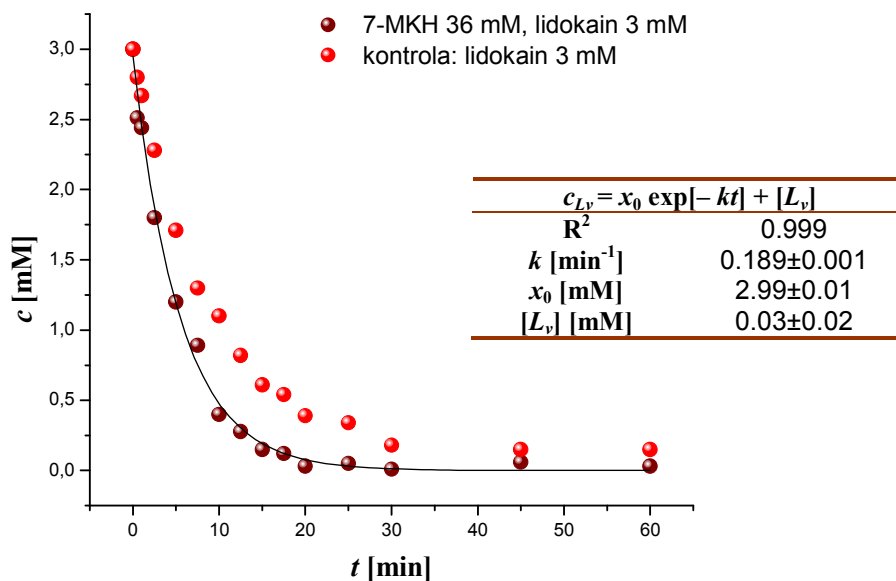
vodene faze u organsku  $k_1$  odnosno konstanta brzine transfera leka iz organske faze u vodenu  $k_{-1}$ . Iz Tabele 4.23. se vidi da sa porastom pH vrednosti vodene faze opada konstanta brzine transfera  $k_{-1}$  lidokaina iz organske faze (hloroform) u vodenu fazu, dok istovremeno konstanta brzine transfera suprotnog procesa raste, tako da je iznad pH 6.5 preovladavajući proces prelaz lidokaina iz vodene faze u hloroform.

Tabela 4.23. Uticaj pH vrednosti na konstante brzine [ $\text{min}^{-1}$ ] transfera lidokaina.

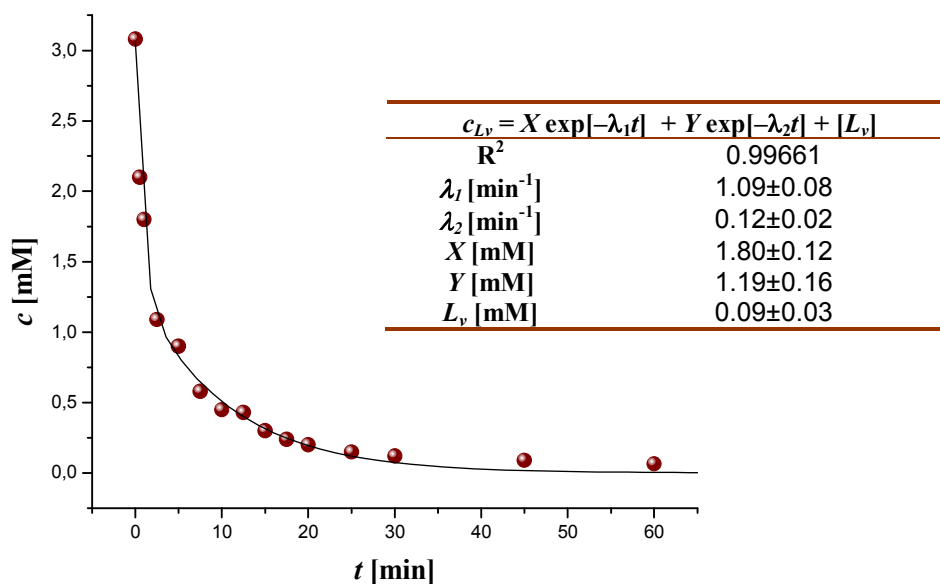
pH	$K_d$	$k = k_1 + k_{-1}$	$k_1$	$k_{-1}$
5.5	1.07	0.080	0.042	0.038
6.5	20.00	0.120	0.114	0.006
7.4	59.00	0.410	0.403	0.007

#### 4.2.3.2.1. Promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu žučnih kiselina u hloroformu

Ako se u organskoj fazi nalaze žučne kiseline, onda se za opadanje koncentracije lidokaina u vodenoj fazi takođe dobija monoeksponencijalna kriva (Slika 4.43. i prilog), dok je za verapamil dobivena bieksponencijalna funkcija (Slika 4.44. i Prilog)



Slika 4.43. Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu žučnih kiselina u organskoj fazi (7-monoketoholna kiselina  $c = 36$  mM).



Slika 4.44. Bieksponencijalna promena koncentracije verapamila u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu žučne kiseline u hloroformu (7-monoketohenodeoksiholna kiselina  $c=6\text{mM}$ ).

U Tabeli 4.24. dati su parametri monoeksponencijalne krive opadanja koncentracije lidokaina u vodenoj fazi kada se ispitivane žučne kiseline nalaze u hloroformu, dok u Tabeli 4.25. su dati parametri bieksponencijalne funkcije koji opisuju opadanje koncentracije verapamila u vodenoj fazi (ispitivane žučne kiseline se nalaze u organskoj fazi).

Tabela 4.24. Parametri monoeksponencijalne funkcije opadanja koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 (žučne kiseline u hloroformu)

7-monoketoholna kiselina						
$c_{\text{ŽK}}$ [mM]	6	9	12	18	30	36
$k$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$0.131 \pm 0.003$	$0.136 \pm 0.002$	$0.147 \pm 0.003$	$0.157 \pm 0.002$	$0.179 \pm 0.001$	$0.189 \pm 0.001$
$x_0$ [mM]	$2.99 \pm 0.05$	$2.93 \pm 0.06$	$2.95 \pm 0.05$	$2.99 \pm 0.02$	$2.97 \pm 0.03$	$2.99 \pm 0.01$
$[L_v]$ [mM]	$0.12 \pm 0.02$	$0.10 \pm 0.03$	$0.005 \pm 0.04$	$0.03 \pm 0.02$	$0.03 \pm 0.02$	$0.03 \pm 0.02$
12-monoketodeoksiholna kiselina						
$c_{\text{ŽK}}$ [mM]	6	9	12	18	30	36
$k$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$0.129 \pm 0.002$	$0.133 \pm 0.001$	$0.139 \pm 0.002$	$0.147 \pm 0.002$	$0.161 \pm 0.001$	$0.168 \pm 0.002$
$x_0$ [mM]	$2.98 \pm 0.03$	$2.97 \pm 0.03$	$2.99 \pm 0.02$	$2.93 \pm 0.03$	$2.96 \pm 0.03$	$2.99 \pm 0.01$
$[L_v]$ [mM]	$0.12 \pm 0.01$	$0.12 \pm 0.03$	$0.005 \pm 0.04$	$0.03 \pm 0.02$	$0.03 \pm 0.02$	$0.03 \pm 0.02$



<i>3,7,12-triketoholna kiselina</i>						
<i>c</i> <sub>žK</sub> [mM]	6	9	12	18	30	36
<i>k</i> [min <sup>-1</sup> ]	0.128±0.002	0.133±0.002	0.138±0.003	0.144±0.002	0.156±0.001	0.162±0.001
<i>x</i> <sub>0</sub> [mM]	2.99±0.01	2.96±0.02	2.94±0.03	2.97±0.02	2.99±0.01	2.97±0.02
[ <i>L</i> <sub>v</sub> ] [mM]	0.13±0.01	0.11±0.01	0.005±0.02	0.03±0.02	0.03±0.02	0.03±0.02
<i>3,12-diketodeoksiholna kiselina</i>						
<i>c</i> <sub>žK</sub> [mM]	6	9	12	18	30	36
<i>k</i> [min <sup>-1</sup> ]	0.128±0.002	0.130±0.001	0.134±0.001	0.139±0.002	0.148±0.001	0.153±0.001
<i>x</i> <sub>0</sub> [mM]	2.98±0.01	2.97±0.03	2.98±0.04	2.99±0.02	2.95±0.01	2.99±0.01
[ <i>L</i> <sub>v</sub> ] [mM]	0.13±0.01	0.11±0.02	0.005±0.02	0.03±0.02	0.03±0.02	0.03±0.02
<i>7-monoketohenodeoksiholna kiselina</i>						
<i>c</i> <sub>žK</sub> [mM]	6	9	12	18	30	36
<i>k</i> [min <sup>-1</sup> ]	0.128±0.001	0.131±0.001	0.135±0.002	0.140±0.001	0.150±0.002	0.155±0.001
<i>x</i> <sub>0</sub> [mM]	2.99±0.01	2.99±0.01	2.98±0.02	2.96±0.03	2.99±0.01	2.99±0.01
[ <i>L</i> <sub>v</sub> ] [mM]	0.13±0.01	0.11±0.02	0.005±0.02	0.03±0.02	0.03±0.02	0.03±0.02
<i>3α-acetil-7,12-diketoholna kiselina</i>						
<i>c</i> <sub>žK</sub> [mM]	6	9	12	18	30	36
<i>k</i> [min <sup>-1</sup> ]	0.127±0.001	0.129±0.001	0.132±0.001	0.135±0.001	0.142±0.002	0.145±0.001
<i>x</i> <sub>0</sub> [mM]	2.99±0.01	2.99±0.03	2.96±0.02	2.99±0.01	2.98±0.01	2.99±0.01
[ <i>L</i> <sub>v</sub> ] [mM]	0.14±0.01	0.12±0.01	0.008±0.03	0.03±0.02	0.03±0.02	0.03±0.02
<i>henodeoksiholna kiselina</i>						
<i>c</i> <sub>žK</sub> [mM]	6	9	12	18	30	36
<i>k</i> [min <sup>-1</sup> ]	0.127±0.001	0.127±0.001	0.131±0.001	0.134±0.001	0.139±0.002	0.143±0.002
<i>x</i> <sub>0</sub> [mM]	2.99±0.01	2.98±0.01	2.98±0.02	2.99±0.01	2.99±0.01	2.98±0.01
[ <i>L</i> <sub>v</sub> ] [mM]	0.14±0.01	0.14±0.02	0.100±0.02	0.08±0.02	0.05±0.02	0.03±0.02
<i>Metil ester 3α-acetil-7-monoketoholne kiseline</i>						
<i>c</i> <sub>žK</sub> [mM]	6	9	12	18	30	36
<i>k</i> [min <sup>-1</sup> ]	0.129±0.001	0.133±0.002	0.140±0.002	0.146±0.002	0.161±0.003	0.168±0.001
<i>x</i> <sub>0</sub> [mM]	2.96±0.02	2.98±0.03	2.99±0.01	2.99±0.01	2.97±0.01	2.99±0.01
[ <i>L</i> <sub>v</sub> ] [mM]	0.12±0.01	0.10±0.01	0.005±0.02	0.03±0.02	0.03±0.02	0.03±0.02

<i>3<math>\alpha</math>,12<math>\alpha</math>-diacetil-7-monoketoholna kiselina</i>						
<i>c</i> <sub>žK</sub> [mM]	6	9	12	18	30	36
<i>k</i> [min <sup>-1</sup> ]	0.127±0.002	0.128±0.003	0.128±0.001	0.131±0.002	0.134±0.002	0.136±0.002
<i>x</i> <sub>0</sub> [mM]	2.99±0.01	2.99±0.01	2.99±0.01	2.99±0.01	2.98±0.01	2.99±0.01
<i>L</i> <sub>v</sub> [mM]	0.14±0.01	0.14±0.02	0.14±0.02	0.11±0.02	0.08±0.02	0.09±0.02
<i>7,12-diketoholna kiselina</i>						
<i>c</i> <sub>žK</sub> [mM]	6	9	12	18	30	36
<i>k</i> [min <sup>-1</sup> ]	0.126±0.002	0.127±0.001	0.129±0.001	0.131±0.001	0.134±0.001	0.136±0.001
<i>x</i> <sub>0</sub> [mM]	2.99±0.01	2.95±0.03	2.97±0.02	2.99±0.01	2.99±0.01	2.98±0.02
<i>L</i> <sub>v</sub> [mM]	0.14±0.01	0.14±0.01	0.12±0.02	0.08±0.02	0.08±0.02	0.08±0.02
n = 7						

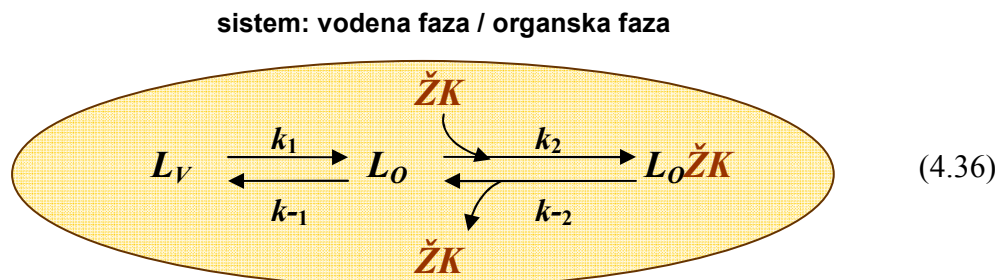
Tabela 4.25. Parametri biekspencijalne funkcije opadanja koncentracije verapamila u vodenoj fazi pH 6.5 (žučne kiseline u hloroformu)

<i>7-monoketohenodeoksiholna kiselina</i>						
<i>c</i> <sub>žK</sub> [mM]	6	9	12	18	30	36
$\lambda_1$ [min <sup>-1</sup> ]	1.09±0.08	1.11±0.10	1.10±0.12	1.50±0.12	2.27±0.18	2.36±0.13
$\lambda_2$ [min <sup>-1</sup> ]	0.12±0.02	0.13±0.02	0.12±0.02	0.18±0.03	0.26±0.05	0.30±0.03
<i>X</i> [mM]	1.80±0.12	1.82±0.09	1.74±0.10	1.80±0.11	1.77±0.09	1.85±0.13
<i>Y</i> [mM]	1.19±0.16	1.15±0.11	1.22±0.05	1.17±0.09	1.21±0.03	1.14±0.05
<i>L</i> <sub>v</sub> [mM]	0.09±0.03	0.05±0.03	0.05±0.03	0.05±0.03	0.03±0.01	0.03±0.01
<i>henodeoksiholna kiselina</i>						
<i>c</i> <sub>žK</sub> [mM]	6	9	12	18	30	36
$\lambda_1$ [min <sup>-1</sup> ]	1.10±0.09	1.23±0.09	1.54±0.14	1.69±0.08	2.45±0.12	2.61±0.13
$\lambda_2$ [min <sup>-1</sup> ]	0.11±0.02	0.15±0.02	0.19±0.03	0.23±0.03	0.32±0.03	0.36±0.04
<i>X</i> [mM]	1.82±0.10	1.80±0.04	1.79±0.10	1.80±0.05	1.83±0.06	1.81±0.10
<i>Y</i> [mM]	1.16±0.11	1.19±0.09	1.20±0.04	1.19±0.07	1.18±0.05	1.18±0.07
<i>L</i> <sub>v</sub> [mM]	0.08±0.02	0.05±0.03	0.05±0.03	0.05±0.03	0.03±0.01	0.03±0.01

metil estar holne kiseline						
$c_{\check{Z}K}$ [mM]	6	9	12	18	30	36
$\lambda_1$ [min <sup>-1</sup> ]	1.21±0.07	1.45±0.11	1.67±0.08	1.89±0.15	2.58±0.13	2.77±0.10
$\lambda_2$ [min <sup>-1</sup> ]	0.14±0.02	0.22±0.04	0.28±0.04	0.34±0.05	0.38±0.03	0.45±0.04
$X$ [mM]	1.81±0.10	1.80±0.05	1.78±0.11	1.79±0.08	1.81±0.12	1.80±0.13
$Y$ [mM]	1.19±0.09	1.20±0.06	1.21±0.07	1.20±0.05	1.19±0.06	1.20±0.07
$L_v$ [mM]	0.05±0.03	0.05±0.03	0.05±0.03	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01

n = 7

Ako su u organskoj fazi prisutne žučne kiseline koje grade komplekse pomoću vodoničnih veza sa ispitivanim lekovima, onda se može pretpostaviti sledeći sistem reakcija:



Slika 4.45. Uticaj žučnih kiselina na transfer leka iz vodene faze u organsku fazu.

Promena koncentracije ispitivanog leka u vodenoj, odnosno organskoj fazi u sistemu (4.36) može se izraziti sledećim jednačinama [184]:

$$dc_{L_v}/dt = k_{-1}c_{L_o} - k_1c_{L_v} \quad (4.37)$$

$$dc_{L_o}/dt = k_1c_{L_v} - k_{-1}c_{L_o} - k_2c_{L_o}c_{\check{Z}K} - k_{-2}c_{L_o}\check{Z}K \quad (4.38)$$

U gornjoj jednačini  $k_2$  predstavlja konstantu brzine formiranja kompleksa žučnih kiselina sa proučavanim lekovima, dok  $k_{-2}$  je konstanta brzine disocijacije istog kompleksa,  $c_{L_o\check{Z}K}$  i  $c_{\check{Z}K}$  predstavljaju koncentraciju kompleksa, odnosno žučne kiseline u organskoj fazi. Da bi se rešio gornji sistem linearnih diferencijalnih jednačina uvode se odstupanja od ravnotežnih koncentracija za svaku komponentu iz sistema (4.36) (Slika 4.45.):

Tabela 4.26.

	Ravnotežne koncentracije	odstupanja
$L_v$	$[L_v]$	$x$
$L_o$	$[L_o]$	$y$
$L_o\check{Z}K$	$[L_o\check{Z}K]$	$z$

Na osnovu parametara iz Tabele 4.26. diferencijalne jednačine (4.37) i (4.38) se mogu napisati u sledećem obliku:

$$dc_{L_v}/dt + dx/dt = k_{-1}[L_o] - k_1[L_v] - k_{-1}y - k_1x \quad (4.39)$$

$$dc_{L_o}/dt - dy/dt = k_1[L_v] - k_{-1}[L_o] - k_2[L_o] c_{\check{Z}K} - k_{-2}[L_o\check{Z}K] + k_1x + k_{-1}y + k_2y c_{\check{Z}K} - k_{-2}z \quad (4.40)^8$$

Kako u ravnotežnom stanju važe jednačine:

$$dc_{L_v}/dt = k_{-1}[L_o] - k_1[L_v]$$

$$dc_{L_o}/dt = k_1[L_v] - k_{-1}[L_o] - k_2[L_o] c_{\check{Z}K} - k_{-2}[L_o\check{Z}K]$$

Tako sistem linearnih diferencijalnih jednačina (4.39) i (4.40) se može predstaviti kao:

$$dx/dt = -k_{-1}y - k_1x \quad (4.41)$$

$$-dy/dt = k_1x + k_{-1}y + k_2y c_{\check{Z}K} - k_{-2}z \quad (4.42)$$

Na osnovu stehiometrije reakcija (4.36) se može napisati da je  $x = y + z$ , stoga je jednačina (4.42):

$$-dy/dt = k_1x + k_{-1}y + k_2y c_{\check{Z}K} - k_{-2}x - k_{-2}y \quad (4.43)$$

Ako se uvedu konstante  $a = (k_{-1} + k_2 c_{\check{Z}K} - k_{-2})$  i  $b = (k_1 - k_{-2})$  onda se jednačina (4.43) može napisati kao:

$$-dy/dt = ay + bx \quad (4.43a)$$

Rešenje sistema diferencijalnih jednačina (4.41) i (4.43a) je bieksponecijalna funkcija od vremena (4.44 odnosno 4.44a) za odstupanja koncentracije ispitivanog leka od ravnotežne koncentracije u vodenoj fazi ( $x$ ) (Slika 4.46.) [183-185].

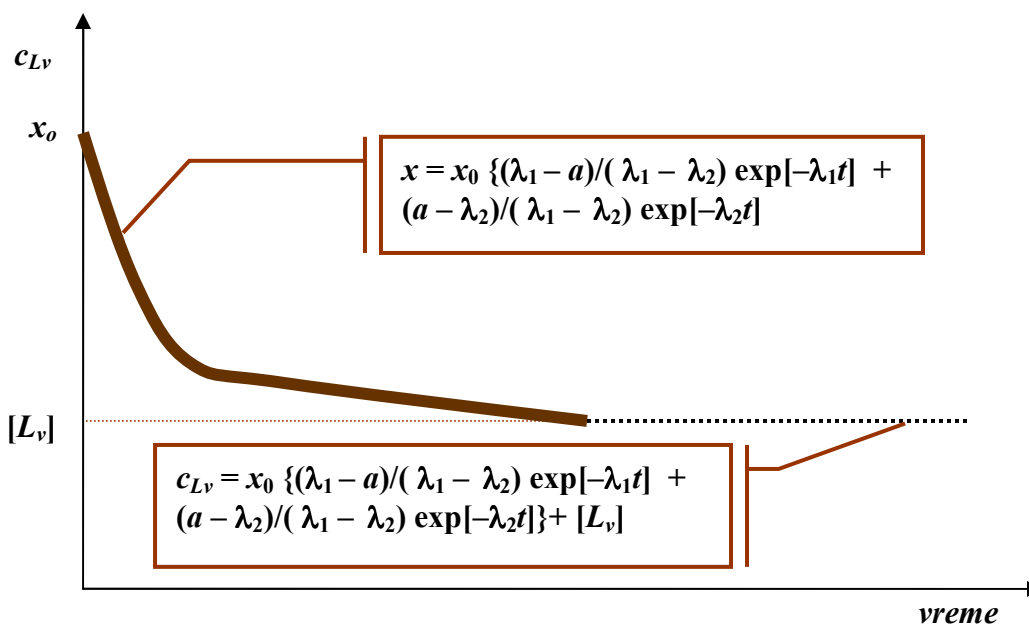
$$x = x_0 \{ (\lambda_1 - a) / (\lambda_1 - \lambda_2) \exp[-\lambda_1 t] + (a - \lambda_2) / (\lambda_1 - \lambda_2) \exp[-\lambda_2 t] \} \quad (4.44)$$

$$X = x_0 (\lambda_1 - a) / (\lambda_1 - \lambda_2) \text{ odnosno } Y = x_0 (a - \lambda_2) / (\lambda_1 - \lambda_2)$$

$$x = X \exp[-\lambda_1 t] + Y \exp[-\lambda_2 t] \quad (4.44a)$$

$$X + Y = x_0$$

<sup>8</sup> Kod rešavanja sistema diferencijalnih jednačina (13) i (14) koristi se aproksimacija da se koncentracija ispitivanih žučnih kiselina ne menja u toku vremena, što je moguće ukoliko se nalaze u višku u odnosu na količinu ispitivanog leka:  $c_{\check{Z}K} \gg (x_0 + [L_v])$  = početna koncentracija lidokaina u vodenoj fazi, stoga je rešenje bieksponecijalna funkcija koja važi za velike koncentracije žučnih kiselina.



Slika 4.46.

Ako se obema stranama jednačine (4.44) doda ravnotežna koncentracija ispitivanog leka u vodenoj fazi  $[L_v]$ , tada se dobija funkcija (4.45) koja se koristi za fitovanje eksperimentalnih podataka (Slika 4.44.):

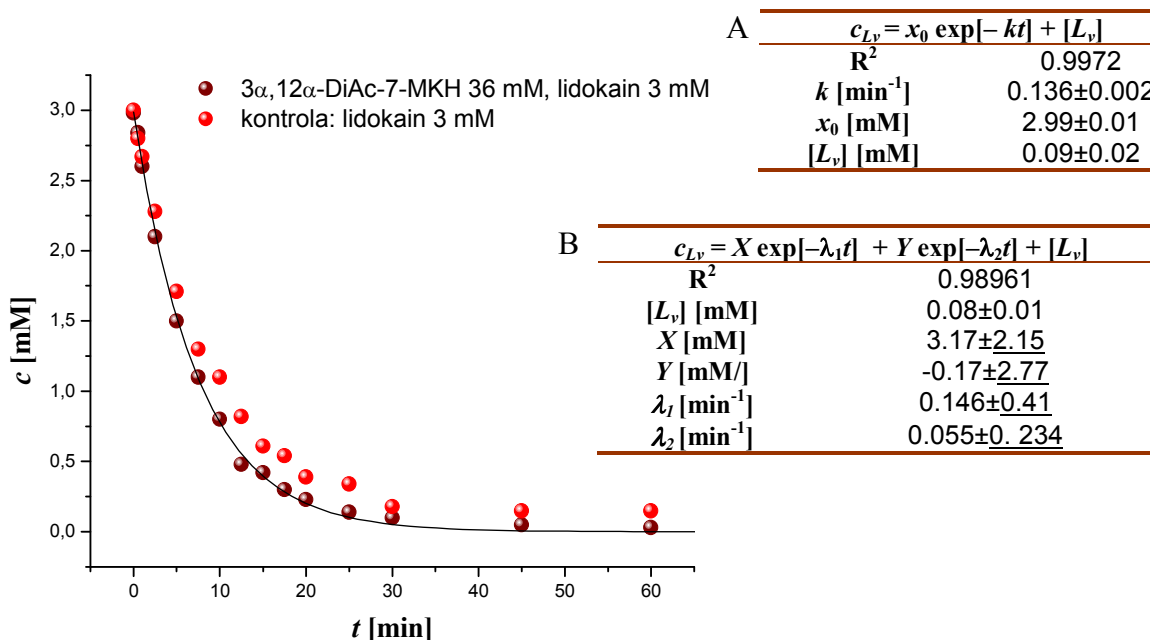
$$c_{Lv} = x_0 \{(\lambda_1 - a)/(\lambda_1 - \lambda_2) \exp[-\lambda_1 t] + (a - \lambda_2)/(\lambda_1 - \lambda_2) \exp[-\lambda_2 t]\} + [L_v] \quad (4.45)$$

$$X = x_0 (\lambda_1 - a)/(\lambda_1 - \lambda_2) \text{ odnosno } Y = x_0 (a - \lambda_2)/(\lambda_1 - \lambda_2)$$

$$c_{Lv} = X \exp[-\lambda_1 t] + Y \exp[-\lambda_2 t] + [L_v] \quad (4.45a)$$

$$X + Y = x_0$$

Bieksponencijalnom funkcijom (4.45 odnosno 4.45a) se dobro može opisati opadanje koncentracije verapamila u vodenoj fazi kada su žučne kiseline prisutne u hloroformu. Međutim pri fitovanju eksperimentalnih podataka za lidokain (opadanje koncentracije leka u vodenoj fazi) kada su žučne kiseline prisutne u organskoj fazi dešava se, da se na osnovu regresionog koeficijenta podjednako dobro može koristiti i monoeksponencijalna i bieksponencijalna funkcija. Međutim, kada se analiziraju standardne devijacije parametara dveju krivi onda se može zaključiti da je jedino monoeksponencijalna kriva tačna (Slika 4.47.). Što znači da sistem reakcija (4.36) se ne može prihvatiti na osnovu kinetičkih ispitivanja za transfer lidokaina, jedino za transfer verapamila.



Slika 4.47. Promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu 3,12-diacetil-7-monoketoholne kiseline  $c=36$  mM u hloroformu. A: Parametri monoeksponencijalne funkcije. B: Parametri bieksponencijalne funkcije, u ovom primeru obe funkcije imaju isti oblik, međutim parametri bieksponencijalne funkcije imaju veliku standardnu devijaciju.

Ovo znači da se za transfer lidokaina mora postaviti novi model. U ovom radu dat je novi matematički model koji opisuje opadanje koncentracije lidokaina u vodenoj fazi, pri čemu su žučne kiseline u hloroformu i to tako da konstanta brzine transfera lidokaina bude povezana sa konstantom ravnoteže formiranja kompleksa lidokaina i žučne kiseline.

Za transfer lidokaina se mogu postaviti sledeći novi modeli:

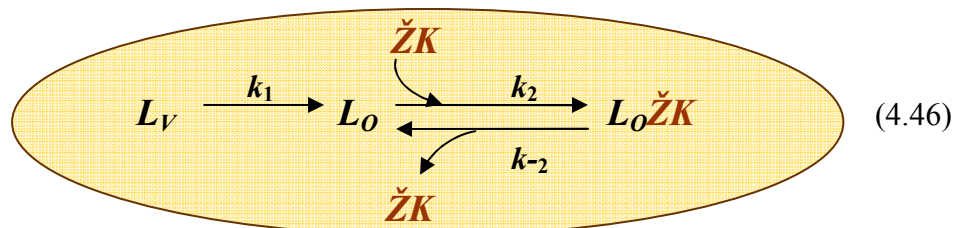
#### 4.2.3.2.1.1. Model I

Konstanta brzine  $k_{-1}$  je zanemarljiva u odnosu na konstantu brzine  $k_1$  (Slika 4.48. sistem reakcije (4.46)), pa se za opadanje koncentracije lidokiana u vodenoj fazi (4.48) dobija sledeća monoeksponencijalna funkcija:

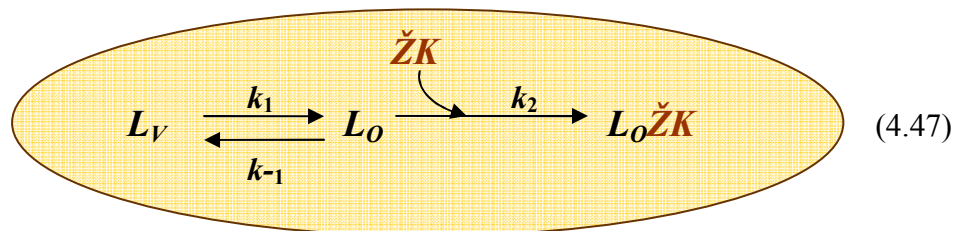
$$c_{Lv} = x_0 \exp[-k_1 t] + [L_v] \quad (4.48)$$

Međutim, prema jednačini (4.48) na brzinu opadanja koncentracije ispitivanog leka u vodenoj fazi žučne kiseline ne bi imali uticaja, što je u suprotnosti sa eksperimentalnim rezultatima.

sistem: vodena faza / organska faza



sistem: vodena faza / organska faza



Slika 4.48.

4.2.3.2.1.2. Model II

Kod drugog modela reverzibilna reakcija formiranja kompleksa sa vodoničnim vezama između lidokaina i žučne kiseline se aproksimira samo sa konstantom brzine  $k_2$ , to jest dejstvo žučnih kiselina se posmatra kao eliminacioni proces lidokaina iz vodene faze (Slika 4.48. sistem reakcija (4.47)). Dalje se koristi uslov kvazi stacionarnog stanja (stanje u kome se sistem ponaša kao da se nalazi u ravnotežnom stanju, međutim ravnotežno stanje još nije dostignuto) za koncentraciju slobodnog lidokaina u organskoj fazi [184]. Prema tome, posle početnog indukcionog perioda uz primenu kvazi stacionarnog uslova koncentracija slobodnog lidokaina se ne menja u organskoj fazi:

$$dc_{L_o}/dt = k_1 c_{L_v} - k_{-1} c_{L_o} - k_2 c_{L_o} c_{\check{Z}K} = 0$$

$$k_1 c_{L_v} = c_{L_o} (k_{-1} + k_2 c_{\check{Z}K}) \quad (4.49)$$

Ako se jednačina (4.49) uvrsti u diferencijalnu jednačinu brzine nastajanja kompleksa u organskoj fazi:  $dc_{L_o\check{Z}K}/dt = k_2 c_{L_o} c_{\check{Z}K}$ , onda se dolazi do jednačine (4.50):

$$dc_{L_o\check{Z}K}/dt = k_2 k_1 c_{\check{Z}K} c_{L_v} / (k_{-1} + k_2 c_{\check{Z}K}) \quad (4.50)$$

U kvazi stacionarnom stanju važi da je brzina opadanja koncentracije lidokaina u vodenoj fazi jednaka brzini rasta koncentracije kompleksa u organskoj fazi:

$$-dc_{Lv}/dt = dc_{Lo\check{Z}K}/dt = k_2 k_1 c_{\check{Z}K} c_{Lv} / (k_{-1} + k_2 c_{\check{Z}K}) \quad (4.51)^9$$

Stoga je rešenje monoeksponencijalna funkcija koja pokazuje zavisnost i od koncentracije žučne kiseline u organskoj fazi  $c_{\check{Z}K}$  i od početne koncentracije lidokaina u vodenoj fazi  $c_{Lv}^0$ :

$$c_{Lv} = c_{Lv}^0 \exp[-(\{k_2 k_1 c_{\check{Z}K}\} / \{k_{-1} + k_2 c_{\check{Z}K}\}) t] \quad (4.52)$$

Gornja jednačina je monoeksponencijalna funkcija čija je konstanta brzine opadanja lidokaina u vodenoj fazi data sledećom jednačinom:

$$k = \{k_2 k_1 c_{\check{Z}K}\} / \{k_{-1} + k_2 c_{\check{Z}K}\} \quad (4.53)$$

Međutim, prema jednačini (4.53) promena  $k$  sa promenom koncentracije kao i promenom strukture ispitivanih žučnih kiselina je minimalna. Pošto je:  $k_{-1} \ll k_2 c_{\check{Z}K}$ , stoga je:  $k_{-1} + k_2 c_{\check{Z}K} \approx k_2 c_{\check{Z}K}$ , što znači da je konstanta brzine opadanja lidokaina  $k$  u vodenoj fazi prema jednačini (4.53):

$$k = \{k_2 k_1 c_{\check{Z}K}\} / \{k_{-1} + k_2 c_{\check{Z}K}\} \approx k_1$$

Prema tome reakcionim sistemima (4.46) i (4.47) za opadanje koncentracije lidokaina u vodenoj fazi daju približno iste funkcije (4.48) i (4.52).

#### **4.2.3.2.1.3. Model III**

Uvodeći aproksimaciju da pri velikim koncentracijama ispitivanih žučnih kiselina u organskoj fazi brzina nestajanja lidokaina u reakciji građenja kompleksa sa vodoničnim vezama ne zavisi od koncentracije žučne kiseline, onda jednačina (4.49) u kvazi stacionarnom stanju ima sledeći oblik:

$$k_1 c_{Lv} = c_{Lo} (k_{-1} + k_2) \quad (4.54)$$

Brzina nastajanja kompleksa lidokaina i žučne kiseline zavisi pored koncentracije lidokaina i od koncentracije žučne kiseline. Ovo je moguće prema Carey-ovom [55,86] modelu gde žučne kiseline u nepolarnoj sredini grade reversne micle sa molekulima vode ili hidrofiličnim lekovima. Inicijalno nastali kompleks sa vodoničnim vezama između lidokaina i žučne kiseline menja svoju strukturu u zavisnosti od koncentracije žučne kiseline formirajući reversnu micelu, i to sa najverovatnijom strukturom gde se u hidrofiličnom jezgru nalazi molekul lidokaina koji je okružen sa dva ili više molekula žučne kiseline. Prema tome, jednačina brzine nastajanja kompleksa sa vodoničnim vezama je:

<sup>9</sup> koristi se aproksimacija da se koncentracija ispitivanih žučnih kiselina ne menja u toku vremena, što je moguće ukoliko se nalaze u višku u odnosu na količinu ispitivanog leka:  $c_{\check{Z}K} \gg (x_0 + [L_v])$  = početna koncentracija lidokaina u vodenoj fazi, stoga rešenje – monoeksponencijalna funkcija važi za velike koncentracije žučnih kiselina.



$$dc_{Lo\check{Z}K}/dt = k_2 c_{Lo} c_{\check{Z}K},$$

uvođenjem gornje jednačine u jednačinu (27), uz uslove stacionarnog stanja prema kome je:

$$-dc_{Lv}/dt = dc_{Lo\check{Z}K}/dt,$$

konačni oblik funkcije opadanja koncentracije lidokaina u vodenoj sredini je:

$$c_{Lv} = c_{Lv}^0 \exp[-(\{k_2 k_1 c_{\check{Z}K}\} / \{k_{-1} + k_2\}) t] \quad (4.55)$$

Prema gornjoj jednačini (4.55) konstanta brzine opadanja koncentracije lidokaina u vodenoj fazi je:

$$k = \{k_2 k_1 c_{\check{Z}K}\} / \{k_{-1} + k_2\} \quad (4.56),$$

koja u odnosu na jednačinu (4.53) dobro opisuje efekat koji ima promena koncentracije žučne kiseline na vrednost  $k$ , međutim i dalje se slabo objašnjava uticaj razlike struktura žučnih kiselina. Međutim, ako se pretpostavi da diferencijalna jednačina brzine nastajanja kompleksa žučne kiseline i lidokaina ima sledeći oblik:

$$dc_{Lo\check{Z}K}/dt = k_2 c_{Lo} k_s c_{\check{Z}K},$$

gde je  $k_s$  konstanta koja opisuje verovatnoću interakcije u reversnim micelama, koje su takođe uglavnom vodonične prirode i prema našoj pretpostavci da je  $k_2 \approx k_s$ , onda gornja jednačina dobiva sledeći izraz:

$$dc_{Lo\check{Z}K}/dt \approx k_2^2 c_{Lo} c_{\check{Z}K},$$

odnosno funkcija promene koncentracije lidokaina u vodenoj fazi je:

$$c_{Lv} \approx c_{Lv}^0 \exp[-(\{k_2^2 k_1 c_{\check{Z}K}\} / \{k_{-1} + k_2\}) t] \quad (4.57),$$

pa je konstanta brzine za opadanje koncentracije lidokaina u vodenoj fazi data kao:

$$k \approx \{k_2^2 k_1 c_{\check{Z}K}\} / \{k_{-1} + k_2\} \quad (4.58)$$

Jednačina (4.58) objašnjava i efekte promene koncentracije kao i efekte razlike struktura ispitivanih žučnih kiselina. Efekat strukture žučnih kiselina dolazi do izražaja preko konstante  $k_2$  koja u sebi nosi iste varijacije, odnosno informacije o strukturi ispitivanih žučnih kiselina kao i ravnotežna konstanta  $K$  građenja kompleksa lidokaina i žučne kiseline ( $K = k_2 / k_{-2}$ ,  $k_2 \gg k_{-2}$ ).

sistem: vodena faza / organska faza



Slika 4.49.

4.2.3.3.1.4. Model IV

Ako se pretpostavi da je koncentracija slobodnog lidokaina (koji nije vezan u kompleksu sa žučnom kiselinom) u organskoj fazi (hloroform) jednaka nuli:  $c_{L_o} = 0$ , a ovo važi pri velikim koncentracijama žučne kiseline, onda transfer lidokaina iz vodene sredine u hlороform se može predstaviti reakcijom (4.59) (Slika 4.49.). Na osnovu ovoga, brzina promene koncentracije lidokaina u vodenoj fazi je data diferencijalnom jednačinom:

$$dc_{L_v}/dt = -k_3 c_{L_v} c_{\check{Z}K} + k_{-3} c_{L_o\check{Z}K} \quad (4.62)$$

U gornjoj jednačini  $k_3$  je koeficijent brzine transfera lidokaina iz vodene faze u kompleks sa žučnom kiselinom u hlороformu, dok  $k_{-3}$  je konstanta brzine transfera lidokaina iz kompleksnog oblika u hlороformu u vodenu fazu. Ako se uvedu ravnotežne koncentracije za komponente jednačine (4.62) kao i odstupanja od ravnotežnih koncentracija u vremenu  $t$  (računato od početka ogleada) (Tabela 4.27.), onda se gornja jednačina može napisati kao:

$$d[L_v]/dt + dx/dt = -k_3[L_v] c_{\check{Z}K} - k_3 c_{\check{Z}K} x + k_{-3}[L_o\check{Z}K] - k_3[L_o\check{Z}K] y \quad (4.63)$$

Tabela 4.27.

	Ravnotežne koncentracije	odstupanja
$L_v$	$[L_v]$	$x$
$L_o\check{Z}K$	$[L_o\check{Z}K]$	$y$

Pri postizanju ravnoteže važi:

$$d[L_v]/dt = -k_3[L_v] c_{\check{Z}K} + k_{-3}[L_o\check{Z}K] = 0,$$

stoga jednačina (4.63) može da se napiše kao:

$$dx/dt = -k_3 c_{\text{ŽK}} x - k_{-3} [L_o\text{ŽK}] y \quad (4.64)$$

Na osnovu stehiometrije reakcije (4.59) važi da je:  $x = y$ , pa se jednačina (4.64) može predstaviti kao:

$$dx/dt = -k_3 c_{\text{ŽK}} x - k_{-3} [L_o\text{ŽK}] x \quad (4.65)$$

Rešenje gornje diferencijalne jednačine je funkcija:

$$x = x_0 \exp[-\{k_3 c_{\text{ŽK}} + k_{-3}\} t] \quad (4.66),$$

koja predstavlja promenu odstupanja  $x$  koncentracije lidokaina u vodenoj fazi od ravnotežne koncentracije u funkciji vremena  $t$ . Ukoliko se gornjoj jednačini sa obe strane doda ravnotežna koncentracija lidokaina u vodenoj fazi, onda se dobija kriva monoeksponencijalnog opadanja koncentracije lidokaina u vodenoj fazi do ravnotežne koncentracije (4.67):

$$c_{Lv} = x_0 \exp[-\{k_3 c_{\text{ŽK}} + k_{-3}\} t] + [L_v] \quad (4.67)$$

Kod gornje monoeksponencijalne jednačine konstanta brzine je data izrazom  $k = k_3 c_{\text{ŽK}} + k_{-3}$ , što objašnjava efekat promene koncentracije žučne kiseline na vrednosti konstante brzine opadanja koncentracije lidokaina u vodenoj fazi. Reakcija (4.59) sa Slike 4.46. može da se predstavi kao zbir reakcije (4.60) i (4.61), pa prema pravilu o složenim reakcijama konstanta ravnoteže reakcije  $K_{sum}$  (4.59) se može predstaviti kao proizvod konstante ravnoteže reakcije (4.60) koji odgovara konstanti raspodele lidokaina između hloroforma i vodene faze  $K_d$  i konstante ravnoteže građenja kompleksa sa vodoničnim vezama  $K$  (4.61):

$$k_3 / k_{-3} = K_{sum} = K_d K \quad (4.68)$$

Jednačina (4.68) jasno objašnjava uticaj različitih struktura ispitivanih žučnih kiselina na konstantu brzine  $k$ . Uticaj razlike u strukturi žučnih kiselina na vrednosti  $k$  se ogleda u vrednostima konstante ravnotežne kompleksa lidokaina i žučnih kiselina  $K$  (4.68).

Od predstavljenih modela ovaj model daje najrealniju sliku transfera lidokaina kada su žučne kiseline prisutne u hloroformu.

#### 4.2.3.2.2. Uticaj pH vrednosti vodene faze na kinetiku transfera lidokaina i verapamila u hloroform (žučne kiseline se nalaze u hloroformu)

Tabela 4.28. Parametri monoeksponencijalne funkcije opadanja koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 5.5 ( žučne kiseline se nalaze u hloroformu)

<i>7-monoketoholna kiselina</i>						
$c_{\text{žK}}$ [mM]	6	9	12	18	30	36
$k$ [min <sup>-1</sup> ]	0.080±0.005	0.088±0.005	0.092±0.002	0.098±0.003	0.115±0.008	0.119±0.003
$x_0$ [mM]	1.52±0.03	1.58±0.07	1.63±0.05	1.70±0.08	1.89±0.04	1.98±0.02
$[L_v]$ [mM]	1.45±0.09	1.40±0.05	1.35±0.02	1.30±0.04	1.09±0.02	1.01±0.02
<i>henodeoksiholna kiselina</i>						
$c_{\text{žK}}$ [mM]	3	6	12	18	30	36
$k$ [min <sup>-1</sup> ]	0.081±0.003	0.080±0.005	0.083±0.001	0.086±0.002	0.095±0.002	0.098±0.002
$x_0$ [mM]	1.53±0.05	1.55±0.03	1.58±0.07	1.61±0.04	1.73±0.05	1.79±0.01
$[L_v]$ [mM]	1.45±0.03	0.144±0.04	1.40±0.03	1.38±0.01	1.25±0.03	1.21±0.02

Kontrola:  $k = 0.080 \pm 0.004$  /min<sup>-1</sup>;  $x_0 = 1.55 \pm 0.04$  /mM;  $[L_v] = 1.45 \pm 0.05$  /mM/

Tabela 4.29. Parametri monoeksponencijalne funkcije opadanja koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 7.4 ( žučne kiseline se nalaze u hloroformu)

<i>7-monoketoholna kiselina</i>						
$c_{\text{žK}}$ [mM]	6	9	12	18	30	36
$k$ [min <sup>-1</sup> ]	0.411±0.002	0.414±0.003	0.475±0.005	0.522±0.002	0.538±0.008	0.589±0.002
$x_0$ [mM]	2.95±0.02	2.96±0.02	2.99±0.01	2.99±0.01	2.99±0.01	2.99±0.01
$[L_v]$ [mM]	0.05±0.01	0.03±0.01	≈ 0.00	≈ 0.00	≈ 0.00	≈ 0.00
<i>henodeoksiholna kiselina</i>						
$c_{\text{žK}}$ [mM]	6	9	12	18	30	36
$k$ [min <sup>-1</sup> ]	0.405±0.002	0.410±0.003	0.444±0.004	0.467±0.005	0.488±0.004	0.530±0.006
$x_0$ [mM]	2.96±0.04	2.97±0.03	2.95±0.05	2.99±0.01	2.99±0.01	2.99±0.01
$[L_v]$ [mM]	0.05±0.02	0.05±0.02	0.05±0.02	0.03±0.01	≈ 0.00	≈ 0.00

Kontrola:  $k = 0.410 \pm 0.002$  /min<sup>-1</sup>;  $x_0 = 2.95 \pm 0.03$  /mM;  $[L_v] = 0.05 \pm 0.01$  /mM/

Tabela 4.30. Parametri biekspencijalne funkcije opadanja koncentracije verapamila u vodenoj fazi pH 5.5 ( žučne kiseline se nalaze u hloroformu)

7-monoketohenodeoksiholna kiselina						
$c_{\text{žK}}$ [mM]	6	9	12	18	30	36
$\lambda_1$ [min <sup>-1</sup> ]	0.88±0.03	0.97±0.05	1.01±0.04	1.12±0.05	1.34±0.10	1.41±0.06
$\lambda_2$ [min <sup>-1</sup> ]	0.07±0.02	0.07±0.02	0.08±0.03	0.11±0.02	0.19±0.05	0.22±0.02
$X$ [mM]	1.05±0.04	1.11±0.08	1.12±0.07	1.28±0.05	1.42±0.07	1.44±0.09
$Y$ [mM]	0.30±0.06	0.31±0.11	0.33±0.05	0.22±0.09	0.20±0.04	0.20±0.05
$L_v$ [mM]	1.63±0.03	1.58±0.04	1.54±0.03	1.50±0.02	1.41±0.03	1.36±0.03

Tabela 4.31. Parametri biekspencijalne funkcije opadanja koncentracije verapamila u vodenoj fazi pH 7.4 ( žučne kiseline se nalaze u hloroformu)

7-monoketohenodeoksiholna kiselina						
$c_{\text{žK}}$ [mM]	6	9	12	18	30	36
$\lambda_1$ [min <sup>-1</sup> ]	1.64±0.07	1.74±0.03	1.83±0.05	1.95±0.08	2.46±0.09	2.58±0.08
$\lambda_2$ [min <sup>-1</sup> ]	0.24±0.05	0.28±0.02	0.31±0.02	0.36±0.03	0.49±0.05	0.52±0.03
$X$ [mM]	1.97±0.08	2.05±0.08	2.17±0.05	2.20±0.07	2.37±0.09	2.38±0.10
$Y$ [mM]	0.51±0.07	0.62±0.09	0.53±0.04	0.53±0.06	0.51±0.05	0.50±0.07
$L_v$ [mM]	0.41±0.03	0.35±0.03	0.29±0.02	0.25±0.03	0.11±0.04	0.11±0.05

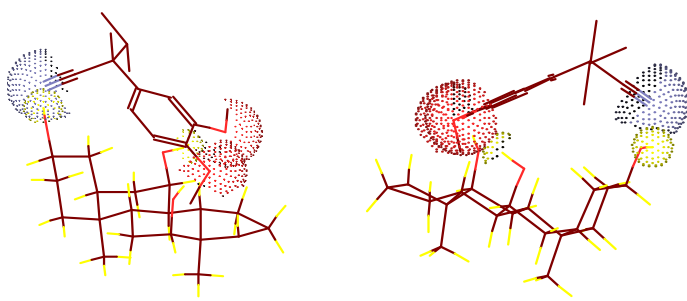
Bez obzira na pH vrednosti vodene sredine opadanje koncentracije lidokaina u prisustvu žučnih kiselina se opisuje monoekspencijalnom funkcijom. Efekat određenih koncentracija žučnih kiselina na konstantu brzine opadanja lidokaina na pH 5.5 je sličan kao na pH 6.5. Na pH 7.4 efekat žučnih kiselina na konstantu brzine opadanja koncentracije lidokaina u vodenoj fazi je povećan u odnosu na pH 5.5 i 6.5. Na pH 7.4 povećanje konstante brzine opadanja koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pri koncentraciji od 36 mM 7-monoketoholne kiseline u hloroformu je 84% u odnosu na konstantu brzine kada je koncentracija 7-monoketoholne kiseline 6 mM u hloroformu, dok je efekat na pH 5.5 je 48%. Veći efekat žučnih kiselina na konstantu brzine opadanja koncentracije lidokaina u vodenoj fazi sa povećanjem pH vrednosti vodene faze potvrđuje model IV, odnosno jednačinu (4.36) koja povezuje konstantu brzine opadanja koncentracije lidokaina sa konstantom raspodele  $K_d$  (distribucije) lidokaina između organske faze (hloroform) i vodene faze i ravnotežne konstante formiranja  $K$  kompleksa sa vodoničnim vezama. Kako je vrednost  $K_d$  lidokaina zavisna od pH vrednosti (Tabela 4.23.) to se onda odražava i na konstantu brzine opadanja koncentracije lidokaina u vodenoj fazi. Ako se analizira delovanje žučnih kiselina (rastvorenih u hloroformu) na ravnotežnu koncentraciju lidokaina pri različitim pH vrednostima vodene sredine onda se može zaključiti da na pH vrednostima 5.5 i 6.5 smanjenje ravnotežne koncentracije

lidokaina je značajnije nego na pH 7.4. Manji efekat žučnih kiselina na pH 7.4 na smanjenje ravnotežne koncentracije lidokaina (Tabela 4.29.) je posledica toga da na ovoj pH vrednosti i sam lidokain ima veliku vrednost konstante raspodele ( $K_d = 59 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ ). Različiti efekat 7-monoketoholne kiseline od henodeoksiholne kiseline ukazuje na značaj ravnotežne konstante građenja kompleksa sa vodoničnim vezama. Naime 7-monoketoholna kiselina sa većom konstantom ravnoteže formiranja kompleksa ( $K = 14.22 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ ) u većoj meri smanjuje ravnotežnu koncentraciju lidokaina u vodenoj fazi od henodeoksiholne kiseline sa manjom konstantom ravnoteže kompleksa sa vodoničnim vezama ( $K = 3.77 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ ) (Tabela 4.29.).

Opadanje koncentracije verapamila u vodenoj fazi pri pH 5.5 i 7.4 u prisustvu 7-monoketohenodeoksiholne kiseline u hloroformu opisuje biekspencijalna funkcija. Sa porastom koncentracije 7-monoketohenodeoksiholne kiseline (u hloroformu) rastu vrednosti parametra ( $\lambda_1$  i  $\lambda_2$ ) biekspencijalne funkcije odnosno, opada ravnotežna koncentracija lidokaina u vodenoj fazi na obe pH vrednosti (Tabela 4.30. i Tabela 4.31.).

#### 4.2.3.2.3. Uticaj strukture žučne kiseline na kinetiku transfera lidokaina i verapamila

Verapamil u odnosu na lidokain sadrži isključivo proton akceptorske grupe (metoksi, nitrilna, i t-amino grupa), što znači da sa verapamilom komplekse sa vodoničnim vezama mogu da grade one žučne kiseline koje imaju hidroksilne grupe. Iz Tabele 4.25. se vidi da najveći efekat na parametre biekspencijalne funkcije opadanja koncentracije verapamila u vodenoj fazi ima metil ester holne kiseline, zatim henodeoksiholna kiselina i najmanji efekat ima 7-monoketohenodeoksiholna kiselina. Naime, metil ester holne kiseline ima tri hidroksilne grupe sa  $\alpha$ -strane steroidnog jezgra koje formiraju vezivni region za proton akceptorske grupe verapamila. Kao što se vidi sa Slike 4.50. 1-(3,4-dimetoksifenil)-1-nitril-1-propil-etilni segment (regija) molekula verapamila uklapa se u trougao koga čine OH grupe metil estera holne kiseline, stoga ova žučna kiselina gradi najstabilniji kompleks sa verapamilom. Kod henodeoksiholne kiseline i 7-monoketohenodeoksiholne kiseline opada broj hidroksilnih grupa, pa samim tim i jačina interakcije u kompleksu sa verapamilom. Kod lidokaina interakcija u kompleksu sa žučnom kiselinom je utoliko efikasnija (jača) ukoliko žučna kiselina u svojoj strukturi sadrži više keto i OH grupu koje su međusobno na rastojanju od 4.4Å do 5.5Å. Kompleks sa vodoničnim vezama sadrži lidokain i žučnu kiselinu u odnosu 1 : 1. Dok kompleks žučne kiseline i verapamila je utoliko jači ukoliko žučna kiselina ima više hidroksilnih grupa.



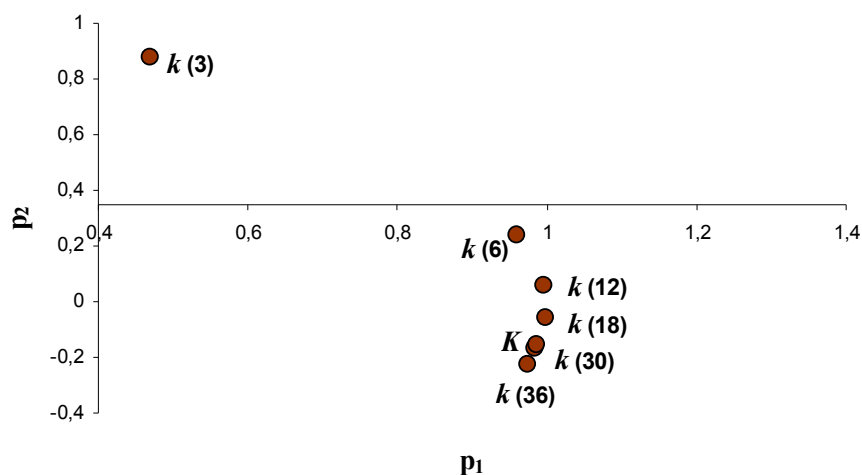
Pogled sa C12 strane

Pogled sa C7 strane

Slika 4.50. Vodonične veze između verapamila i holne kiseline, 1-(3,4-dimetoksifenil)-1-nitril-1-propil-etilni segment (regija) molekula verapamila uklapa se u trougao koga čine OH grupe holne kiseline.

#### 4.2.3.2.4. Hemometrijska analiza značaja konstante ravnoteže građenja kompleksa lidokaina i žučne kiseline na konstantu brzine opadanja koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5, kada se ispitivane žučne kiseline nalaze u hloroformu

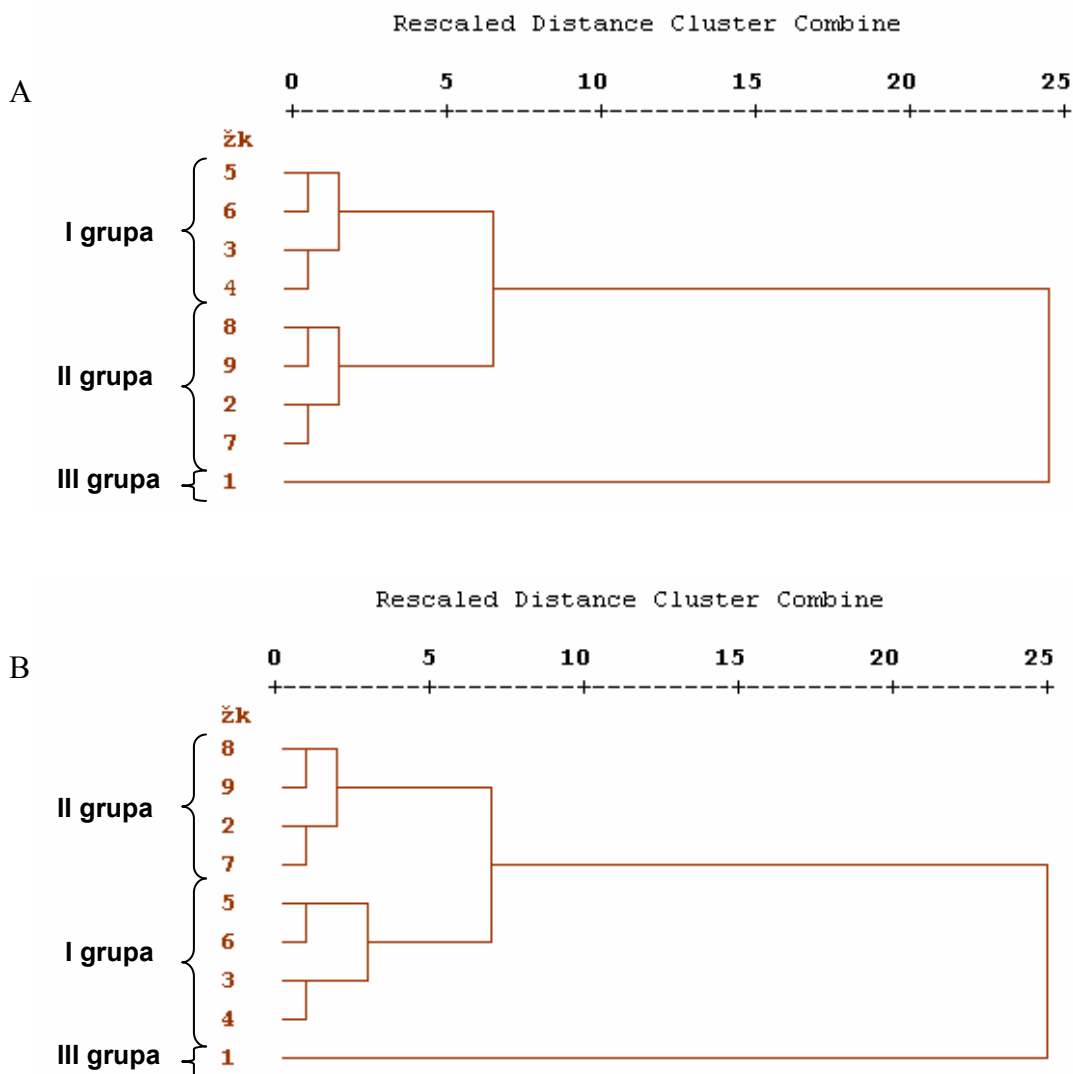
U ovom radu je primenjena metoda glavnih komponenti (*PCA*) [118] na parametre iz Tabele 4.24. Ispitivane žučne kiseline predstavljaju objekte, dok konstanta  $k$  brzine opadanja koncentracije lidokaina u vodenoj sredini, koja je određena pri različitim koncentracijama žučne kiseline u hloroformu, kao i konstanta ravnoteže građenja kompleksa  $K$  (lidokaina i žučne kiseline) predstavljaju varijabile. Na Slici 4.51. predstavljeni su koeficijenti varijabila  $\mathbf{p}_1$  i  $\mathbf{p}_2$  za glavnu komponentu  $\mathbf{gk}_1$  i glavnu komponentu  $\mathbf{gk}_2$  koje objašnjavaju 99% ukupne varijacije. Sa Slike 4.51. se može uočiti da se konstante brzine opadanja koncentracije lidokaina  $k$  merenih pri koncentracijama žučne kiseline od 18, 30, i 36 mM u hloroformu nalaze blizu konstanti ravnoteže  $K$  kompleksa lidokaina i žučnih kiselina, što upućuje na veliku korelaciju između konstanti brzine  $k(18 \text{ mM})$ ,  $k(30 \text{ mM})$ ,  $k(36 \text{ mM})$  i konstante ravnoteže  $K$  kompleksa sa vodoničnim vezama (Slika 4.47.) Slika 4.51. potvrđuje da jednačine (4.62) i (4.67) važe pri velikim koncentracijama žučne kiseline u odnosu na koncentraciju lidokaina (3 mM).



Slika 4.51. Koeficijenti varijabila  $\mathbf{p}_1$  i  $\mathbf{p}_2$  za glavne komponente  $\mathbf{gk}_1$  i  $\mathbf{gk}_2$ , u zagradi pored konstante brzine predstavljene su koncentracije žučne kiseline u hloroformu.

Uticaj kompleksa lidokaina i žučnih kiselina u hloroformu na povećanje brzine opadanja koncentracije ispitivanog leka u vodenoj fazi dokazuje i hijerarhijska klasifikacija žučnih kiselina. Naime, ukoliko se na vrednosti ravnotežne konstante  $K$  građenja kompleksa lidokaina i žučnih kiselina primeni hijerarhijska dendrogramska klasifikacija prema centroidnom pravilu [118] (Slika 4.52.A) kao i na vrednosti konstante brzine opadanja koncentracije lidokaina  $k$  iz Tabela 4.24. (Slika 4.52.B), svaka ispitivana žučna kiselina u višedimenzionalnom prostoru ima onoliko koordinata koliko je na različitim koncentracijama žučne kiseline u hloroformu određena konstanta brzine promene koncentracije  $k$  lidokaina u vodenoj fazi, onda se dobijaju dendrogrami kod kojih se ispitivane žučne kiseline grupišu u tri grupe sa identičnim objektima (žučnim kiselinama), jedino se razlikuje nivo povezivanja grupa. Ovo ukazuje na značaj kompleksa sa vodoničnim vezama između lidokaina i žučnih kiselina u promotornom

delovanju žučnih kiselin na povečanje konstante brzine opadanja koncentracije lidokaina u vodenoj fazi.



1: 7-MKH; 2: HDK; 3: 12-MKDK; 4: 3,7,12-TKH; 5: 3,12-DKDK; 6: 7-MKHDK;  
7: 3 $\alpha$ -Ac-7,12-DKH; 8: 7,12-DKH; 9: 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -DAc-7-MKH

Slika 4.52. Dendrogramska analiza.

Uticaj žučnih kiselin iz hloroforma na povečanje brzine opadanja koncentracije lidokaina u vodenoj sredini prema Poši i saradnika [4] ukazuje na mogući značaj kompleksa sa vodoničnim vezama između lidokaina i žučnih kiselin u smanjenju latentnog vremena (vreme od aplikacije leka do uspostavljanja potpune anestezije) analgetičkog delovanja lidokaina u prisustvu žučnih kiselin.



#### 4.2.3.2.5. Formiranje depo lidokaina sa žučnim kiselinama

Poša i saradnici [4] objašnjavaju produženo lokalno anestetičko delovanje lidokaina u prisustvu žučnih kiselina nastajanjem kompleksa sa vodoničnim vezama između žučne kiseline i lidokaina u ćelijskoj membrani, koji predstavlja depo ispitivanog leka. Naime, Tucker i saradnici [193] su takođe dokazali značajnost sekundarnih hemijskih interakcija (dipol-dipol, vodonične veze) u delovanju lokalnih anestetika. Oni su dokazali da bubivakain (anestetik slične strukture sa lidokainom) se vezuju za proteine tkiva i plazme što je poželjno, pošto na taj način dolazi do povećanja njene aktivnosti. Mehanizam se zasniva na tome, da ukoliko se molekul ne veže za tkivni protein, tada postoji ravnoteža između anestetika koji se nalazi u ekstracelularnom prostoru tkiva i plazme krvi kapilara. Međutim, kako krv u kapilarima uvek ima neki protok prava ravnoteža se nikada ne uspostavlja, već krv stalno odnosi izvesnu količinu anestetika. Ukoliko se molekul lokalnog anestetika veže za protein tada ova nova ravnoteža (između vezanog i slobodnog) dovodi do postepenog njegovog otpuštanja sa molekula proteina, te je tkivo duže izloženo dejstvu lokalnog anestetika-depo efekat.

Tabela 4.32. Koncentracije lidokaina [mM] nakon 3 sata transporta iz vodene sredine u hloroform, koncentracije žučne kiseline u hloroformu su  $c_1=18$  mM i  $c_2=36$  mM

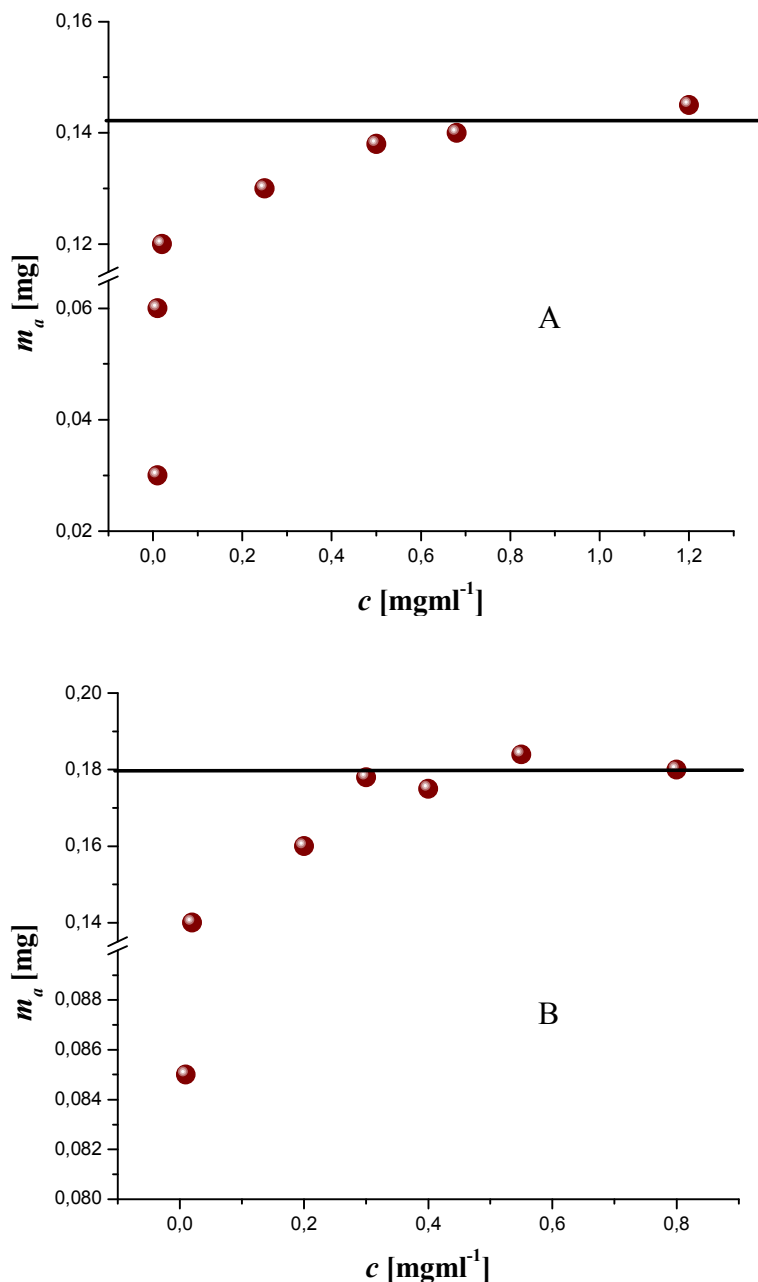
Ispitivane žučne kiseline	$K$ [dm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> ]	$c_1$	$c_2$
kontrola		2.87±0.11	
3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroksi-7-keto-5 $\beta$ -holanska kiselina	14.22	3.48±0.21	3.89±0.32
3,7,12-triketo-5 $\beta$ -holanska kiselina	8.15	3.09±0.05	3.22±0.08
3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\beta$ -holanska kiselina	3.77	2.95±0.12	3.10±0.09
3 $\alpha$ -hidroksi-7-keto-5 $\beta$ -holanska kiselina	6.50	3.01±0.05	3.17±0.07
3 $\alpha$ -hidroksi-12-keto-5 $\beta$ -holanska kiselina	9.45	3.15±0.04	3.30±0.09
3,12-diketo-5 $\beta$ -holanska kiselina	6.33	3.04±0.05	3.19±0.08
3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroksi-7-keto-5 $\beta$ -holanska kiselina	9.36	3.18±0.07	3.35±0.12
3 $\alpha$ -acetoksi-7,12-diketo-5 $\beta$ -holanska kiselina	4.44	3.04±0.05	3.19±0.10
metil estar 3,7,12-triketo-5 $\beta$ -holanske kiseline	0.00	2.90±0.08	2.86±0.12

Iz Tabele 4.32. se može zaključiti da je koncentracija lidokaina u hloroformu veća kada su prisutne žučne kiseline. Isto tako iz Tabele 4.32. se vidi da žučne kiseline sa većom konstantom ravnoteže  $K$  formiranja kompleksa sa vodoničnim vezama u većoj meri povećavaju koncentraciju lidokaina u hloroformu, odnosno sprečavaju njegov prelaz u vertikalnu cev **B** (Slika 4.20.), koji modeluje odvođenje leka sa kapilarnom krvi. Što znači da kompleks lidokaina i žučne kiseline pored toga što ubrzava transport lidokaina iz vodene faze u hloroform, takođe sprečava obrnuti proces - transport lidokaina iz hloroforma u vodenu fazu.

#### 4.2.3.2.6. Uticaj ispitivanih Na-soli žučnih kiselina na adsorpciju verapamila i lidokaina iz vodene sredine na aktivnom uglju

Ovaj deo ispitivanja predstavlja model za površinsko delovanje žučnih kiselina na graničnoj površini voda-ćelijska membrana, gde se žučne kiseline prema Carey-u adsorbuju i tako modifikuju graničnu površinu ćelijske membrane [55]. Na Slici 4.53. predstavljeni su adsorpcione izoterme za verapamil bez i u prisustvu Na-7-

monoketoholata u vodenoj sredini pri 0.5CMC koncentraciji. Adsorpciona kriva verapamila pokazuje nagli rast sa porastom ravnotežne koncentracije ispitivanog leka i već pri relativno niskoj koncentraciji verapamila se dostiže saturacija. Kod verapamila i lidokaina uticaj Na-soli žučnih kiselina se ogleda u promeni veličine njihovih saturacionih masa po jedinici adsorbensa.



Slika 4.53. Adsorpcione izoterme (adsorbovana masa verapamila po jedinici mase aktivnog uglja  $m_a$  u funkciji ravnotežne koncentracije ispitivanog leka  $c$ ). A: bez žučne kiseline -kontrola, B: sa Na-7-monoketoholatom, pH 6.5.

Tabela 4.33. Saturacione mase verapamila i lidokaina [mg/g] pH 6.5

Žučne kiseline	Koncentracija žučne kiseline	Saturaciona masa [mg/g]	
		verapamila	lidokaina
kontrola		0.140±0.008	0.187±0.014
holna kiselina	0.5 CMC	0.182±0.013	0.052±0.024
	CMC	0.092±0.007	0.033±0.011
7-monoketoholna kiselina	0.5 CMC	0.152±0.002	0.055±0.017
	CMC	0.105±0.004	0.038±0.012
7,12-diketoholna kiselina	0.5 CMC	0.147±0.009	0.054±0.009
	CMC	0.133±0.005	0.047±0.007
3,7,12-triketoholna kiselina	0.5 CMC	0.078±0.010	0.050±0.012
	CMC	0.073±0.012	0.043±0.016
7-monoketo- henodeoksiholna kiselina	0.5 CMC	0.158±0.014	0.063±0.012
	CMC	0.088±0.009	0.031±0.006

n=5

Ispitivane žučne kiseline imaju različito delovanje na saturacionu masu verapamila i lidokaina (Tabela 4.33). Kod verapamila svaka ispitivana žučna kiselina izuzev triketoholne kiseline povećava saturacionu masu verapamila u odnosu na kontrolu (vodeni rastvor ispitivanog leka, bez Na-soli žučnih kiselina) ukoliko su Na-soli žučnih kiselina prisutne u koncentraciji koja je niža od kritične micelarne koncentracije. Povećanje saturacione mase verapamila najveća je kod Na-holata (0.5CMC). Naime, holna kiselina ima tri proton donorske-akceptorske OH grupe koje grade vodonične veze sa metoksi grupama i nitrilnom grupom verapamila stoga usled nastajanja kompleksa povećava se adsorbovana masa verapamila. Efekat povećanja saturacione mase verapamila u odnosu na kontrolni ogled opada sa supstitucijom OH grupe sa keto grupom žučne kiseline, pošto se onda smanjuje broj vodoničnih veza u kompleksu žučne kiseline i verapamila. U prisustvu Na-triketoholata (0.5CMC) saturaciona masa verapamila naglo opada (0.075±0.012) u odnosu na kontrolnu vrednost (0.140±0.008) što je verovatno rezultat ne građenja kompleksa sa verapamilom. Na-triketoholat se ponaša konkurentno u procesu adsorpcije verapamila, zauzimajući deo površine aktivnog uglja, povećavajući pokrivenost adsorbensa što dovodi do smanjenja adsorpcije leka. Zapravo, svaka žučna kiselina u ovom procesu adsorpcije na aktivnom uglju je i konkurent verapamilu, sa tom razlikom da adsorbovane žučne kiseline koje grade komplekse pomoću vodoničnih veza sa verapamilom pomeraju njegovu ravnotežu ka adsorpciji. Ukoliko su Na-soli ispitivanih žučnih kiselina iznad kritične micelarne koncentracije onda saturaciona masa verapamila opada. Najznačajnije opadanje je u prisustvu Na-7-monoketohenodeoksiholata (0.088±0.009) i Na-holata (0.092±0.007), pošto ove žučne kiseline imaju relativno velike hidrofobne površine i stoga najefikasnije grade mešovite micelle sa verapamilom u rastvoru, što onda rezultuje i pomeranje ravnoteže ka desorpciji. U prisustvu Na-triketoholata saturaciona masa verapamila se statistički ne razlikuje od promene koncentracije ove žučne kiseline. Naime, triketoholna kiselina ima najmanju hidrofobnu površinu stoga i najmanji afinitet ka građenju mešovityh micela (zajednička micela ispitivanog leka i žučne kiseline).

Kod oglada sa lidokainom svaka ispitivana žučna kiselina smanjuje njenu saturacionu masu. Saturacione mase lidokaina se statistički ne razlikuju kada su žučne kiseline prisutne pri koncentraciji od 0.5 CMC odnosno CMC (Tabela 4.33), što znači da

u ovom eksperimentu nije dokazano građenje vodonične veze lidokaina i žučnih kiselina. Ovo je verovatno posledica da verapamil može da se veže za 2 molekula adsorbovane holne kiseline na aktivnom uglju pomoću vodoničnih veza (na osnovu *Dredinger*-ovih molekulskih modela), dok lidokain za 1 molekul adsorbovane holne kiseline. Zato je ravnoteža adsorpcije verapamila u odnosu na adsorpciju lidokaina više pomena ka aktivnom uglju u prisustvu ispitivanih žučnih kiselina (ispod kritične micelarne koncentracije). Ipak nešto niže saturacione mase lidokaina pri kritičnim micelarnim koncentracijama ispitivanih žučnih kiselina ukazuje na prisutnost mešovitih micela (desorpcija lidokaina sa aktivnog uglja pomoću žučnih kiselina uz nastajanje mešovite micela lidokaina i žučne kiseline).

U ovom radu ispitan je uticaj Na-soli žučnih kiselina na adsorpciju lekova na aktivnom uglju u prisustvu jona  $Fe^{3+}$  i  $Cr^{3+}$  i molekula glukoze i saharoze sa ciljem da se u što većoj meri opišu uslovi koji su u krvnoj plazmi odnosno u crevnom soku.

Tabela 4.34. Saturacione mase verapamila i lidokaina [mg/g] pH 6.5 u prisustvu 5 mM  $Cr^{3+}$  jona

Žučne kiseline	Koncentracija žučne kiseline	Saturaciona masa [mg/g]	
		verapamila	lidokaina
kontrola		0.140±0.008	0.187±0.014
holna kiselina	0.5 CMC	0.122±0.018	0.055±0.010
	CMC	0.056±0.017	0.033±0.015
7-monoketoholna kiselina	0.5 CMC	0.072±0.012	0.059±0.013
	CMC	0.069 ±0.014	0.042±0.009

n=5

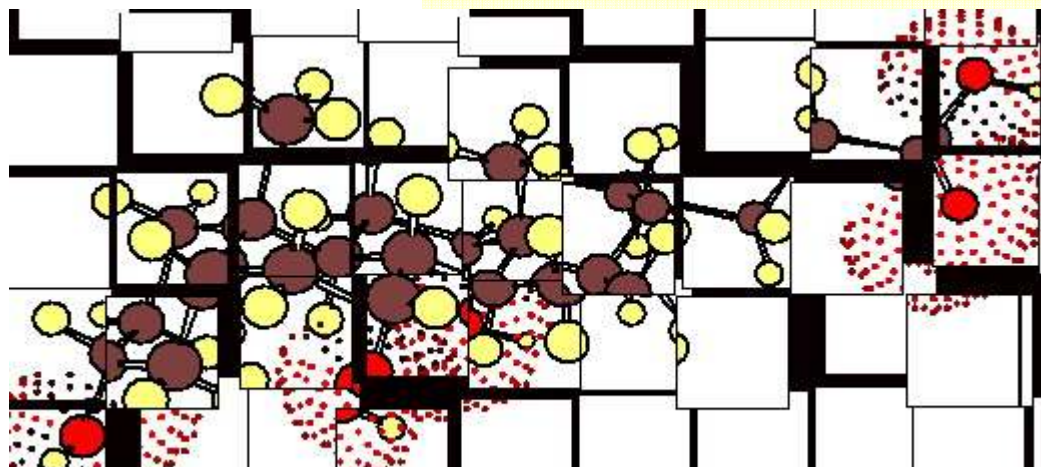
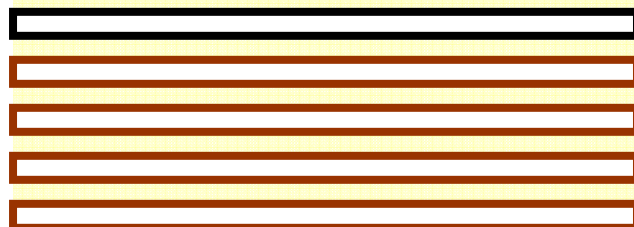
Tabela 4.35. Saturacione mase verapamila i lidokaina [mg/g] pH 6.5 u prisustvu 5 mM  $Fe^{3+}$  jona

Žučne kiseline	Koncentracija žučne kiseline	Saturaciona masa [mg/g]	
		verapamila	lidokaina
kontrola		0.140±0.008	0.187±0.014
holna kiselina	0.5 CMC	0.132±0.012	0.055±0.018
	CMC	0.059±0.008	0.038±0.010
7-monoketoholna kiselina	0.5 CMC	0.071±0.010	0.060±0.010
	CMC	0.058 ±0.019	0.045±0.007

n=5

Joni hroma(III) i gvožđa(III) sprečavaju nastajanje kompleksa sa vodoničnim vezama između verapamila i žučnih kiselina. Naime pri 0.5 CMC žučnih kiselina u prisustvu  $Cr^{3+}$  i  $Fe^{3+}$  jona izostaje povećanje saturacione mase verapamila već dolazi do smanjenja u odnosu na kontrolnu vrednost (Tabele 4.34 i 4.35), što je verovatno posledica nastajanja kompleksa između žučnih kiselina i ispitivanih metalnih jona, što sprečava nastajanje vodoničnih veza sa verapamilom. Glukoza i saharoza (5 mM koncentracije) ne ispoljavaju statistički značajno delovanje na uticaj žučnih kiselina na adsorpciju verapamila i lidokaina.

# 5. Bio- hemijska ispitivanja



Numerička vrednost za hidrofilni-hidrofobni balans (*HLB*) žučnih kiselina je iznad 18, što ih čini dobrim solubilizatorima hidrofobnih molekulima [10]. Iz tog razloga neke žučne kiseline se koriste kao lekovi za rastvaranje žučnog kamena holesterolnog tipa [194], dok neke žučne kiseline imaju promotorni efekat u resorpciji izvesnih lekova [2-4].

U mehanizmu promotornog delovanja žučnih kiselina na transport lekova kroz membranu važnu ulogu ima i njihova interakcija sa fosfolipidima membrane [13]. Prema *Bowe*-u žučne kiseline izvlače fosfolipide iz membrane gradeći sa njima mešovite micelle, što je važno sa stanovišta njihovog promotornog delovanja u transportu lekova sa jedne strane, sa druge strane može doći do narušavanja strukture ćelijske membrane što se manifestuje njihovim toksičnim efektom [14].

Zbog gore navedenih činjenica jedan od ciljeva u ovom radu je određivanje žučne kiseline koja bi se mogla koristiti: kao promotor u transportu leka kroz ćelijsku membranu sa najmanjim toksičnim efektom (lizija ćelijske membrane), odnosno koja bi se mogla koristiti i za solubilizaciju žučnog kamena holesterolnog tipa. Poznato je da su glavni gradivni molekuli ćelijske membrane fosfolipidi (lecitin, kefalin, itd), molekuli sa kojima žučne kiseline grade mešovite micelle. Kao rezultat nastajanja mešovite micelle fosfolipida i žučne kiseline je stvaranja “rupa“ u ćelijskoj membrani. Nastale “rupe“ povećavaju permeabilitet hidrofobnih lekova kroz membranu sa jedne strane, dok sa druge strane narušavaju fiziološku funkciju ćelijske membrane (perturbacija membranskog potencijala, prelazak citoplazmatskih enzima u ekstracelularnu tečnost itd). Stoga je potrebno da se odrede vrednosti ravnotežne submicelarne rastvorljivosti lecitina, koje ukazuju na promotorni efekat kod transporta leka kao i na toksičnost i ravnotežne micelarne solubilizacije holesterol monohidrata koje ukazuju na mogućnost rastvaranja holesterolnog kamena u prisustvu odabranih žučnih kiselina.

Isto tako, cilj je da se odrede korelacije submicelarne solubilizacije lecitina i micelarne solubilizacije holesterola sa molekulskim deskriptorima ispitivanih žučnih kiselina u vidu višestruke linearne regresije (*multiple linear regression, MLR*) odnosno metode glavnih komponenti (*principal component analysis, PCA*). Naime, višestruke regresione jednačine sa jedne strane pružaju mogućnost da se predvide ravnotežne micelarne solubilizacije lecitina i holesterola i kod onih žučnih kiselina koje nisu eksperimentalno ispitivane. A sa druge strane, preko vrste deskriptora žučnih kiselina se može posredno uočiti razlike između struktura mešanih micela žučnih kiselina i holesterola odnosno žučnih kiselina i lecitina.

U ovom radu submicelarna solubilizacija lecitina sa žučnim kiselinama se izražava kao inverzni kapacitet solubilizacije lecitina sa žučnim kiselinama i koje predstavlja broj molova žučne kiseline iz ravnotežnog submicelnog rastvora koji rastvara jedan mol lecitina,  $1/x_{Lec}$  gde je  $x_{Lec}$  molska frakcija rastvorenog lecitina. Dok se micelarna solubilizacija holesterol monohidrata  $x_{Chm}$  u ovom radu se izražava kao broj molova rastvorenog holesterol monohidrata po molu žučne kiseline (molska frakcija rastvorenog holesterola).

*Bowe* i saradnici [14] koriste hemolitički potencijal za izražavanje membranske toksičnosti žučnih kiselina, koji predstavlja koncentraciju žučne kiseline pri kojoj je došlo u *in vitro* eksperimentu do 50% lizije odnosno 100% lizije eritrocita. Hemolitički potencijal nekog molekula je povezan sa njegovom sposobnošću da ekstrahuje gradivne molekule ćelijske membrane u mešovite micelle. Što je neki molekul hidrofobniji amfifil

to na njegovoj nižoj koncentraciji dolazi do 50% odnosno 100% lizije eritrocita. Kao alternativna metoda za ispitivanje membranske toksičnosti je osmotska rezistencija (*in vivo* ogled). Kod ispitivanja osmotske rezistencije eksperimentalna životinja se tretira sa žučnom kiselinom, i posle određenog vremena (vreme potrebno za fazu raspodele žučne kiseline) se krv životinje ispituje tako što se pravi serija smeše rastvora krvi i rastvora različite koncentracije NaCl. Ukoliko se hemoliza eritrocita ispitivane životinje javlja iznad 0.5% NaCl, to znači da je narušena struktura membrane eritrocita, i molekuli vode iz unutrašnjosti izlaze u rastvor soli te se ćelija usled smežuranja raspada. Stoga je u ovom radu ispitivan hemolitički potencijal odnosno osmotska rezistencija navedenih žučnih kiselina.

## 5.1. MATERIJAL I METODA

Kako se formiranje mešovityh micela solubilizacijom lecitina i holesterola odigrava u vodenoj sredini, radi povećanja rastvorljivosti žučne kiseline se primenjuju u obliku Na-soli. Ispitivane su sledeće žučne kiseline:

**Hidroksi derivati holanske kiseline:**  $3\alpha,12\alpha$ -dihidroksi- $5\beta$ -holanska kiselina (deoksiholna kiselina, DK);  $3\alpha,7\alpha$ -dihidroksi- $5\beta$ -holanska kiselina (henodeoksiholna kiselina, HDK) i  $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihidroksi- $5\beta$ -holanska kiselina (holna kiselina, HK) i  $3\alpha,6\alpha$ -dihidroksi- $5\beta$ -holanska kiselina (hiodeoksiholna kiselina, HioDK).

**Hidroksi i keto derivati holanske kiseline:**  $3\alpha,12\alpha$ -dihidroksi-7-keto- $5\beta$ -holanska kiselina (7-monoketoholna kiselina, 7-MKH);  $3\alpha,7\alpha$ -dihidroksi-12-keto- $5\beta$ -holanska kiselina (12-monoketoholna kiselina, 12-MKH);  $12\alpha$ -hidroksi-3,7-diketo- $5\beta$ -holanska kiselina (3,7-diketoholna kiselina, 3,7-DKH);  $3\alpha$ -hidroksi-7,12-diketo- $5\beta$ -holanska kiselina (7,12-diketoholna kiselina, 7,12-DKH);  $3\alpha$ -hidroksi-12-keto- $5\beta$ -holanska kiselina (12-monoketodeoksiholna kiselina, 12-MKDK);  $3\alpha$ -hidroksi-7-keto- $5\beta$ -holanska kiselina (7-monoketohenodeoksiholna kiselina, 7-MKHDK).

**Keto derivati holanske kiseline:** 3,7,12-triketo- $5\beta$ -holanska kiselina (3,7,12-triketoholna kiselina, 3,7,12-TKH); 3,7-diketo- $5\beta$ -holanska kiselina (3,7-diketohenodeoksiholna kiselina, 3,7-DKHDK); 3,12-diketo- $5\beta$ -holanska kiselina (3,12-diketodeoksiholna kiselina, 3,12-DKDK);

Holesterol (Sigma) se prekrystalise iz etanola i prevodi se u monohidrat prema postupku *Igimi*-ja *Carey*-ja [195]. "Egg's" lecitin (Aldrich >98%), lidokain hidrohlorid (Galenika, >99.9%) i verapamil hidrohlorid (Galenika, >99.9%).

### 5.1.1. Određivanje ravnotežne submicelarne solubilizacije lecitina

U ovom radu je modifikovana *Sewell*-ova [196] metoda određivanja submicelarne solubilizacije lecitina sa žučnim kiselinama. Naime, kod *Sewell*-ove originalne metode detekcija je vizualna, dok u ovom radu se primenjuje spektrofotometrijsko određivanje lecitina preko fosfata.

Naprave se suspenzije lecitina (100 mg) i Na-soli žučne kiseline (10 ml, 0.15 mM NaCl, pH 7.4  $H_2PO_4/HPO_4^-$ ). Koncentracija žučne kiseline je u opsegu od 2 mM do 10 mM odnosno, ako u ovom opsegu koncentracije ne dolazi do solubilizacije lecitina onda

se pravi nova serija rastvora od 10 mM do 20 mM itd. Suspenzija lecitina i ispitivane žučne kiseline se temperira na 37 °C u vodenom kupatilu u toku 24 sata pri čemu se istovremeno meša na magnetnoj mešalici (300 obrtaja/min). Nakon toga, suspenzija (ukoliko je potrebno) se procedi kroz predhodno zagejani filter (0.22 µm). Bistri filtrat (uzorak od 600 µl) se upari u vakumu i zatim se doda koncentrovana perhlorna kiselina (1 ml) radi hidrolize fosfatnog estera iz lecitina. Hidroliza se izvodi u uljanom kupatilu (uzorak je u mikrovijali sa vodenim hladnjakom) u toku 45 minuta na 180 °C. Nakon hidrolize u ohlađeni rastvor (sobna temperatura) se dodaje destilovana voda (3 ml), amonijum-molibdatni reagens (1ml, 2.5% amonijum-molibdat, 10% sumporna kiselina) i redukujući reagens (1ml, 1% askorbinska kiselina i 0,016% bakar(II)-sulfat). Smeša se promućka i ostavi da odstoji 10 minuta. Absorbancija se određuje na 630 nm (Agilent 8453 spektrofotometar) uz korišćenje kalibracionog dijagrama za neorganski fosfat [197]. Slepa proba se priprema na identični način samo umesto filtrata žučne kiseline i lecitina koristi se destilovana voda (600 µl).

### 5.1.2. Određivanje ravnotežne micelarne solubilizacije holesterola

U ovom radu se ravnotežna micelarna solubilizacija holesterol monohidrata određuje po modifikovanom postupku *Armstrong*-a i *Carey*-a [36].

U erlenmajere se odmeri fino sprášeni holesterol monohidrat (100 mg) na koji se sipa vodena suspenzija ispitivane Na-soli žučne kiseline (10 ml, 150 mM, 0.15 mM NaCl, pH 7.4 H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>/HPO<sub>4</sub><sup>-</sup>), dok kod Na-soli 3,7-diketoholne; 7,12-diketoholne i 3,7,12-triketoholne kiseline 20 ml, zbog granice detekcije. Suspenzija holesterol monohidrata i Na-soli žučnih kiselina se inkubira na vodenom kupatilu (37°C) u toku 7 dana uz mešanje na magnetnoj mešalici (300 obrtaja/min). Nakon tog vremena suspenzija se filtrira na predhodno zagrejanom (37 °C) filteru (0.22 µm). U slučaju deoksiholne, 12-monoketodeoksiholne, henodeoksiholne i holne kiseline uzorak se uzima direktno iz filtrata (100 µl), dok u slučaju ostalih žučnih kiselina filtrat se upari u vakumu do suva. Ukoliko su ispitivane žučne kiseline hiodeoksiholna i 7-monoketohenodeoksiholna kiselina onda se nakon uparavanja na suvi ostatak sipa destilovana voda (5 ml), dok u slučaju 12-monoketoholne; 7-monoketoholne; 3,12-diketodeoksiholne; 3,7-diketohenodeoksiholne; 7,12-diketoholne; 3,7-diketoholne i 3,7,12-triketoholne kiseline na suvi ostatak se sipa destilovana voda (1ml) pa se onda uzima alikvot za analizu holesterola (100 µl). Holesterol se određuje enzimskom metodom, pomoću holesterol-oksidaza (Reanal, Budapest). Nastala boja se određuje na 500 nm (Agilent 8453 spektrofotometar), slepa proba je destilovana voda.

### 5.1.3. Određivanje molekularne lipofilnosti na reversno faznoj tankoslojnoj hromatografiji

U ovom radu molekularna lipofilnost  $R_{M0}$  za žučne kiseline se određuje prema postupku *Sarbu*-a i saradnika [132]. Retencioni parametar  $R_M$  se određuje pomoću reversno-fazne tankoslojne hromatografije (RPTLC) iz jednačine [132]:

$$R_M = \log(1/R_f - 1) \quad (5.1)$$



U gornjoj jednačini  $R_f$  predstavlja retencioni faktor. Retencioni parametar  $R_M$  linearno zavisi od koncentracije  $c$  organskog modifikatora (metanol) u mobilnoj fazi (voda) prema jednačini (5.2):

$$R_M = R_{M0} + bc \quad (5.2)$$

U gornjoj jednačini  $R_{M0}$  je odsečak na ordinati i predstavlja parametar žučne kiseline koji ima dobru korelaciju sa  $\log P$  vrednostima (logaritam particionog koeficijenta) kako nejonizovanog tako i jonizovanog oblika žučne kiseline [132].

#### 5.1.4. Određivanje osmotske rezistencije eritrocita i hemolitičkog potencijala

Pri određivanju osmotske rezistencije eritrocita narkotisanj životinji (Wistar pacov, etarska narkoza) u repnu venu se ubrizgava rastvor ( $5 \text{ mg ml}^{-1}$  pH 7.4  $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^-$ ) ispitivane Na-soli žučne kiseline<sup>10</sup> u dozi od  $5 \text{ mg kg}^{-1}$ . Nakon raspodele žučne kiseline, posle 45 minuta, vadi se krv iz leve komore srca eksperimentalne životinje u epruvetu sa antikoagulansom (citratna krv). Osmotska rezistencija se određuje iz citratne krvi prema metodi Jakovljević [198].

Eritrolizija se određuje iz citratne krvi pacova *in vitro* prema metodi Bowe [14].

#### 5.1.5. Određivanje uticaja Na-soli žučnih kiselina na resorpciju lidokaina i verapamila u tankom crevu *in vitro*

U ovom radu je razrađena nova metoda za analizu uticaja žučnih kiselina u resorpciji verapamila i lidokaina. Ova metoda modeluje predtretman crevne membrane sa žučnim kiselinama.

Iz narkotisane životinje (Wistar pacov, etarska narkoza) se uzima tanko crevo (5 cm) koje se ispere sa fiziološkim rastvorom. Nakon toga crevo isečeno na sitne komadiće se postavi u *Tirodov*-rastvor [17] ( $7.4 \text{ H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^-$ ) u kome je rastvorena i ispitivana Na-so žučne kiseline tako da koncentracija žučne kiseline bude jednaka sa kritičnom micelarnom koncentracijom (u kontrolnom ogledu koristi se *Tirodov*-rastvor bez žučne kiseline). Crevo se nalazi 24 sata u *Tirodovom*-rastvoru sa žučnom kiselinom uz dovođenje kiseonika i uz mešanje (50 obrtaja u minuti) - ova faza eksperimenta odgovara predtretmanu creva sa žučnim kiselinama. Nakon toga crevo se odvoji od žučnih kiselina i ispere sa *Tirodovim*-rastvorom (25 ml). Posle toga se crevo stavlja u *Tirodov*-rastvor koji sadrži lidokain-hidrohlorida (10 ml, 40 mM) odnosno u *Tirodov*-rastvor sa verapamil-hidrohloridom (10 ml, 40 mM). Komadići creva se mešaju sa ispitivanim lekom (50 obrtaja u minuti) u toku 5 minuta, vadi se uzorak rastvora (750  $\mu\text{l}$ ) iz kojeg se ispitivani lek određuje spektrofotometrijski (slepa proba je *Tirodov*-rastvor). Lidokain se određuje na talasnoj dužini od 263 nm, dok verapamil na talasnoj dužini od 280 nm.

#### 5.1.6. Obrada podataka

Molekulski deskriptori žučnih kiselina se dobijaju pomoću programa Chem 3D Ultra 7.0. Rezultati su statistički obrađeni pomoću programa SPSS 10.0 for Windows,

<sup>10</sup> Zbog rastvorljivosti Na-deoksiholata i Na-henodeoksiholata njihova koncentracija je  $2.5 \text{ mg ml}^{-1}$

koji je korišćen i za višestruku linearnu regresiju kao i za analizu glavnih komponenti (PCA).

## 5.2. REZULTATI I DISKUSIJA

U Tabeli 5.1. prikazani su rezultati molekularne lipofilnosti  $R_{M0}$ , micelarne solubilizacije holesterol monohidrata sa žučnim kiselinama  $x_{Chm}$  i submicelarna solubilizacija lecitina pomoću žučnih kiselina  $1/x_{Lec}$ .

Tabele 5.1. Eksperimentalno određeni parametri žučnih kiselina

Žučne kiseline	$R_{M0}$ <sup>a</sup>		$k$ <sup>b</sup>	$x_{Chm}$ <sup>c</sup>		$1/x_{Lec}$ <sup>d</sup>
	exp.	liter. [199]	liter. [36]	exp. srednja v. ±SD (n=7)	liter. [36]	exp. srednja v. ±SD (n=7)
deoksiholna kiselina	4.87	4.78	17.09	0.072±0.003	0.069±0.010	0.35±0.04
henodeoksi holna kiselina	4.77	5.01	15.28	0.061±0.002	0.056±0.003	0.40±0.02
holna kiselina	3.50	3.84	7.12	0.032±0.002	0.032±0.002	0.65±0.05
12-monoketo deoksiholna k.	4.68			0.016±0.005		0.87±0.04
3,12-diketodeoksi holna kiselina	4.41			0.0010±0.0004		1.50±0.09
7-monoketoheno deoksiholna k.	4.49		6.05	0.0058±0.0003	0.0056	1.20±0.05
3,7-diketoheno deoksiholna k.	4.36			0.0012±0.0004		1.60±0.05
12-monoketo holna kiselina	3.17	3.11	2.94	0.0022±0.0005	0.0021	2.00±0.10
7-monoketo holna kiselina	3.07	2.99		0.0017±0.0004		2.20±0.10
7,12-diketoholna kiselina	2.79	3.71		0.00075±0.00025		2.50±0.15
3,7-diketoholna kiselina	2.82			0.00053±0.00020		2.75±0.10
3,7,12-triketo holna kiselina	2.56	2.54		0.00±0.00015		4.00±0.30
hiodeoksiholna kiselina	3.90	3.88	6.20	0.0065±0.0005	0.0060	0.80±0.02

<sup>a</sup> Molekularna lipofilnost, odsečak u jednačini (5.2), koeficijent regresije za jednačinu (5.2) se kreće od 0.9723 do 0.9962 u zavisnosti od ispitivane žučne kiseline.

<sup>b</sup> retencioni faktor za HPLC.

<sup>c</sup> Molska frakcija solubilizovanog holesterol monohidrata (ravnotežna koncentracija holesterol monohidrata / ukupna koncentracija žučne kiseline)-kapacitet solubilizacije holesterol monohidrata [8].

<sup>d</sup> Inverzni kapacitet žučne kiseline u submicelarnoj solubilizaciji lecitina, broj molova žučne kiseline koja rastvara jedan mol lecitina (ravnotežna koncentracija žučne kiseline / ravnotežna koncentracija lecitina).

exp. eksperimentalna vrednost.

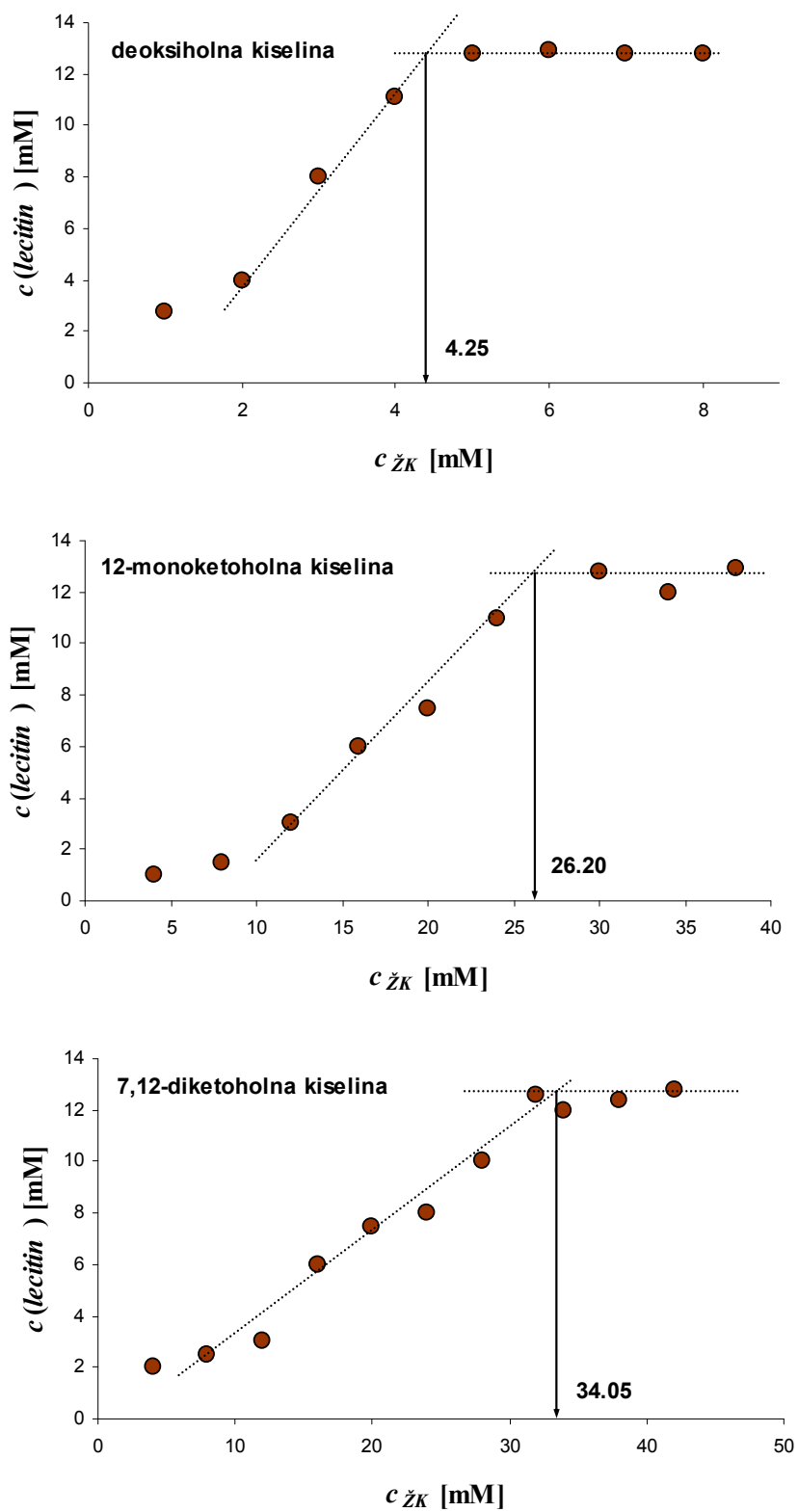
liter. literaturni podatak.

Kod vrednosti  $R_{M0}$  statistički značajna razlika ( $p < 0.001$ ) u odnosu na literaturnu vrednost [199] se javlja jedino kod 7,12-diketoholne kiseline. Ova razlika je verovatno posledica u načinu sinteze i prečišćavanju ove žučne kiseline. Naime, molekul  $\text{Br}_2$  kao oksidaciono sredstvo u toku sinteze može da gradi inkluzioni kompleks sa 7,12-diketoholnom kiselinom vezujući se vodoničnom vezom (vodonik OH grupe na C3 ugljeniku) i dipol-indukovani dipol interakcijom (keto grupe na C7 i C12). Stoga hromatografijom na koloni se ne može odstraniti, već je potrebno kao što je rađeno u ovom radu 7,12-diketo holnu kiselinu prevesti u Na-so prema postupku *Roda* [6], pri čemu u baznoj sredini molekuli broma prelaze u hipobromidni jon koji ostaje u vodenoj fazi. Naime, molekul broma koji gradi kompleks sa 7,12-diketoholnom kiselinom sa  $\alpha$  strane steroidnog skelete maskira OH i keto grupe, pa je molekul hidrofobniji nego što je u stvarnosti (raste  $R_{M0}$ ). Iz Tabele 5.1. se vidi da između vrednosti  $R_{M0}$  i vrednosti  $k$  postoji pozitivna korelacija stoga je  $R_{M0}$  adekvatna zamena za retencioni faktor.

Za određivanja ravnotežne micelarne solubilizacije holesterol monohidrata  $x_{Chm}$ , (Tabela 5.1.) korišćena je enzimaska metoda čija je granica određivanja 1 mM holesterola [200]. Stoga pri ispitivanju micelarne solubilizacije holesterola u prisustvu keto derivata žučnih kiselina, koji imaju nižu moć solubilizacije nego holna, deoksiholna i henodeoksiholna kiselina postupak je modifikovan tako što se holesterol koncentriše uparavanjem, za razliku od metode po *Armstrong*-u i *Carey*-u [36] koji su za kvantifikaciju holesterola u prisustvu žučnih kiselina sa niskom moći solubilizacije koristili izotopsko određivanje (niža granica određivanja). Međutim, iz Tabele 5.1. se vidi da se vrednosti  $x_{Chm}$  žučnih kiselina koje su takođe ispitivali i *Armstrong* i *Carey* statistički ne razlikuju od dobivenih vrednosti u ovom radu. Isto se može zapaziti i kod keto derivata žučnih kiselina gde je relativna greška određivanja  $x_{Chm}$  veća nego kod holne, deoksiholne i henodeoksiholne kiselina.

U nama dostupnoj literaturi vrednosti za submicelarnu solubilizaciju lecitina keto derivatima nekonjugovanih žučnih kiselina još nisu poznate. *Sewell* i saradnici [196] su odredili kapacitet solubilizacije lecitina u prisustvu tauro konjugovane henodeoksiholne i 12-monoketoholne kiseline. S obzirom da se u ovom radu određuje koncentracija lecitina preko fosfata pomoću amonijum-molibdatnog reagensa [197] to onda pruža veću preciznost ovoj metodi za razliku od *Sewell*-ove vizualne metode.

Na Slici 5.1. predstavljene su krive solubilizacije lecitina u prisustvu Na-deoksiholata, Na-12-monoketoholata i Na-7,12-diketoholata. *CMC* za Na-deoksiholat je 8 mM na 35 °C i 10 mM na 40 °C [166], dok je njena koncentracija pri potpunoj solubilizaciji lecitina na 37 °C 4.58 mM. Kritična micelarna koncentracija Na-12-monoketoholata na sobnoj temperaturi, pri jonskoj jačini od 0.15 mM NaCl, se kreće od 20 mM do 64 mM u zavisnosti od metode određivanja [201]. Na temperaturi od 30 °C i od 40°C i jonskoj jačini  $\mu = 0$  *CMC* je 89 mM [201]. Potpuna solubilizacija lecitina (100 mg) je pri koncentraciji žučne kiseline od 26.20 mM na 37 °C, a to je znatno ispod njene *CMC* vrednosti, što potvrđuje nastajanje mešovite micle. Kritična micelarna koncentracija Na-7,12-diketoholne kiseline je 69 mM na pH 7.4 u prisustvu fosfatnog pufera koncentracije 150 mM ( $\text{Na}_2\text{PO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) na temperaturama 30 °C i 40°C [201], dok je solubilizacija lecitina pri koncentraciji od 34.5 mM.

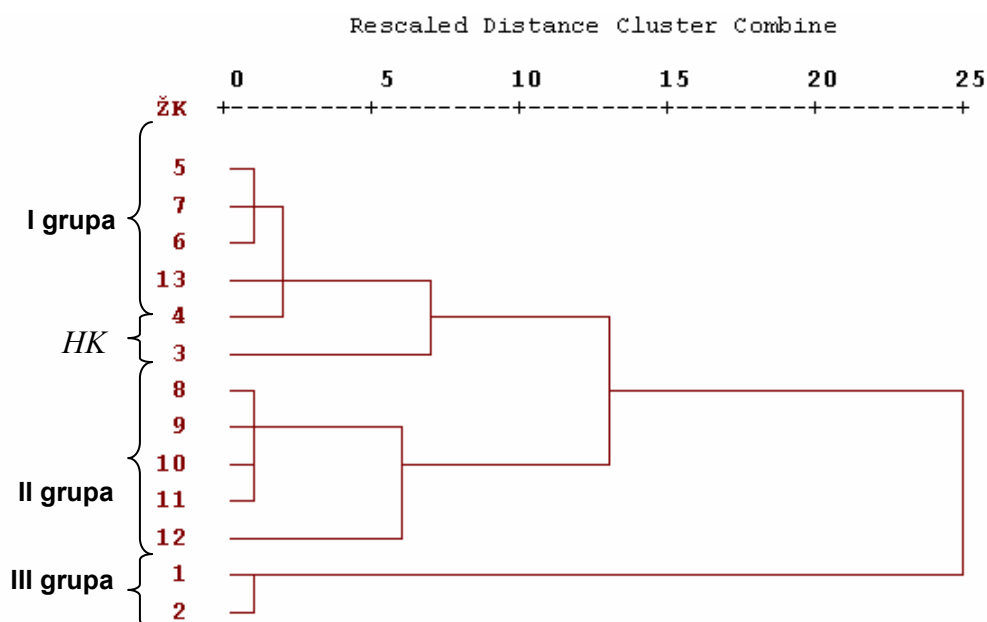


Slika 5.1. Submicelarna solubilizacija lecitina na pH 7.4 i 37 °C.

### 5.2.1. Povezanost ispitivanih žučnih kiselina u prostoru eksperimentalnih podataka

Cilj prepoznavanja povezanosti ispitivanih žučnih kiselina u prostoru eksperimentalnih podataka (*Pattern recognition*) je dobijanje što adekvatnije (sa što boljom reprodukcijom eksperimentalnih podataka) regresione jednačine koja povezuje eksperimentalne parametre sa molekulskim deskriptorima ispitivanih žučnih kiselina. Višestruke regresione jednačine se određuju za svaku grupu žučnih kiselina unutar kojih je manja varijacija nego u celom uzorku.

Da bi se odredilo grupisanje žučnih kiselina na osnovu eksperimentalnih podataka ( $R_{M0}$ ,  $x_{Chm}$  i  $1/x_{Lec}$ , Tabela 5.1.) u ovom radu je primenjena metoda hijerarhijske dendrogramске analize sa centroidnim postupkom [118,119], gde se informaciona struktura eksperimentalnih rezultata (svaka žučna kiselina je opisana pomoću tri koordinate:  $R_{M0}$ ,  $x_{Chm}$  i  $1/x_{Lec}$ ) preslikava u nivo (stepen) povezivanja žučnih kiselina iz dendrograma.



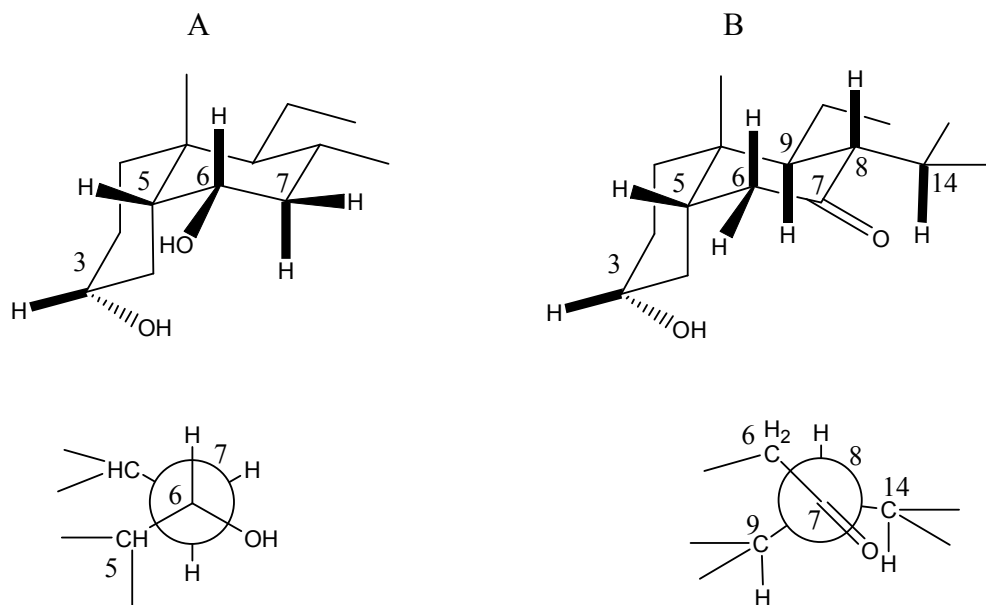
1: DK; 2: HDK; 3: HK; 4: 12-MKDK; 5: 3,12-DKDK; 6: 7-MKHDK; 7: 3,7-DKHDK; 8: 12-MKH; 9: 7-MKH; 10: 7,12-DKH; 11: 3,12-DKH; 12: 3,7,12-TKH; 13: HiDK.

Slika 5.2. Dendrogramska analiza eksperimentalnih podataka.

Sa dendrograma (Slika 5.2. ) se mogu uočiti dve veće grupe sa po pet žučnih kiselina. I Grupu formiraju mono- i diketo derivati deoksiholne i henodeoksiholne kiseline, i u ovu grupu takođe ulazi i hiodeoksiholna kiselina. II Grupu čine mono-, di- i triketo derivati holne kiseline. U III grupu ulaze henodeoksiholna i deoksiholna kiselina, dok holna kiselina ne pripada nijednoj grupi. Interesantno je da hiodeoksiholna kiselina kao dihidroksi žučna kiselina se nalazi u istoj grupi sa keto derivatima deoksiholne i henodeoksiholne kiseline. Međutim, kako je  $\beta$ -OH grupa C6 ugljenika hiodeoksiholne

kiseline ekvatorijalna i ako se uporedi *Newman*-ova projekciona formula okoline C6 ugljenika sa okolinom C7 ugljenika 7-monoketohenodeoksiholne kiseline, onda se može uočiti da su kiseonici C7 keto grupe i C6  $\beta$ -OH grupe na identičnom položaju u odnosu na srednju ravan steroidnog sistema. Oba kiseonika zaklapaju ugao od  $45^\circ$  sa srednjom ravnom steroidnog skeleta (Slika 5.3.). Iz tog razloga hiodeoksiholna kiselina pokazuje veliku sličnost sa 7-monoketohenodeoksiholnom i 12-monoketodeoksiholnom kiselinom.

Da bi se podvrdilo grupisanje ispitivanih žučnih kiselina koje se dobija pomoću dendrograma u ovom radu se primenjuje i metoda glavnih komponenti (*Principal Component Analysis, PCA*) [118,202]. Primenom metode *PCA* broj koordinata žučnih kiselina u višedimenzionalnom prostoru je povećan tako što su pored eksperimentalnih parametra dodani i molekulski deskriptori (Tabela 5.2.).



Slika 5.3. A: hiodeoksiholna kiselina, B: 7-monoketohenodeoksiholna kiselina.

Tabela 5.2. Molekulski deskriptori ispitivanih žučnih kiselina

Žučne kiseline	Log $P^a$	Clog $P^a$	Ovalnost	DIPOL <sup>b</sup>	CSEV <sup>c</sup>	Winer-index	MR <sup>d</sup>
deoksiholna kiselina	4.20	4.51	1.40	1.19	385.50	1901.00	109.20
henodeoksi holna kiselina	4.13	4.51	1.40	0.50	384.78	1910.00	109.27
holna kiselina	3.04	2.43	1.40	1.25	389.50	2045.00	110.78
12-monoketo deoksiholna k.	4.69	4.11	1.41	1.10	379.80	1901.00	108.37
3,12-diketodeoksi holna kiselina	4.84	3.71	1.41	1.33	374.33	1901.00	107.34
7-monoketoheno deoksiholna k.	4.45	4.11	1.41	1.20	379.38	1910.00	108.37
3,7-diketoheno deoksiholna k.	4.61	4.07	1.41	1.78	373.80	1910.00	107.32
12-monoketo holna kiselina	3.53	2.03	1.40	1.20	384.80	2045.00	109.97
7-monoketo holna kiselina	3.36	2.03	1.41	1.32	384.25	2045.00	109.86
7,12-diketoholna kiselina	3.85	2.36	1.42	2.07	379.50	2045.00	109.04
3,7-diketoholna kiselina	3.52	1.99	1.41	1.50	378.91	2045.00	108.83
3,7,12-triketo holna kiselina	4.01	2.33	1.42	2.81	374.10	2045.00	108.01
hiodeoksiholna kiselina	4.13	4.51	1.41	0.77	384.58	1919.00	109.27

<sup>a</sup> logaritam particionog koeficijenta, Log  $P$  se dobija pomoću *Crippen*-ove metode fragmentacije (*Crippen's fragmentation method*). Dok se Clog  $P$  računa prema *Leo* i *Hanch* -ovom postupku fragmentacije sa korekcionim faktorima.

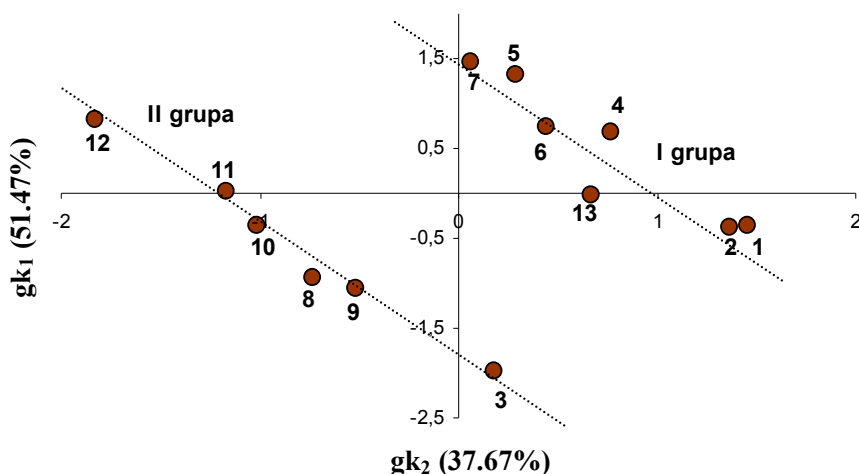
<sup>b</sup> Dipol-dipol energija ispitivanih žučnih kiselina.

<sup>c</sup> *Connolly*-jeva rastvaraču nedostupna zapremina (*Connolly Solvent Excludet Volume*).

<sup>d</sup> Molarna refrakcija.

Dati molekularni deskriptori iz Tabele 5.2. se koriste i kod višestrukih regresionih jednačina koji opisuju samoasocijaciju žučnih kiselina [201]. U Tabeli 5.2. date su vrednosti za ovalnost žučnih kiselina pošto je dobro poznato, da geometrija monomera ima značajan efekat na strukturu nastalih micela. Takođe su date vrednosti i molarne refrakcije [203] koje su u korelaciji sa polarizabilnošću molekula te se u ispitivanjima kvantitativnog odnosa strukture i biološke aktivnosti (*QSAR*) mogu koristiti za opisivanje intermolekulskih interakcija, a takođe i u opisivanju mešoviti micela. *Winer* index koji opisuje graf molekula je dat u Tabeli 5.2. sa ciljem da pri postavljanju višestrukih linearnih regresionih jednačina eventualno popravi model.

Metoda glavnih komponenti pored toga što omogućuje grafičko predstavljanje ispitivanih žučnih kiselina u 2D ili 3D prostoru (na osnovu vrednosti glavnih komponenti) ukazuje i na međusobnu korelaciju varijabla (vrednosti glavnih komponenti po varijabilama).

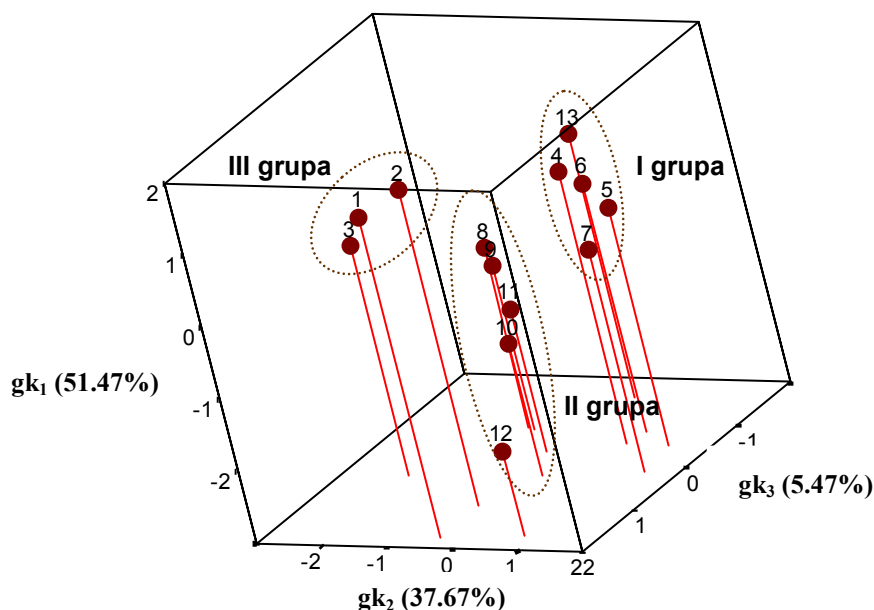


1: DK; 2: HDK; 3: HK; 4: 12-MKDK; 5: 3,12-DKDK; 6: 7-MKHDK; 7: 3,7-DKHDK; 8: 12-MKH; 9: 7-MKH; 10: 7,12-DKH; 11: 3,12-DKH; 12: 3,7,12-TKH; 13: HiDK.

Slika 5.4. Formiranje linearno kongeneričnih grupa u prostoru  $\mathbf{gk}_1$ - $\mathbf{gk}_2$  (objašnjavaju 89.14% varijacije).

Na Slici 5.4. su predstavljeni objekti (ispitivane žučne kiseline) pomoću glavne komponente  $\mathbf{gk}_1$  i glavne komponente  $\mathbf{gk}_2$ , koje objašnjavaju 89.14% varijacije u celom uzorku (eksperimentalno određeni parametri zajedno sa molekulskim deskriptorima). Ispitivane žučne kiseline u ravni  $\mathbf{gk}_1$ - $\mathbf{gk}_2$  formiraju dve linearne kongenerične grupe [132,204]. I Grupu čine žučne kiseline sa dva atoma kiseonika (dve OH, dve keto ili jedna keto i jedna OH), dok u II grupu ulaze žučne kiseline sa tri atoma kiseonika. Međutim, ako se žučne kiseline predstave u prostoru  $\mathbf{gk}_1$ - $\mathbf{gk}_2$ - $\mathbf{gk}_3$ , koje objašnjavaju 94.61% varijacije, (Slika 5.5.) onda se za razliku od ravni  $\mathbf{gk}_1$ - $\mathbf{gk}_2$  formira nova linearna kongenerična grupa III. U novu grupu (III grupa) ulazi holna, deoksiholna i henodeoksiholna kiselina. Struktura grupa (razvrstavanje žučnih kiselina u grupe) u  $\mathbf{gk}_1$ - $\mathbf{gk}_2$ - $\mathbf{gk}_3$  prostoru pokazuje veliku sličnost sa strukturom grupa prikazanom na dendrogramu sa Slike 5.2. Naime, I i II grupu sa dendrograma kao i u prostoru  $\mathbf{gk}_1$ - $\mathbf{gk}_2$ - $\mathbf{gk}_3$  formiraju iste žučne kiseline. Jedina razlika je da kod dendrograma holna kiselina je odvojena od deoksiholne i henodeoksiholne kiseline, dok u prostoru  $\mathbf{gk}_1$ - $\mathbf{gk}_2$ - $\mathbf{gk}_3$  ove žučne kiseline zajedno formiraju III grupu. Što znači da grupisanje žučnih kiselina na osnovu njihovih molekulskih deskriptora (Tabela 5.2.) i eksperimentalno određenih parametara (Tabela 5.1.) ne uzrokuje značajniju distorziju u njihovom grupisanju u odnosu na grupisanje kada se vrši isključivo pomoću eksperimentalno određenih parametara (Slika 5.2. dendrogram). Stoga su molekulski deskriptori u Tabeli 5.2. pogodni kao nezavisne promenljive u nalaženju regresionih jednačina za  $x_{Chm}$  i  $1/x_{Lec}$ .





1: DK; 2: HDK; 3: HK; 4: 12-MKDK; 5: 3,12-DKDK; 6: 7-MKHDK; 7: 3,7-DKHK; 8: 12-MKH; 9: 7-MKH; 10: 7,12-DKH; 11: 3,12-DKH; 12: 3,7,12-TKH; 13: HiDK.

Slika 5.5. Formiranje linearno kongeneričnih grupa u prostoru  $gk_1$ - $gk_2$ - $gk_3$  (objašnjavaju 94.61% varijacije).

### 5.2.2. Submicelarna solubilizacija lecitina pomoću žučnih kiselina

U ovom radu je inverzni kapacitet žučnih kiselina u solubilizaciji lecitina  $1/x_{Lec}$  povezan sa molekulskim deskriptorima pomoću regresionih jednačina sa ciljem da se predvidi moć solubilizacije lecitina i kod onih žučnih kiselina kod kojih  $1/x_{Lec}$  nije eksperimentalno određen. Za  $1/x_{Lec}$  kao zavisne varijabile su dobijene sledeće jednačine:

$$1/x_{Lec} = 13.12(\pm 1.44) + 1.76(\pm 0.03) DIPOL - 3.37(\pm 0.06) Clog P - 0.02(\pm 0.00) CSEV \quad (5.3)$$

$$n = 6; r = 0.9999; F = 17404; s = 1.10 * 10^{-2}$$

$$1/x_{Lec} = 6.96(\pm 0.32) + 1.91(\pm 0.05) DIPOL - 3.57(\pm 0.18) Clog P \quad (5.4)$$

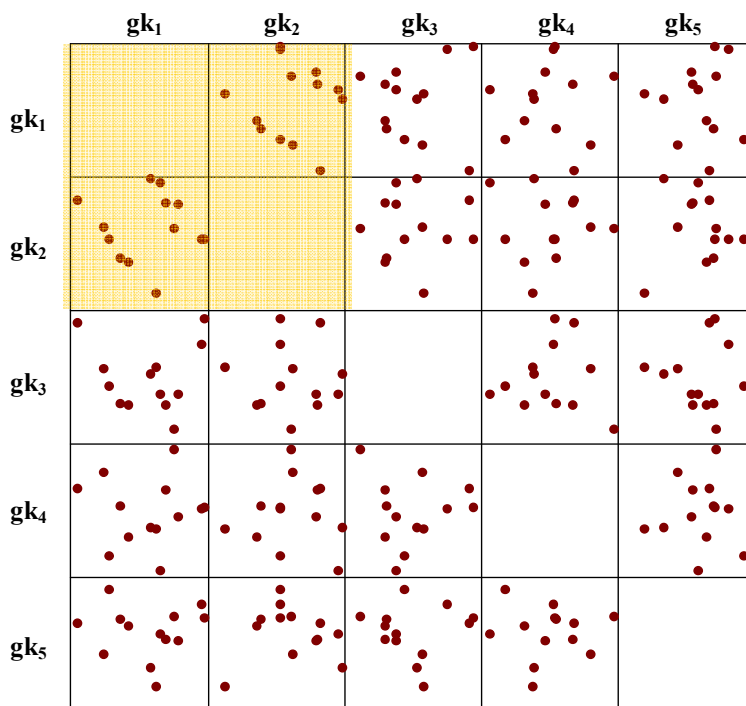
$$n = 5; r = 0.9999; F = 1104; s = 3.30 * 10^{-2}$$

$$1/x_{Lec} = -47.01(\pm 1.30) + 0.37(\pm 0.01) DIPOL - 1.02(\pm 0.02) Clog P - 0.03(\pm 0.00) CSEV \quad (5.5)$$

$$n = 7; r = 0.999999; F = 15665; s = 4.80 * 10^{-2}$$

Regresiona jednačina (5.3) povezuje inverzni kapacitet holne kiseline i njenih keto derivata u micelarnoj solubilizaciji lecitina  $1/x_{Lec}$ , kao zavisne promenljive sa sledećim molekulskim deskriptorima žučnih kiselina: dipol-dipol energija (*DIPOL*), *Clog P* i *Connolly*-jeve rastvaraču isključena zapremina (*CSEV*).

Regresiona jednačina (5.4) se odnosi na keto derivate holne kiseline. Naime, na osnovu **gk<sub>1</sub>-gk<sub>2</sub>-gk<sub>3</sub>** prostora (Slike 5.5.) i dendrograma sa Slike 5.2. se uočava izdvajanje holne kiseline iz **II** grupe (u ravni **gk<sub>1</sub>-gk<sub>2</sub>**, **II** grupu formiraju holna kiselina i njeni keto derivati), te je zato primenjena regresiona analiza na keto derivate holne kiseline bez holne kiseline. U jednačinu (5.4) se uvode deskriptori *DIPOL* i *Clog P*, što ukazuje na njihov značaj u opisivanju  $1/x_{Lec}$  kod ispitivanih žučnih kiselina. Međutim, višestruka regresiona jednačina (5.3) koja obuhvata holnu kiselinu i njene keto derivate na osnovu statističkih pokazatelja (što veća vrednost *F* i *r* odnosno što manja vrednost *s*) je bolji model nego regresiona jednačina (5.4) koja se odnosi isključivo na keto derivate holne kiseline. Ovo znači da regresiona jednačina (5.3) potvrđuje grupisanje ispitivanih molekula **gk<sub>1</sub>-gk<sub>2</sub>** ravni (Slika 5.4.), to jest da holna kiselina i njeni keto derivati formiraju jednu kongeneričnu linearnu grupu.



Slika 5.6. Korelaciona matrica vrednosti (score) glavnih komponenti **gk**.

Odvajanje holne kiseline od **II** grupe kao i deoksiholne i henodeoksiholne kiseline od **I** grupe u **gk<sub>1</sub>-gk<sub>2</sub>-gk<sub>3</sub>** prostoru, u kome gore navedene hidroksi derivati holanske kiseline formiraju **III** grupu (Slika 5.5.), se može objasniti pomoću *Wold*-ovog zapažanja [129]. Na osnovu kojeg glavne komponente sa malim sopstvenim vrednostima nose u sebi veći procenat greške od originalnih podataka nego što nose glavne komponente sa većim sopstvenim vrednostima (**gk<sub>1</sub>-gk<sub>2</sub>**), to jest u delu originalne varijacije koju objašnjava **gk<sub>3</sub>** postoji i veći deo greške merenja u odnosu na varijaciju koju objašnjavaju

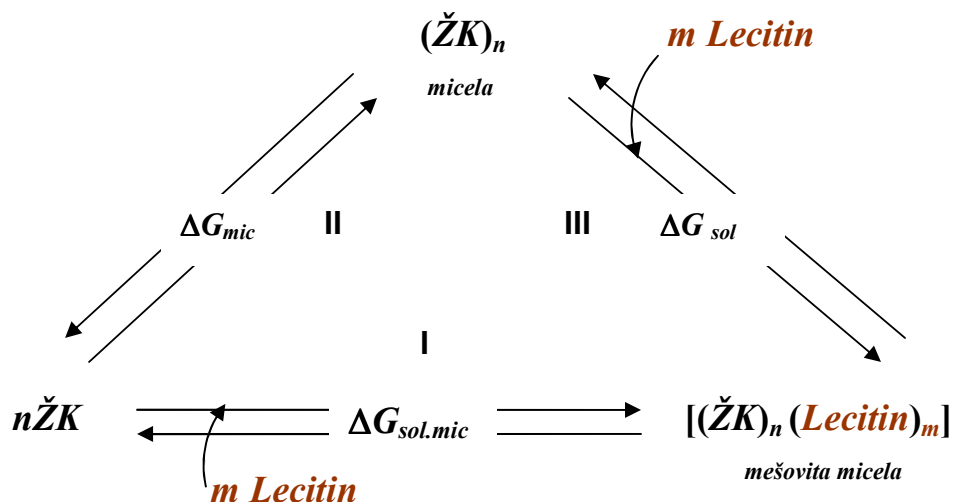
$\mathbf{gk}_1$  i  $\mathbf{gk}_2$ . Kako eksperimentalno određeni parametri ( $x_{Chm}$  i  $1/x_{Lec}$ ) imaju veću standardnu devijaciju u slučaju keto derivata ispitivanih žučnih kiselina, što onda znači da keto derivati ispitivanih žučnih kiselina imaju veći udeo (veći težinski koeficijent) u  $\mathbf{gk}_3$  nego holna, deoksiholna i henodeoksiholna kiselina, što onda uslovaljava odvajanje holne, deoksiholne i henodeoksiholne kiseline od njihovih keto derivata u  $\mathbf{gk}_1$ - $\mathbf{gk}_2$ - $\mathbf{gk}_3$  prostoru (Slika 5.5.). Prema tome pri grafičkom predstavljanju ispitivanih molekula u  $\mathbf{gk}_1$ - $\mathbf{gk}_2$ - $\mathbf{gk}_3$  prostoru uzrok nastajanju III grupe (holna, deoksiholna i henodeoksiholna kiselina) je u tome da  $\mathbf{gk}_3$  objašnjava deo ukupne varijacije koji uglavnom predstavlja grešku određivanja keto derivata ispitivanih žučnih kiselina, dok holna, deoksiholna i henodeoksiholna kiselina imaju malu grešku određivanja (malu težinu u  $\mathbf{gk}_3$ ) pa zato daju posebnu grupu.

Ovo potvrđuje i korelaciona matrica vrednosti glavih komponenti (Slika 5.6.). Korelaciona matrica vrednosti glavnih komponenti predstavlja grafičko prikazivanje svakog para  $\mathbf{gk}_n$ - $\mathbf{gk}_m$  ( $n, m = 1, 2, 3, 4, 5$ ) vrednosti vektora glavnih komponenti za ispitivane molekule, što znači da na primer mali kvadrat  $\mathbf{gk}_1$ - $\mathbf{gk}_2$  sa Slike 5.6. predstavlja korelaciju molekula na osnovu vrednosti glavnih komponenti  $\mathbf{gk}_1$  i  $\mathbf{gk}_2$ . Sa korelacione matrice (Slika 5.6) se vidi da se jedino kombinacijom  $\mathbf{gk}_1$  i  $\mathbf{gk}_2$  (ili  $\mathbf{gk}_2$  i  $\mathbf{gk}_1$ ) dobijaju jasno razdvojene linearne kongenerične grupe žučnih kiselina. Kombinacija  $\mathbf{gk}_1$  i  $\mathbf{gk}_2$  sa ostalim glavnim komponentima ( $\mathbf{gk}_3$ ,  $\mathbf{gk}_4$  i  $\mathbf{gk}_5$  - glavne komponente sa malim sopstvenim vrednostima) rezultuje haotičnu raspodelu objekata (žučnih kiselina) u dvodimenzionalnom prostoru vrednosti glavnih komponenti. Što je posledica toga da ostale glavne komponente objašnjavaju grešku određivanja u uzorku (matrici eksperimentalnih podataka).

Regresiona jednačina (5.5) se odnosi na sledeće žučne kiseline: deoksiholnu kiselinu, henodeoksiholnu kiselinu i njihove keto derivate i hiodeoksiholnu kiselinu (I grupa ispitivanih žučnih kiselina u ravni  $\mathbf{gk}_1$ - $\mathbf{gk}_2$  sa Slike 5.6.). Kao nezavisne varijabile u jednačinu (5.5) se uvode deskriptori: *Clog P*, *Dipol* i *CSEV*. Isti deskriptori žučnih kiselina su takođe uvedeni i u jednačinu (5.3, odnosi se na holnu kiselinu i njene keto derivate, II grupa ispitivanih žučnih kiselina u ravni  $\mathbf{gk}_1$ - $\mathbf{gk}_2$  sa Slike 5.6.). Ovo potvrđuje značaj uvedenih deskriptora, pošto inverzni kapacitet žučnih kiselina u micelarnoj solubilizaciji lecitina kod obe grupe ispitivanih žučnih kiselina (deoksiholna i henodeoksiholna kiselina i njihovi keto derivati sa hiodeoksiholnom kiselinom - I grupa ispitivanih žučnih kiselina odnosno holna kiselina i njeni keto derivati - II grupa ispitivanih žučnih kiselina) se opisuje sa istim deskriptorima.

Da bi se objasnilo uvođenje nezavisnih varijabila u regresione jednačine (5.3, 5.4 i 5.5), a to su molekulski deskriptori: *CSEV*, *DIPOL*, i *Clog P*, u ovom radu se primenjuje Hess-ov zakon za proces submicelarne solubilizacije lecitina sa žučnim kiselinama (I, Slika 5.7) i koje je okarakterisan sa  $\Delta G_{sol.mic}$  promenom slobodne energije. Prema tome proces submicelarne solubilizacije lecitina sa žučnim kiselinama se može posmatrati kao zbir procesa samoasocijacije žučnih kiselina II, okarakterisano sa  $\Delta G_{mic}$  promenom slobodne energije i procesa preuzimanja lecitina od strane već formiranih micela žučnih kiselina III, okarakterisano sa  $\Delta G_{sol}$  promenom slobodne energije (Slika 5.7.). Na osnovu toga slobodna energija submicelarne solubilizacije lecitina sa žučnim kiselinama  $\Delta G_{sol.mic}$  se može predstaviti kao:

$$\Delta G_{sol.mic} = \Delta G_{mic} + \Delta G_{sol} \quad (5.6)$$



Slika 5.7. Primena Hess-ovog zakona na proces submicelarne solubilizacije lecitina sa žučnim kiselinama.

Solubilizacija lecitina sa žučnim kiselinama se javlja ispod kritične micelarne koncentracije (CMC) ispitivanih žučnih kiselina, što bi to moglo da ospori proces samoasocijacije II sa Slike 5.7. Međutim *Megyesi* i *Biczók* [205] su dokazali fluorescentnom metodom da su primarne micelle Na-holata prisutne već iznad 2 mM (CMC za Na-holat je 8 mM [11]), dok u postojećoj literaturi je poznato da se primarne micelle javljaju na 6.3 mM za Na-holat odnosno 1.1 mM za Na-deoksiholat [206,207], što takođe opravdava primenu Hess-ovog zakona u ovom radu, to jest postojanje procesa II iako je koncentracija primenjenih žučnih kiselina submicelarna, to jest da micelle žučnih kiselina postoje i ispod kritične micelarne koncentracije.

Slobodna energija formiranja micelle [158] se sastoji iz dva terma:

$$\Delta G_{mic} = \Delta G_{hidrofob} + \Delta G_{rep} \quad (5.7)$$

$\Delta G_{hidrofob}$  predstavlja hidrofobne interakcije pri stvaranju micelle, dok  $\Delta G_{rep}$  predstavlja repulzivne interakcije jonizovanih grupa pri nastajanju micelle. Isto tako, prema *Tanfordu*  $\Delta G_{hidrofob}$  je proporcionalna (u pozitivnoj je korelaciji) sa slobodnom energijom raspodele (distribucije) monomera žučne kiseline između hidrofobne organske i vodene faze, pa samim tim i sa logaritmom koeficijenta raspodele  $Clog P$ . Prema tome važi sledeća relacija:

$$|\Delta G_{hidrofob}| \propto Clog P$$

Naime, što  $Clog P$  ima veću vrednost to je  $\Delta G_{hidrofob}$  negativnija. Prema jednačini (5.7) postoji sledeća proporcija:

$$|\Delta G_{mic}| \propto Clog P$$

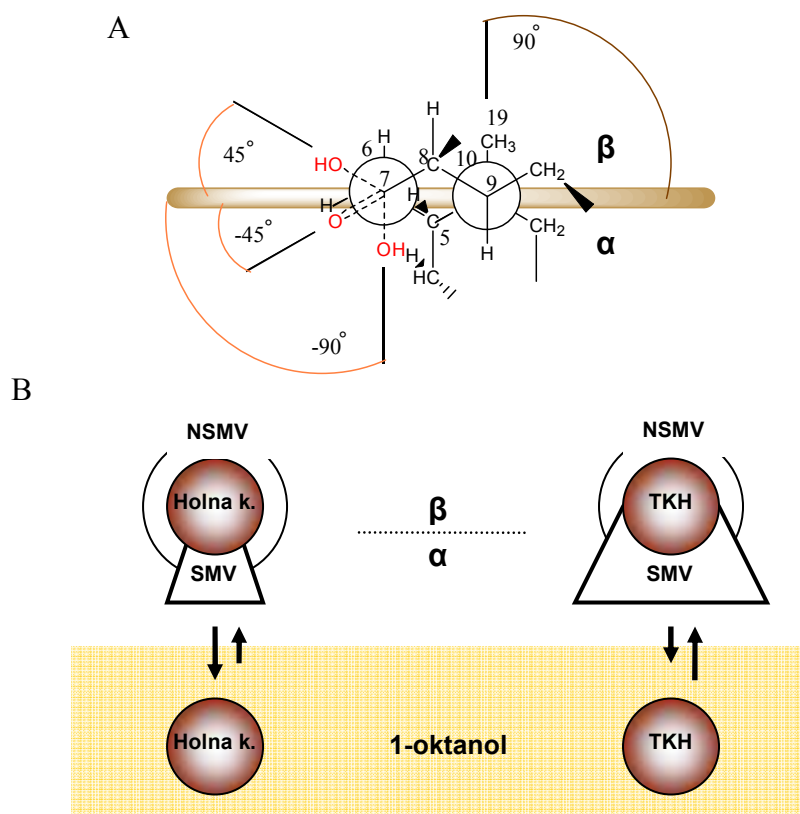
Kako je  $\Delta G_{mic}$  povezana sa  $\Delta G_{sol,mic}$  preme jednačini (5.6, na osnovu Hess-ovog zakona), to znači da postoji i sledeća proporcija:

$$|\Delta G_{sol.mic}| \propto \text{Clog } P$$

$\Delta G_{sol.mic}$  je proporcionalna sa koncentracijom  $x$  (izražene po molu žučne kiseline) supstance koja se rastvara putem micelarne solubilizacije žučne kiseline. Međutim, inverzni kapacitet žučne kiseline  $1/x_{Lec}$  u submicelarnoj solubilizaciji lecitina je recipročna vrednost  $x$  [12]. Stoga je:

$$1/x_{Lec} \propto 1/|\Delta G_{sol.mic}| \propto 1/\text{Clog } P$$

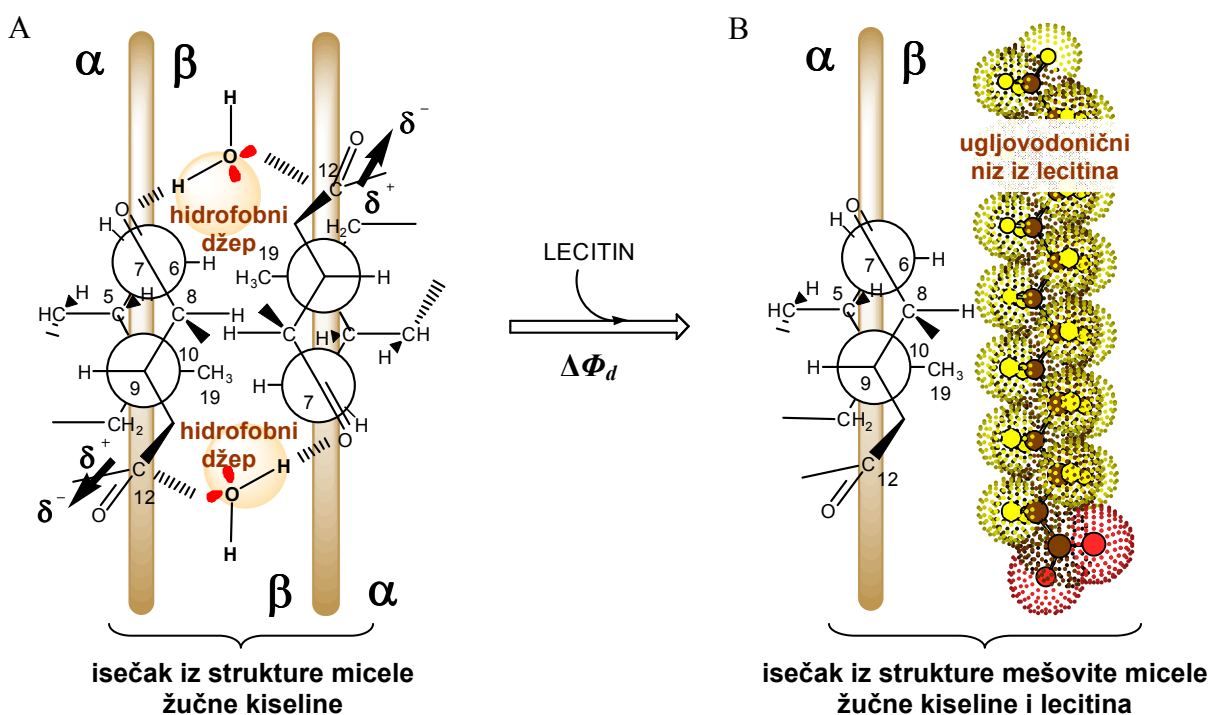
Ovo je u saglasnosti sa regresionim jednačinama (5.3, 5.4 i 5.5) gde  $\text{Clog } P$  ima negativni koeficijent, odnosno sa *Pearson*-ovom koeficijentom korelacije  $1/x_{Lec}$  i  $\text{Clog } P$  (-0.724; kod izračunavanja *Pearson*-ovog koeficijenta korelacije uključena je svaka ispitivana žučna kiselina, broj žučnih kiselina =13) [118]. Ukoliko neka žučna kiselina ima manju vrednost za  $1/x_{Lec}$  to onda znači da ta žučna kiselina efikasnije solubilizuje lecitin, to jest da je za rastvaranje jednog mola lecitina potrebna manja količina žučne kiseline. Iz Tabele 5.2. se vidi da holna, deoksiholna i henodeoksiholna kiselina imaju najniže vrednosti kapaciteta solubilizacije lecitina.



Slika 5.8. Uticaj supstitucije OH grupe keto grupom na raspodelu žučnih kiselina između organske i vodene faze (**SMV** vodoničnom vezom stabilizovani molekuli vode; **NSMV** vodoničnim vezama nestabilizovani molekuli vode).

Supstitucija OH grupe keto grupom kod holne, deoksiholne i henodeoksiholne kiseline dovodi do povećanja vrednosti  $1/x_{Lec}$  kod sintetisanih keto derivata, što znači da opada njihova moć solubilizacije lecitina ( $1/x_{Lec}$  i moć solubilizacije lecitina su obrnuto proporcionalni). Iz Tabele 5.2. se može uočiti da keto derivati ispitivanih žučnih kiselina za Clog  $P$  imaju manju vrednost nego holna, deoksiholna i henodeoksiholna kiselina. Ovo se može objasniti time, da supstitucija  $\alpha$  orijentisane OH grupe sa keto grupom pomera položaj kiseonika ka srednjoj ravni steroidnog sistema (Slika 5.8. A), što onda uzrokuje stabilizaciju molekula vode vodoničnim vezama (**SMV**) u solvacionom omotaču žučne kiseline (keto derivata) kako sa  $\alpha$  tako i delom sa  $\beta$  strane steroidnog skelete, to jest, kod keto derivata ispitivanih žučnih kiselina u solvacionom omotaču opada količina nestabilizovanih molekula vode (**NSMV**). Ovo znači, da su keto derivati ispitivanih žučnih kiselina više stabilizovani u vodi u odnosu na holnu, deoksiholnu i henodeoksiholnu kiselinu, pa samim tim keto derivati imaju i manju težnju za prelaz u organsku fazu, 1-oktanol (Slika 5.8. B), odnosno onda je i vrednost njihovog Clog  $P$  manja od holne, deoksiholne i henodeoksiholne kiseline, to jest opada njihova hidrofobnost. Ovo je u saglasnosti sa ispitivanjima Poše i saradnika [11] koji su zaključili da keto derivati holne kiseline imaju manju težnju ka samoasocijaciji pošto raste vrednost njihove kritične micelarne koncentracije.

Prema tome, manje vrednosti Clog  $P$  za keto derivate holne, deoksiholne i henodeoksiholne kiseline od vrednosti Clog  $P$  za holnu, deoksiholnu i henodeoksiholnu kiselinu znači da opada i hidrofobnost keto derivata, odnosno sposobnost ka samoasocijaciji kao i građenju mešovityh micela što je u skladu sa dobijenim regresionim jednačinama (5.3, 5.4 i 5.5) prema kojima opadanju Clog  $P$  odgovara povećanje vrednosti  $1/x_{Lec}$ , odnosno opadanje količine solubilizovanog lecitina u mešovitoj miceli.



Slika 5.9. Efekat "fjorda" kod mešovityh micela.

*DIPOL* je sledeći molekularni deskriptor koji se ugrađuje u regresione jednačine (5.3, 5.4 i 5.5) sa pozitivnim koeficijentom, što znači da sa povećanjem vrednosti *DIPOL* deskriptora raste inverzni kapacitet žučne kiseline u submicelarnoj solubilizaciji odnosno opada moć solubilizacije žučne kiseline (lecitina). Ovo se može objasniti sa postojanjem “fjord” efekta, koji prema *Menger*-u [174,175] predstavlja udubljenje na površini micela, pa molekuli vode dopiru i u hidrofobnu unutrašnjost micela [167,168]. *Poša* i saradnici [201] uvođenje dipol-dipol energije (*DIPOL*) žučnih kiselina u regresione jednačine koje opisuju promenu entropije formiranja micela  $T\Delta S_m$  objašnjavaju upravo postojanjem “fjord” efekta. Naime, ako žučna kiselina gradi micelu prema *Small*-ovom [157] modelu onda naročito kod keto derivata u miceli se između dva monomera formira hidrofobni džep (“fjord”) gde molekuli vode usled dipol-dipol interakcije stabilizuju micelu [201]. Međutim, pri nastajanju mešovite micela žučne kiseline i lecitina prema *Small-Chapman*-ovom [208] modelu  $\beta$  strana steroidnog skeleta žučne kiseline je u kontaktu sa hidrofobnom površinom masne kiseline iz lecitina koja u sebi nema dipolne momente pa molekuli vode u mešovitoj miceli ne doprinose stabilizaciji agregata lecitina i žučne kiseline (Slika 5.9.). To znači, da ako se sa  $\Delta\Phi_d$  označi deo promene slobodne energije  $\Delta G_{sol}$  koja se odnosi na energiju raskidanja sekundarnih hemijskih veza (dipol-dipol interakcije i vodonične veze) između vode i monomera žučne kiseline u miceli (Slika 5.9. A) pri nastajanju mešovite micela žučne kiseline i lecitina, onda je  $\Delta\Phi_d$  u sledećoj relaciji sa dipol-dipol energijom (*DIPOL*) samih žučnih kiselina:

$$\Delta\Phi_d \propto DIPOL \quad \forall \text{ (ispitivana žučna kiselina) } \Delta\Phi_d > 0 \quad (5.8)$$

Naime, ako je dipol-dipol energija (*DIPOL*) neke žučne kiseline veća, onda kod te žučne kiseline je veća i stabilizacija micela usled molekula vode u “hidrofobnom džepu” (Slika 5.9. A), pa je samim tim  $\Delta\Phi_d$  pozitivnije (endotermnije). Međutim kako je  $\Delta\Phi_d$  deo  $\Delta G_{sol}$  to znači da postoji i sledeća proporcija:

$$\Delta\Phi_d \propto 1/|\Delta G_{sol}|$$

Ovo znači, da što je  $\Delta\Phi_d$  pozitivniji to je  $\Delta G_{sol}$  manje negativan, međutim kako je formiranje mešovitih micela spontan proces to je  $\Delta G_{sol}$  uvek negativan. Odnosno, ako se uzme u obzir relacija (5.8) onda je gornja proporcija:

$$DIPOL \propto 1/|\Delta G_{sol}|$$

Ako se uzme u obzir *Hess*-ov zakon (Slika 5.7.) i jednačina (5.6) onda između deskriptora *DIPOL* i slobodne energije formiranja mešovite micela žučne kiseline i lecitina ( $\Delta G_{sol,mic}$ ) postoji sledeća proporcija:

$$DIPOL \propto 1/|\Delta G_{sol,mic}|$$

Kako na osnovu *Armstrong* i *Cary*-jevog [36] rada postoji  $1/x_{Lec} \propto 1/|\Delta G_{sol,mic}|$  te se gornja proporcija može napisati u obliku:

$$DIPOL \propto 1/x_{Lec}$$

što je u saglasnosti sa regresionim jednačinama (5.3, 5.4 i 5.5) odnosno sa *Pearson*-ovim koeficijentom korelacije  $1/x_{Lec}$  i *DIPOL* deskriptora (+0.844; kod izračunavanja *Pearson*-ovog koeficijenta korelacije uključena je svaka ispitivana žučna kiselina, broj žučnih kiselina =13) [118].

U regresione jednačine (5.3 i 5.4) se uvodi i *Connelly*-ev [43-45] rastvaraču nedostupna zapremina (*CSEV*). *Poša* i saradnici su ispitivali entropije formiranja micela žučnih kiselina i zaključili da je *CSEV* u pozitivnoj korelaciji sa količinom nestabilizovanih molekula vode (**NSMV**) u solvatacionom omotaču žučne kiseline koji se oslobađaju pri formiranju micela, i koji obezbeđuje entropijsku vučnu silu za proces micelizacije [201]. Prema tome, *CSEV* je proporcionalan sa slobodnom energijom formiranja micela  $\Delta G_{mic}$  (što je vrednost *CSEV* deskriptora veća to je  $\Delta G_{mic}$  negativnija) :  $CSEV \propto |\Delta G_{mic}|$  odnosno kako je  $\Delta G_{mic}$  prema *Hess*-ovom zakonu (jednačina 5.6, Slika 5.7.) povezana sa slobodnom energijom micelarne solubilizacije lecitina  $\Delta G_{sol.mic}$  to znači da postoji i sledeća relacija:  $CSEV \propto |\Delta G_{sol.mic}|$ . Kako je  $\Delta G_{sol.mic}$  obrnuto proporcionalna sa  $1/x_{Lec}$ , to znači da je i *CSEV* obrnuto proporcionalan sa  $1/x_{Lec}$ . Ovo je u saglasnosti sa negativnim koeficijentom *CSEV* deskriptora iz regresione jednačine (5.3 i 5.4) odnosno sa *Pearson*-ovim koeficijentom korelacije (-0.559; kod izračunavanja *Pearson*-ovog koeficijenta korelacije uključena je svaka ispitivana žučna kiselina, broj žučnih kiselina =13) [201]. Prema tome sa opadanjem vrednosti *CSEV* deskriptora žučnih kiselina opada i njihova moć submicelarne solubilizacije lecitina.

Iz gore navedenog može se zaključiti da supstitucija OH grupe keto grupom kod ispitivanih žučnih kiselina smanjuje njihovu hidrofobnost, to jest, njihovu moć solubilizacije lecitina. Ovo je u saglasnosti sa ispitivanjima *Sewell*-a i saradnika [196] koji smatraju da supstitucija OH grupe sa keto grupom kod tauro konjugata holne kiseline smanjuje težnju formiranja mešovite micela sa lecitinom. Isto tako iz Tabele 5.1. se vidi da holna kiselina ima slabiju moć solubilizacije lecitina (ima veću vrednost  $1/x_{Lec}$ ) nego deoksiholna i henodeoksiholna kiselina. To je u skladu sa rezultatima *Baskina* i *Frosta*-a [209] koji su ispitivali submicelarnu agregaciju fluorescentnih fosfolipida sa Na-holatom odnosno Na-taurodeoksiholatom. Oni su zaključili da se za molekul fosfolipida vezuje veći broj hidrofobnije žučne kiseline (taurodeoksiholna kiselina) i koja ima ujedno i manju konstantu disocijacije nego holna kiselina. Ukoliko neka žučna kiselina ima manju konstantu disocijacije iz mešovite micela onda je ravnoteža I sa Slike 5.7. pomenjena ka stvaranju mešovite micela žučne kiseline i lecitina, što znači da je onda za solubilizaciju jednog mola lecitina potrebna i manja količina žučne kiseline (pošto se računa zbir žučne kiseline iz mešovite micela i slobodne žučne kiseline koja je u ravnoteži sa žučnom kiselinom iz mešovite micela), to jest da žučna kiselina sa većom ravnotežnom konstantom formiranja mešovite micela ima veću moć solubilizacije lecitina, odnosno manju vrednost  $1/x_{Lec}$ .

*Armstrong* i *Cary* su u svojim ispitivanjima [36] dali linearnu zavisnost između kapaciteta žučnih kiselina u micelarnoj solubilizaciji holesterola i retencionog faktora (HPLC). U ovom radu je takođe određena linearna zavisnost između inverznog kapaciteta žučnih kiselina u submicelarnoj solubilizaciji lecitina i molekularne lipofilnosti  $R_{M0}$  ( $R_{M0}$  je reticioni koeficijent kod RPTLC). Linearna zavisnost između  $1/x_{Lec}$  i  $R_{M0}$  se dobija za holnu kiselinu i njene keto derivate:

$$1/x_{Lec} = -3.17 R_{M0} + 11.80 \quad (5.9)$$

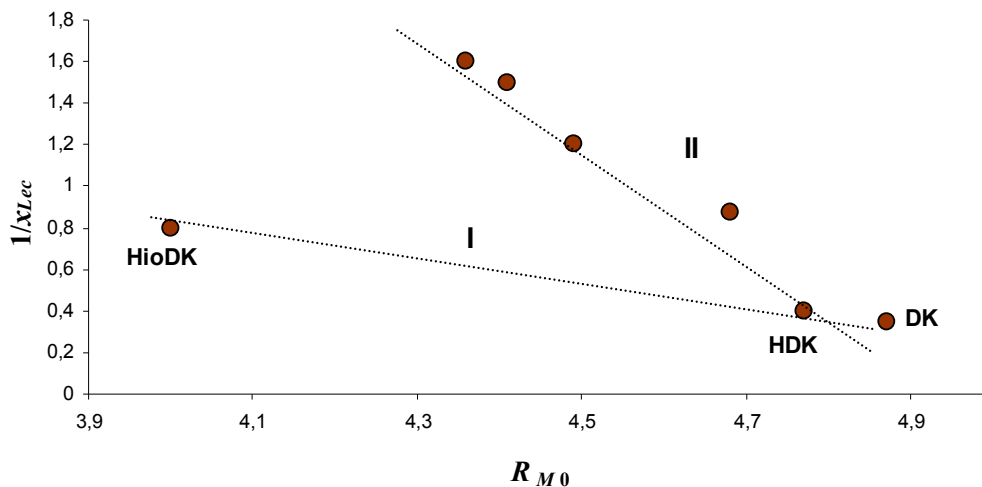


$$r = 0.9656$$

Linearna jednačina (5.9) ima znatno manju vrednost koeficijenta regresije  $r$  nego višestruka linearna regresiona jednačina (5.3) koja se takođe odnosi na holnu kiselinu i njene keto derivate. Iz Tabele 5.3. se vidi da su vrednosti za  $1/x_{Lec}$  koji se dobijaju na osnovu višestruke linearne jednačine (5.3) veoma bliske sa eksperimentalno određenim, u odnosu na one koji se dobijaju na osnovu linearne jednačine (5.9) i koji pokazuju odstupanja od eksperimentalnih vrednosti od 6 do 18%, što potvrđuje i primena višestruke linearne regresije.

Tabela 5.3. Upoređivanje eksperimentalno dobijenih vrednosti za  $1/x_{Lec}$  sa vrednostima za  $1/x_{Lec}$  koji su dobijeni višestrukoum regresionoum jednačinoum (VRJ) (5.3) i linearnoum jednačinoum (LJ) (5.9)

Žučne kiseline	$1/x_{Lec}$		
	Eksperimentalne vrednosti	VRJ (5.3)	LJ (5.9)
holna kiselina	0.65	0.65	0.71
7-monoketoholna kiselina	2.20	2.21	2.06
12-monoketoholna kiselina	2.00	1.98	1.75
3,7-diketoholna kiselina	2.75	2.75	2.86
7,12-diketoholna kiselina	2.50	2.51	2.95
3,7,12-triketoholna kiselina	4.00	3.99	3.68



Slika 5.10. Hiodeoksiholna kiselina (HioDK) sa deoksiholnoum kiselinoum (DK) i henodeoksiholnoum kiselinoum (HDK) formira novu linearnu kongeneričnu grupu (I).

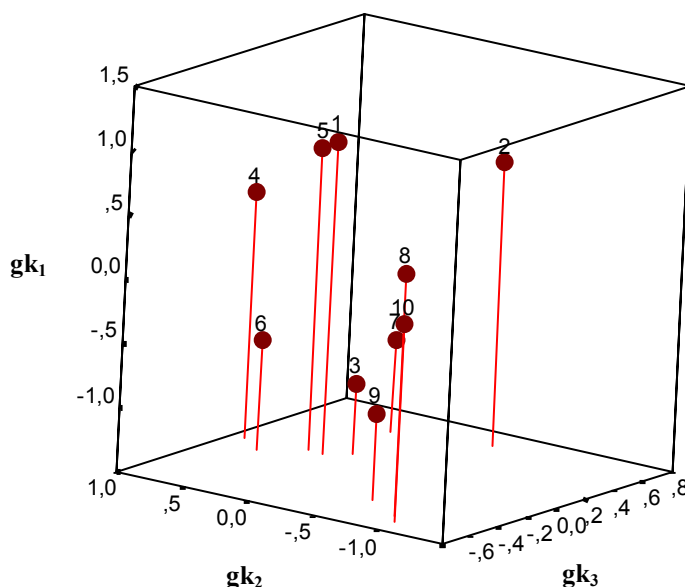
Za deoksiholnu i henodeoksiholnu kiselinu sa njihovim keto derivatima takođe se dobija linearna zavisnost između  $1/x_{Lec}$  i  $R_{M0}$ :

$$1/x_{Lec} = -2.56 R_{M0} + 12.78 \quad (5.10)$$

$$r = 0.9865$$

Međutim, višestruka linearna regresiona jednačina (5.5) koja se odnosi na I grupu ispitivanih žučnih kiselina ravni  $\mathbf{gk}_1\text{-gk}_2$  sa Slike 5.6., za razliku od linearne jednačine (5.10) koja uključuje i hiodeoksiholnu kiselinu. Dok, u prostoru  $1/x_{Lec}$  i  $R_{M0}$  hiodeoksiholna kiselina je odvojena od keto derivata deoksiholne i henodeoksiholne kiseline (Slika 5.10.). Stoga linearna jednačina (5.10) (Slika 5.10. II) ne obuhvata hiodeoksiholnu kiselinu.

Višestruke regresione jednačine (5.3, 5.4 i 5.5) predstavljaju bolje modele za predviđanje inverznog kapaciteta žučnih kiselina u submicelarnoj solubilizaciji lecitina  $1/x_{Lec}$  nego linearne jednačine (5.9 i 5.10). Ovo se može objasniti pomoću koeficijenta glavnih komponenti (analiza metodom glavnih komponenti obuhvata sve ispitane žučne kiseli sa eksperimentalnim parametrima (Tabela 5.1.) i molekulskim deskriptorima (Tabela 5.2.))  $\mathbf{gk}_1\text{-gk}_2\text{-gk}_3$  koji objašnjavaju 94.61% varijacije (Slika 5.11.). Naime, pri grafičkom predstavljanju koeficijenata glavnih komponenti u  $\mathbf{gk}_1\text{-gk}_2\text{-gk}_3$  prostoru dobivene tačke odgovaraju varijabilima iz polazne matrice podataka (Tabela 5.1. i Tabela 5.2.). Što su varijabile (tačke u  $\mathbf{gk}_1\text{-gk}_2\text{-gk}_3$  prostoru) bliže jedna drugoj, to je i njihova međusobna korelacija veća. Sa Slike 5.11. se vidi da je između  $R_{M0}$  i  $Clog P$  velika korelacija, što znači da u višestrukim linearnim regresionim jednačinama (5.3, 5.4 i 5.5)  $Clog P$  je adekvatna zamena za molekularnu lipofilnost  $R_{M0}$ . Isto tako sa Slike 5.11. se vidi da korelacija između  $1/x_{Lec}$  i  $R_{M0}$  odnosno  $1/x_{Lec}$  i  $Clog P$  se malo razlikuje, što znači da tačnija procena vrednosti  $1/x_{Lec}$  pomoću višestruko linearno regresionih jednačina (5.3, 5.4 i 5.5) u odnosu na linearne jednačine (9,10) je posledica velike međusobne korelaciji  $1/x_{Lec}$  sa molekulskim deskriptorima  $DIPOL$  i  $CSEV$  (Slika 5.10.) koje ulaze u regresione jednačine (5.3, 5.4 i 5.5).



1:  $R_{M0}$ ; 2:  $x_{Chm}$ ; 3:  $1/x_{Lec}$ ; 4:  $\text{Log } P$ ; 5:  $Clog P$ ; 6: *Ovalnost*; 7: *DIPOL*; 8: *CSEV*;  
9: *Winer*; 10: *MR*.

Slika 5.11. Koeficijenti glavnih komponenti  $\mathbf{gk}_1\text{-gk}_2\text{-gk}_3$  (ukupna varijacija je 94,61%).

### 5.2.3. Micelarna solubilizacija holesterola pomoću žučnih kiselina

U ovom radu je kapacitet žučnih kiselina za solubilizaciju holesterol monohidrata  $x_{Chm}$  povezana sa molekulskim deskriptorima pomoću regresionih jednačina sa ciljem da se predvidi moć solubilizacije holesterola i kod onih žučnih kiselina kod kojih  $x_{Chm}$  nije eksperimentalno određen. Za  $x_{Chm}$  kao zavisne varijable su dobijene sledeće jednačine:

$$x_{Chm} = 8.02(\pm 0.24) + 2.98 \cdot 10^{-2} (\pm 5 \cdot 10^{-3}) \text{Clog } P - 4.28(\pm 0.18) \text{Ovality} - 1.25 \cdot 10^{-3} (\pm 0.00) \text{Winer-indexs} + 2.19 \cdot 10^{-3} (\pm 1 \cdot 10^{-3}) MR \quad (5.11)$$

$$n = 7; r = 0.999; F = 1096; s = 1.11 \cdot 10^{-3}$$

$$x_{Chm} = 7.59(\pm 0.18) + 3.05 \cdot 10^{-2} (\pm 2 \cdot 10^{-3}) \text{Clog } P - 4.08(\pm 0.09) \text{Ovality} - 1.19 \cdot 10^{-3} (\pm 0.00) \text{Winer-indexs} + 2.95 \cdot 10^{-3} (\pm 1 \cdot 10^{-3}) MR \quad (5.12)$$

$$n = 6; r = 0.9999; F = 5013; s = 5.03 \cdot 10^{-4}$$

Višestruka linearna regresiona jednačina (5.11) se odnosi na sledeće žučne kiseline: deoksiholnu i henodeoksiholnu kiselinu i njihove keto derivate kao i hiodeoksiholnu kiselinu. U jednačini (5.12), pored toga što je iz gornje grupe ispitivanih žučnih kiselina isključena hiodeoksiholna kiselina, kapacitet solubilizacije holesterola  $x_{Chm}$  opisuju isti deskriptori kao i kod jednačine (5.11), što ide u prilog da hiodeoksiholna kiselina zajedno sa deoksiholnom i henodeoksiholnom kiselinom odnosno sa njihovim keto derivatima formira linearnu kongeneričnu grupu (**I** grupa u ravani **gk<sub>1</sub>-gk<sub>2</sub>** sa Slike 5.4.).

Pozitivna korelacija između  $x_{Chm}$  i  $\text{Clog } P$  odnosno  $x_{Chm}$  i molarne refrakcije ( $MR$ ) se može objasniti hidrofobnim interakcijama između žučnih kiselina i holesterola. Naime, mešovite micelle između žučne kiseline i holesterola imaju manji agregacioni broj nego mešovite micelle između žučne kiseline i lecitina. Iz dostupne literature [206] agregacioni broj za mešovitu micelu Na-tauroholata i holesterola je 6, dok je agregacioni broj za mešovitu micelu holesterola i Na-taurodeoksiholata 15.9. Kod mešovitih micela malih dimenzija postoje veće međusobne hidrofobne interakcije između molekula holesterola i molekula žučnih kiselina stoga je  $x_{Chm}$  u pozitivnoj korelaciji sa  $\text{Clog } P$  vrednostima. Naime, što je veća vrednost  $\text{Clog } P$ , žučna kiselina je hidrofobnija. Isto tako, uvođenje molarne refrakcije ( $MR$ ) žučne kiseline u regresione jednačine (5.11 i 5.12) ukazuje na međusobne sekundarne hemijske interakcije između holesterola i žučne kiseline u mešovitoj miceli, pošto je  $MR$  proporcionalna sa polarizabilnošću molekula. Za razliku od ovog, kod velikih mešovitih micela između žučne kiseline i lecitina (*Small-Chapman-ov* model) u kome jezgro micelle čine 20-30 molekula lecitina, molekuli lecitina koji su u centru nisu u kontaktu sa žučnim kiselinama sa periferije, zbog čega se  $MR$  ne uvodi u jednačine (5.3, 5.4 i 5.5). Uvođenje molekulskih deskriptora, za ovalnost i *Winer-ov* indeks, koji određuju oblik molekula žučne kiseline, u višestruke linearne regresione jednačina (5.11 i 5.12) takođe potvrđuje nastajanje mešovitih micela žučne kiseline i holesterola sa malim agregacionim brojem (u odnosu sa lecitinom) pošto hidrofobne

interakcije holesterola znatno zavise od geometrije molekula žučne kiseline koja se menja pri supstituciji OH grupe sa keto grupom [208].

Međutim, linearna jednačina koja povezuje  $x_{Chm}$  i  $R_{M0}$  se ne može primeniti na grupu žučnih kiselina (deoksiholna i henodeoksiholna kiselina i njihove keto derivate kao i hiodeoksiholnu kiselinu) na koje se odnosi višestruka linearna regresiona jednačina (5.11), već se dobija linearna jednačina (5.13) za keto derivate deoksiholne i henodeoksiholne kiseline (Slika 5.12):

$$x_{Chm} = 0.07 R_{M0} - 0.28 \quad (5.13)$$

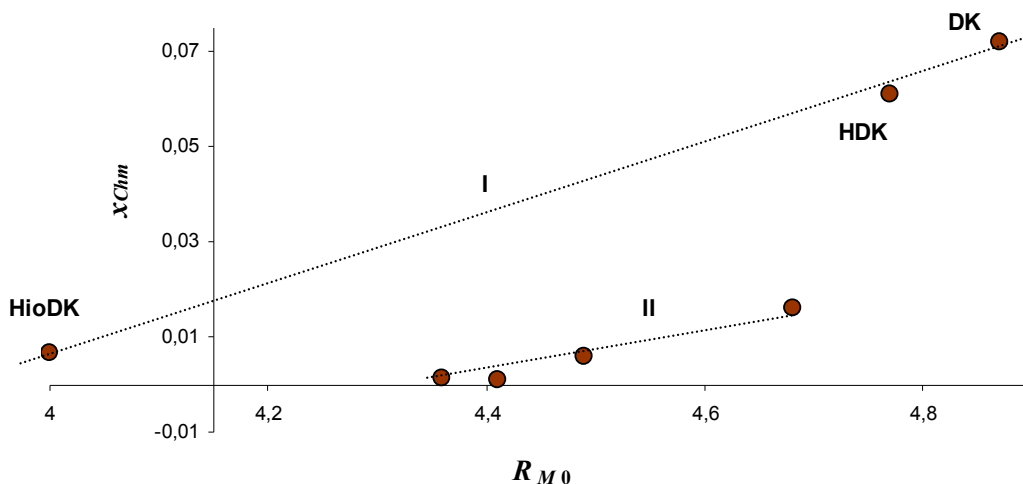
$$r = 0.9973$$

Odnosno linearna jednačina (5.14) za deoksiholnu, henodeoksiholnu i hiodeoksiholnu kiselinu:

$$x_{Chm} = 0.05 R_{M0} - 0.22 \quad (5.14)$$

$$r = 0.9737$$

Manja primenljivost linearnog modela (5.13 i 5.14) od modela višestruke linearne regresije (5.11) se može objasniti sa relativno velikom udaljenošću  $R_{M0}$  varijabile od  $x_{Chm}$  u prostoru koeficijenata  $\mathbf{gk}_1\text{-}\mathbf{gk}_2\text{-}\mathbf{gk}_3$  (Slika 5.11).



Slika 5.12. Hiodeoksiholna kiselina (HioDK), deoksiholna kiselina (DK) i henodeoksiholna kiselina (HDK) formiraju novu linearnu kongeneričnu grupu (I). Krivu (II) čine keto derivati DK i HDK.

Za holnu kiselinu i njene keto derivate se ne može postaviti nijedna adekvatna višestruka linearna regresiona jednačina za  $x_{Chm}$ , jer koeficijenti regresione jednačine imaju greške do 50%, što je posledica relativno niske vrednosti  $x_{Chm}$  za keto derivate (naročito za di- i triketo derivate) u odnosu na holnu kiselinu. Ovo takođe potvrđuje da se samo za keto derivate holne kiseline može dobiti linearna jednačina za  $x_{Chm}$  i  $R_{M0}$ :

$$x_{Chm} = 0.003R_{M0} - 0.009 \quad (5.15)$$

$$r = 0.9847$$

#### 5.2.4. Hemolitički potencijal i osmotska rezistencija žučnih kiselina

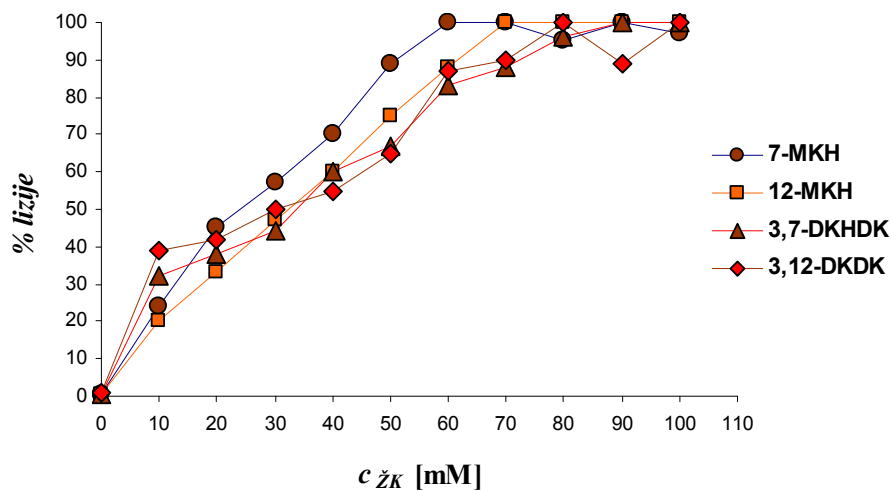
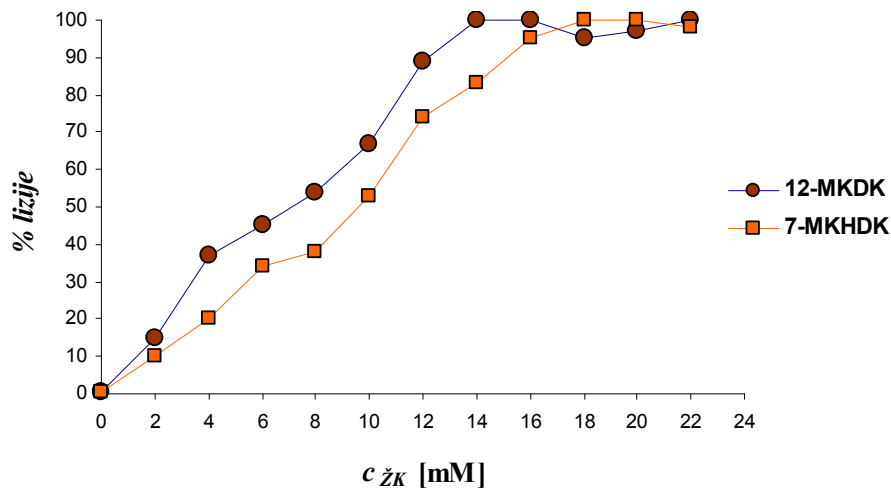
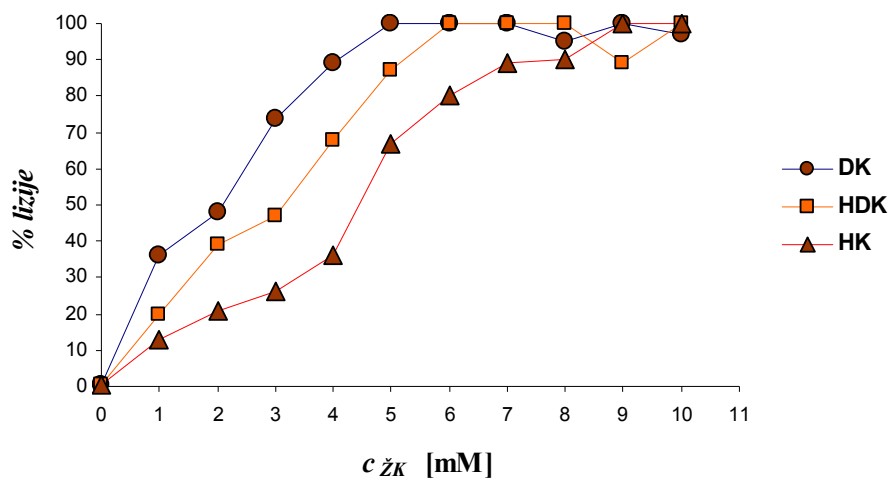
Žučne kiseline se odavno koriste u eksperimentalnoj biohemiji za razaranje ćelijske membrane. Međutim, kada se žučne kiseline primene kao promotori transporta nekih lekova kroz ćelijsku membranu kao sporedni efekat može da se javi membranska toksičnost. U literaturi se toksični efekat žučnih kiselina kvantitativno izražava primenom hemolitičkog potencijala, koji predstavlja koncentraciju žučne kiseline pri kojoj je u *in vitro* eksperimentu došlo do 50% lizije eritrocita, odnosno 100% lizije eritrocita [14].

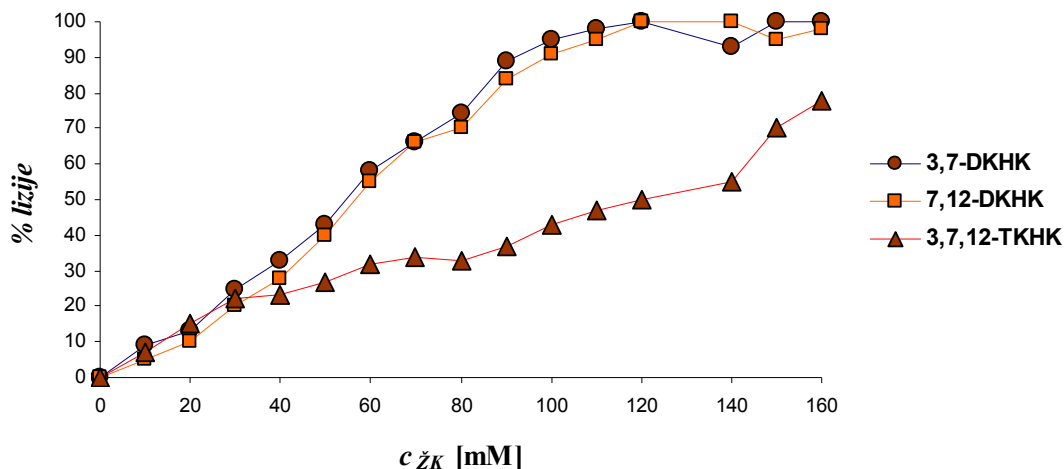
Tabela 5.4. Koncentracije žučnih kiselina  $c_{\text{žk}}$  [mM] koje izazivaju 50% odnosno 100% lizije eritrocita

Žučne kiseline	CMC	$c_{\text{žk}}$ (50% lizije)	$c_{\text{žk}}$ (100% lizije)
deoksiholna kiselina	5.50	2.00	5.00
henodeoksiholna kiselina	5.75	3.00	6.00
holna kiselina	8.00	4.50	8.00
12-monoketodeoksiholna kiselina	18.50	7.00	11.00
3,12-diketodeoksiholna kiselina	72.00	28.50	80.00
7-monoketohenodeoksiholna kiselina	22.50	9.50	17.50
3,7-diketohenodeoksiholna kiselina	75.00	32.50	90.00
12-monoketoholna kiselina	65.00	35.00	70.00
7-monoketoholna kiselina	60.00	25.00	60.00
7,12-diketoholna kiselina	100.00	58.00	120.00
3,7-diketoholna kiselina	102.00	55.00	120.00
3,7,12-triketoholna kiselina	140.00	130	160<

n = 5

Sa Slike 5.13. i Tabele 5.4. se vidi da postoji korelacija između vrednosti za kritične micelarne koncentracije i hemolitičkog potencijala. Između CMC i koncentracije žučne kiseline na kojoj je došlo do 50% lizije eritrocita *Pearson*-ova korelacija iznosi 0.984 ( $p < 0.01$ ), dok između vrednosti CMC i koncentracije žučne kiseline na kojoj je 100% lizija eritrocita *Perason*-ova korelacija postaje značajnija i iznosi 0.994 ( $p < 0.01$ ). Iz hemolitičkog potencijala ispitivanih žučnih kiselina se može zaključiti da kod hidrofobnih planarno amfifilnih molekula kao što su deoksiholna, henodeoksiholna i holna kiselina 100% lizija eritrocita se javlja pri njihovim koncentracijama, koje su identične sa njihovim kritičnim micelarnim koncentracijama. Supstitucija OH grupe sa keto grupom kod ispitivanih žučnih kiselina smanjuje njihovu hidrofobnost, stoga kod keto derivata 100% lizija eritrocita se javlja iznad njihovih kritičnih micelarnih koncentracija, a to se vidi da je hemolitički potencijal naročito smanjen kod di- i triketo derivata holne kiseline. Naime 3,7,12-triketoholna kiseline čak ni pri koncentraciji od 160 mM (Na-triketohalt) ne dostiže maksimalni hemolitički potencijal. Naime, molekuli sa malim vrednostima CMC imaju velike hidrofobne površine, to jest, veliku moć solubilizacije lecitina, pa će gradeći mešovite micelle sa lecitinom iz ćelijske membrane, narušavati integritet membrane.





Slika 5.13. Uticaj koncentracije žučnih kiselina  $c_{\text{žK}}$  na hemolitički potencijal.

Osmotska rezistencija je sposobnost membrane eritrocita da smanji neravnotežni fluks (neto fluks) molekula vode kroz membranu koja se javlja kada je ćelija izložena hipo- ili hiperosmotskom rastvoru. Membrana eritrocita je utoliko otpornija (rezistentna) promeni osmolalnosti sredine (rastvora) u kojoj se nalazi ukoliko na svojoj površini ima manje pore kao i ako je broj pora manji, pošto je onda i permeabilnost membrane prema vodi manja. Osmotska rezistencija se onda menja (smanjuje) kada se naruši integritet membrane, a to je kada površinski aktivni molekuli grade mešovite micide sa fosfolipidima ćelijske membrane, što dovodi do povećanja prečnika i broja pora (stvaraju se “rupe”) odnosno raste permeabilnost membrane ka vodi.

U ovom radu uticaj žučnih kiselina na osmotsku rezistenciju kod eritrocita se ispituje na taj način što se eksperimentalne životinje tretiraju sa ispitivanom žučnom kiselinom, te posle faze raspodele [210] (distribucije) žučne kiseline u organizmu eksperimentalne životinje uzima se uzorak krvi (45 minuta posle aplikacije) koji se stavlja u hipotonične rastvore NaCl (rastvor NaCl je hipotoničan ako je njena koncentracija manja od 0.9%), koncentracija NaCl se kreće od 0.75% do 0.00% (destilovana voda). Pošto se eritrociti u ovom ogledu nalaze u hipotoničnom rastvoru postoji neto fluks vode  $J_{\text{voda}}$  iz rastvora u intracelularni prostor eritrocita koja je data sledećom jednačinom:

$$J_{\text{voda}} = p_{\text{voda}} \Delta\pi$$

U gornjoj jednačini je  $p_{\text{voda}}$  permeabilnost membrane prema molekulima vode, dok je  $\Delta\pi$  razlika osmotskog pritiska na površini membrane (unutar ćelije je osmotski pritisak veliki, dok u hipotoničnom rastvoru osmotski pritisak ima malu vrednost, molekuli vode se kreću prema pravcu porasta osmotskog pritiska). Što je rastvor manje koncentracije u kojem se nalaze eritrociti (hipotoničniji)  $\Delta\pi$  je veće, pa prema gornjoj jednačini i fluks vode bi trebalo da raste, međutim ako permeabilnost membrane ka vodi ostaje mala onda i pored velikog  $\Delta\pi$  nema transporta molekula vode u unutrašnjost ćelije. Ukoliko ksenobiotik ne oštećuje membranu smatra se da do 0.45% NaCl rastvor nema dovoljnu  $\Delta\pi$  da pored male permeabilnosti membrane ka vodi uzrokuje neto fluks vode u

membranu i da usled bubrenja dođe do hemolize. U rastvorima koji imaju manju koncentraciju od 0.45% NaCl i pored male permeabilnosti membrane  $\Delta\pi$  je dovoljno velik, stoga se javlja neto fluks vode, odnosno hemoliza. Međutim ukoliko žučna kiselina oštećuje membranu onda raste propustljivost (permeabilnost) membrane ka vodi  $p_{voda}$ , pa i u hipotoničnom rastvoru iznad 0.45% NaCl  $\Delta\pi$  je dovoljno velik da se pojavi neto fluks vode ka unutrašnjosti eritrocita, što dovodi do bubrenja odnosno hemolize, što znači da opada osmotska rezistencija.

Tabela 5.5. Osmotska rezistencija (žuta boja označava hemolizu, dok crvena boja označava koncentraciju NaCl iznad kojeg ako dolazi do hemolize, onda znači da opada osmotska rezistencija)

ŽK	koncentracija NaCl 10 <sup>-1</sup> [%]															
	7.5	7.0	6.5	6.0	5.5	5.0	4.5	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	1.50	1.0	0.5	0.0
0																
1																
2																
3																
4																
5																
6																
7																
8																
9																
10																
11																
12																

n = 5

0: fiziološki rastvor; 1: DK; 2: HDK; 3: HK; 4: 12-MKDK; 5: 3,12-DKDK; 6: 7-MKHDK; 7: 3,7-DKHDK; 8: 12-MKH; 9: 7-MKH; 10: 7,12-DKH; 11: 3,12-DKH; 12: 3,7,12-TKH; 13: HiDK.

Od ispitivanih žučnih kiselina smanjena osmotska rezistencija se javlja kod deoksiholne i henodeoksiholne kiseline (Tabela 5.5.). Smanjena osmotska rezistencija kod deoksiholne i henodeoksiholne kiseline verovatno je posledica što ove žučne kiseline imaju veliki kapacitet solubilizacije lecitina, pa se narušava integritet membrane.

### 5.2.5. Određivanje uticaja Na-soli žučnih kiselina na resorpciju lidokaina i verapamila u tankom crevu

U farmakodinamičkim ispitivanjima promotornog delovanja žučnih kiselina na transport leka uobičajna je praksa da se eksperimentalnoj životinji prvo aplicira žučna kiselina pa tek onda ispitivani lek. Stoga na kraju ovog rada ispitan je uticaj žučne kiseline na resorpciju lidokaina i verapamila kroz membranu creva koja je predhodno tretirana sa Na-solima žučnih kiselina. Efekat žučnih kiselina se prati merenjem smanjenja koncentracije ispitivanog leka nakon 5 minuta posle njihove *in vitro* aplikacije. Naime, uticaj žučnih kiselina na koncentraciju leka u rastvoru koji okružuje



crevo posle deset minuta, se ne razlikuje od kontrole jer se najveće promene u koncentraciji leka dešavaju u prvih 5 minuta.

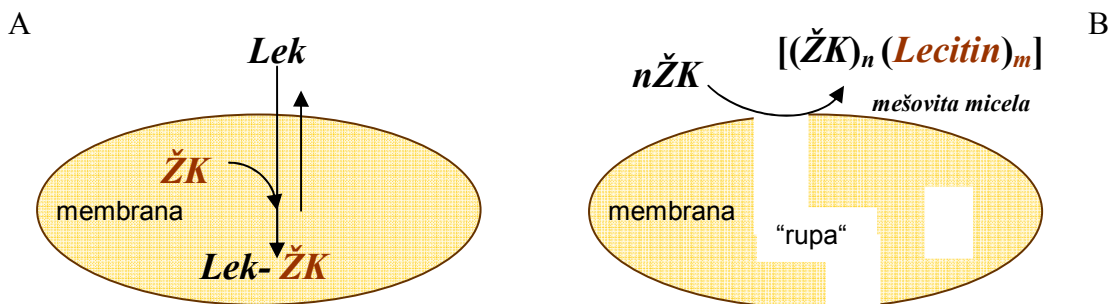
Tabela 5.6. Koncentracije ispitivanih lekova posle 5 minuta aplikacije u in vitro eksperimentu

Žučne kiseline	CMC [mM]	<i>c</i> (lidokain) [mM]	<i>c</i> (verapamil) [mM]
kontrola		35.12±4.74	31.78±3.31
deoksiholna kiselina	5.50	31.70±4.09	28.38±3.52
henodeoksiholna kiselina	5.75	32.02±3.50	28.91±4.12
holna kiselina	8.00	28.17±3.98	25.80±3.19°
12-monoketodeoksiholna kiselina	18.50	34.09±2.61	32.00±2.50
3,12-diketodeoksiholna kiselina	72.00	36.00±2.50	34.36±4.41
7-monoketohenodeoksiholna kiselina	22.50	30.84±5.47	30.51±2.98
3,7-diketohenodeoksiholna kiselina	75.00	33.98±7.04	32.37±4.60
12-monoketoholna kiselina	65.00	29.42±6.80	31.36±2.52
7-monoketoholna kiselina	60.00	27.76±6.30°	30.90±2.76
7,12-diketoholna kiselina	100.00	33.00±2.98	32.84±2.71
3,7-diketoholna kiselina	102.00	34.73±4.00	31.93±2.16
3,7,12-triketoholna kiselina	140.00	32.90±3.75	33.25±3.04

n = 5; °p<0.05

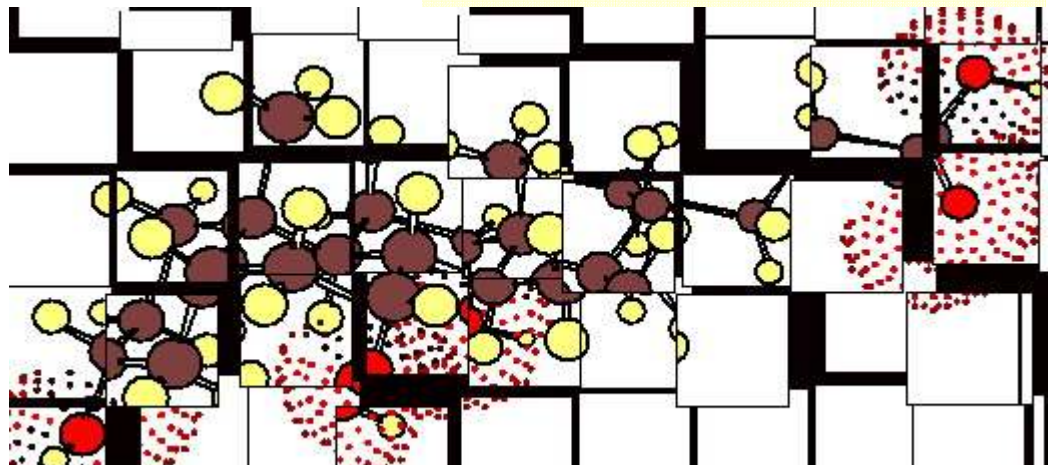
Iz Tabele 5.6. se vidi da je u kontrolnom ogledu veći stepen resorpcije verapamila posle 5 minuta od resorpcije lidokaina, što je i očekivano na osnovu veće lipofilnosti verapamila od lidokaina. Opadanje koncentracije lidokaina je statistički značajno u prisustvu 7-monoketoholne kiseline. Naime, lidokain i 7-monoketoholna kiselina grade kompleks sa vodoničnim vezama ( $K = 14.22 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ ), dok kod verapamila statistički značajno opadanje koncentracije se javlja ukoliko je membrana creva tretirana Nalohatom. Ovo se takođe može objasniti sa efikasnim građenjem kompleksa verapamila i holne kiseline (struktura kompleksa je objašnjena u poglavju adsorpcije na aktivnom uglju na strani 162). Izrazito hidrofobne žučne kiseline, deoksiholna i henodeoksiholna kiselina, ne povećavaju resorpciju ispitivanih lekova.

Na osnovu ovog ogleda se može zaključiti da građenje mešovite micelle lecitina iz ćelijske membrane tankog creva sa hidrofobnom žučnom kiselinama ne utiče na resorpciju ispitivanog leka, to jest ne nastaju “rupe” u ćelijskoj membrani, već da bi došlo do brže resorpcije leka žučna kiselina u membrani mora da gradi kompleks sa lekom koji tada postaje hidrofobniji. (Slika 5.13. A i B).



Slika 5.14. Povećanje resorpcije leka. A: Građenje kompleksa žučne kiseline i leka u membrani. B: Formiranje “rupa” u ćelijskoj membrani usled nastajanja mešovite micelle žučne kiseline i lecitina.

# 6. Zaključak



Na osnovu eksperimentalnih istraživanja vezanih za postavljene ciljeve mogu se izvesti sledeći zaključci:

- **Sinteza keto derivata deoksiholne i henodeoksiholne kiseline**

Dobijanje 3 $\alpha$ -hidroksi-12-keto-5 $\beta$ -holanske kiseline (12-monoketodeoksiholna kiselina, **5**) izvedeno je u više faza polazeći od deoksiholne kiseline. U prvoj fazi deoksiholna kiselina je prevedena u metil ester (**2**) u reakciji sa metanolom uz sumpornu kiselinu kao katalizator. Druga sintetska faza je selektivno acetilovanje 3 $\alpha$ -hidroksilne grupe metil estra deoksiholne kiseline acetanhidridom uz piridin u hloroformu. Oksidacija slobodne 12 $\alpha$ -OH grupe metil estra deoksiholne kiseline je izvršena pomoću kalijum-dihromata u sistemu hloroform / sirćetna kiselina / voda. Poslednja faza ove sinteze je bazna hidroliza metil 3 $\alpha$ -acetoksi-12-keto-5 $\beta$ -holanata (**4**), pri čemu je dobijena 3 $\alpha$ -hidroksi-12-keto-5 $\beta$ -holanska kiselina u prinosu od 82.10%.

3 $\alpha$ -Hidroksi-7-keto-5 $\beta$ -holanska kiselina (7-monoketohenodeoksiholna kiselina, **7**) je dobijena selektivnom oksidacijom 7 $\alpha$ -OH grupe henodeoksiholne kiseline pomoću broma u alkalnoj sredini u prinosu od 62.00%.

Sinteza 3,12-keto-5 $\beta$ -holanske kiseline (dehidrodeoksiholna kiselina, **8**) je izvedena oksidacijom 3 $\alpha$ -OH i 12 $\alpha$ -OH grupe metil estra deoksiholne kiseline (**2**) pomoću kalijum-dihromata u sistemu hloroform / sirćetna kiselina / voda. Hidroliza metil estra 3,12-diketodeoksiholne kiseline je izvedena pomoću kalijum-hidroksida u metanolu, pri čemu je dobijena dehidrodeoksiholanska kiselina (**8**) u prinosu od 62.20 %.

Polazno jedinjenje za dobijanje 3,7-diketo-5 $\beta$ -holanske kiseline (dehidrohenodeoksiholna kiselina, **10**) je bio metil henodeoksiholat (**9**). Oksidacija 3 $\alpha$ -OH i 7 $\alpha$ -OH grupe je izvedena pomoću N-bromsukcinimid u vodenom terc-butanolu. Hidroliza metil estra 3,7-diketohenodeoksiholne kiseline je izvedena pomoću kalijum-hidroksida u metanolu, pri čemu je dobijena 3,7-diketo-5 $\beta$ -holanska kiselina (**10**) u prinosu od 46.80 %.

Strukture sintetizovanih keto derivata deoksiholne i henodeoksiholne kiseline su potvrđene instrumentalnim metodama (IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR).

- **Uticaj temperature na kritičnu micelarnu koncentraciju: termodinamičke funkcije**

Termodinamičke funkcije formiranja micela (standardna *Gibs*-ova energija  $\Delta G_m$ , standardna promena entalpije  $\Delta H_m$  i standardna promena entropije  $T\Delta S_m$ ) keto derivata holne, deoksiholne i henodeoksiholne kiseline do sada nisu bile poznate u literaturi. Stoga su u ovom radu termodinamičke funkcije nastajanja micela određene tako što su praćene promene kritičnih micelarnih koncentracija (*CMC*) ispitivanih žučnih kiselina u funkciji temperature. Temperaturna zavisnost kritične micelarne koncentracije je određena metodom solubilizacije hidrofobne boje i direktnom spektrofotometrijskom metodom.

U ovom radu je primenjena metoda glavnih komponenti na vrednosti standardne entropije formiranja micela  $T\Delta S_m$  (za temperature 30 °C, 50 °C i 70 °C) i na vrednosti

sledećih molekulskih deskriptora žučnih kiselina: *Connolly*-jeva rastvaraču dostupna oblast površine (*Connolly Solvent Accessible Surface Area, CAA*); *Connolly*-jeva oblast molekulske površine (*Connolly Molecular Surface Area, CMA*); *Connolly*-jeva rastvaraču isključena zapremina (*Connolly Solvent Excluded Volumen, CSEV*); dipol-dipol energija (*DIPOL*);  $\log P$  i  $\text{Clog } P$ . U ravni vrednosti glavnih komponenti  $\mathbf{gk}_1$  i  $\mathbf{gk}_2$  su dobijene dve linearne kongenerične grupe. Jednu grupu su formirale holna kiselina i njeni keto derivati, dok su drugu grupu formirale deoksiholna i henodeoksiholna kiselina i njihovi keto derivati. Najizraženija je razlika između dobijenih grupa žučnih kiselina na 30 °C. Za svaku dobijenu grupu žučnih kiselina su određene regresione jednačine u kojima je  $T\Delta S_m$  (30 °C, 50 °C i 70 °C) zavisna varijabila dok su molekulski deskriptori nezavisne varijabile.

U grupi koju čine holna kiselina i njeni keto derivati vrednosti za  $T\Delta S_m$  (30 °C) opadaju sa supstitucijom OH grupe keto grupom (holna kiselina: +4.68 kJmol<sup>-1</sup>; 7-monoketoholna kiselina: +4.15 kJmol<sup>-1</sup>; 12-monoketoholna kiselina: +4.57 kJmol<sup>-1</sup>; 3,7-diketoholna kiselina: +3.80 kJmol<sup>-1</sup>; 7,12-diketoholna kiselina: +4.12 kJmol<sup>-1</sup>; 3,7,12-triketoholna kiselina: +3.67 kJmol<sup>-1</sup>). U regresionu jednačinu za  $T\Delta S_m$  (30 °C) kod holne kiseline i njenih keto derivata kao nezavisne varijabile su uvedeni particioni koeficijent i *Connolly*-jeva zapremina (*CSEV*). Naime, uvođenjem *Connolly*-jeve zapremine u regresionu jednačinu  $T\Delta S_m$  (30 °C) objašnjava se opadanje entropije keto derivata holne kiseline, pošto je *CSEV* u korelaciji sa odnosom hidrofilne-hidrofobne površine žučne kiseline. U ovoj grupi u regresione jednačine za  $T\Delta S_m$  (50 °C) i  $T\Delta S_m$  (70 °C) je uvedena i dipol-dipol energija, što ukazuje i na promenu termodinamičkog karaktera formiranja micela na 50 °C i 70 °C u odnosu na formiranje micela na temperaturi od 30 °C. Uvođenje dipol-dipol energije žučnih kiselina u regresione jednačine se može objasniti "fjord" efektom ili formiranjem sekundarnih micela.

Kod druge grupe ispitivanih žučnih kiselina (deoksiholna i henodeoksiholna kiselina i njihovi keto derivati) dipol-dipol energija kao nezavisna promenljiva je uvedena već i u regresionu jednačinu koja opisuje promenu entropije na temperaturi od 30 °C  $T\Delta S_m$  (30 °C) što upućuje na veći značaj "fjord" efekta i građenja sekundarnih micela, nego kod grupe holne kiseline i njenih keto derivata.

- **Ispitivanje samoasocijacije 7-monoketoholne i holne kiseline <sup>1</sup>H NMR relaksacionom metodom**

Metodom spin-rešetka relaksacije u D<sub>2</sub>O proučavana je samoasocijacija holne i 7-monoketoholne kiseline. Funkcije relaksacionog vremena  $T_1$  od koncentracije žučne kiseline su različite za holnu odnosno 7-monoketoholnu kiselinu. Kod holne kiseline na krivoj  $T_1 = f(c_{\text{ŽK}})$  postoji jedna infleksiona tačka pri koncentraciji od 30 mM, dok kod 7-monoketoholne kiseline postoje dve infleksione tačke, jedna pri koncentraciji od 42 mM, dok druga pri koncentraciji od 75 mM. Ova razlika u funkcijama  $T_1 = f(c_{\text{ŽK}})$  holne i 7-monoketoholne kiseline upućuje na njihovu različitu samoasocijaciju. Kod holne kiseline se formiraju samo primarne micela, dok kod 7-monoketoholne kiseline pored primarnih micela na nižim koncentracijama, pri većim koncentracijama nastaju i sekundarne micela (primarne micela povezane međusobno vodoničnim vezama).

U ovom radu metodom spin-rešetka relaksacije ispitivan je i uticaj verapamila na agregaciju 7-monoketoholne kiseline u  $\text{CDCl}_3$ . Infleksiona tačka na funkciji  $T_1 = f(c_{\text{ZK}})$  se javlja pri koncentraciji od 2 mM 7-monoketoholne kiseline, što upućuje na promotorni efekat verapamila u samoasocijaciji ove žučne kiseline.

- **Određivanje kompleksa sa vodoničnim vezama između žučnih kiselina i lidokaina u hloroformu ( $\text{CDCl}_3$ )**

Ravnotežna konstanta  $K$  kompleksa između lidokaina i žučnih kiselina je određena praćenjem pomeranja signala amidnog protona lidokaina u  $^1\text{H}$  NMR spektru u funkciji koncentracije žučne kiseline. Pomeranje signala amidnog protona lidokaina u rastvoru hloroforma ne dolazi u prisustvu acetona i metanola, dok u prisustvu žučnih kiselina dolazi. Ovo se može objasniti time da žučne kiseline za vezivanje lidokaina koriste više od jedne funkcionalne grupe, te da se javlja efekat susednih grupa kao i entropijski efekat zbog međusobne blizine vezivnih grupa. Za ravnotežne konstante kompleksa lidokaina i žučnih kiselina su dobijene sledeće vrednosti: 7-monoketoholna kiselina  $K = 14.22 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}$ ; 12-monoketodeoksiholna kiselina  $K = 9.45 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}$ ; metilestar 3 $\alpha$ -acetoksi-7-monoketoholne kiseline  $K = 9.36 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}$ ; 3,7,12-triketoholna kiselina  $K = 8.15 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}$ ; 7-monoketohodeoksiholna kiselina  $K = 6.50 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}$ ; 3,12-diketodeoksiholna kiselina  $K = 6.33 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}$ ; 7,12-diketoholna kiselina  $K = 4.44 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}$ ; henodeoksiholna kiselina  $K = 3.77 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}$ ; 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -diacetoksi-7-monoketoholna kiselina  $K = 2.04 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}$  i metil ester 3,7,12-triketoholne kiseline  $K = 0.00 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}$ . Za nastajanje kompleksa lidokaina i žučne kiseline žučna kiselina u svojoj strukturi mora imati dve OH grupe ili jednu keto i jednu OH grupu na odgovarajućem međusobnom rastojanju. Ravnotežna konstanta kompleksa lidokaina i žučne kiseline opada ukoliko se smanjuje broj mogućih 1:1 kompleksa lidokaina i žučne kiseline koja se može formirati kod svake ispitivane žučne kiseline.

Acetanilid za razliku od lidokaina sa ispitivanim žučnim kiselinama ne gradi kompleks, što znači da u vezivanju lidokaina za žučne kiseline učestvuje i tercijalna amino grupa ispitivanog leka, to jest da u kompleksu žučne kiseline i lidokaina postoje dve vodonične veze (u jednoj učestvuje amidni proton lidokaina a u drugoj tercijalni amin lidokaina), što potvrđuje i nemogućnost nastajanja kompleksa između metil estera 3,7,12-triketoholne kiseline i lidokaina. Naime, kod ove žučne kiseline jedino može da nastaje vodonična veza između njene karbonilne grupe (keto ili estarska) i amidnog protona lidokaina.

- **Uticaj žučnih kiselina na transport ispitivanih lekova iz vodene faze i na njihovu adsorpciju na aktivnom uglju**

U ovom delu doktorske disertacije ispitan je uticaj nastalog kompleksa (sa vodoničnim vezama) lidokaina i žučnih kiselina u hloroformu na kinetiku opadanja koncentracije lidokaina u vodenoj fazi (model za predtretman sa žučnom kiselinom). Smanjenje koncentracije lidokaina sa i bez žučnih kiselina u vodenoj fazi (pH 5.5; 6.5 i 7.4) se opisuje monoeksponencijalnom funkcijom. Vrednosti konstante brzine opadanja

koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pokazuje zavisnost od strukture i koncentracije (u hloroformu) ispitivanih žučnih kiselina. Strukturna zavisnost žučnih kiselina na konstantu brzine se može izraziti pomoću konstante ravnotežne  $K$  kompleksa lidokaina i žučnih kiselina u hloroformu. Pozitivna korelacija između ravnotežne konstante kompleksa  $K$  i konstante brzine opadanja koncentracije lidokaina u vodenoj fazi  $k$  je veća ukoliko je veća i koncentracija žučne kiseline u hloroformu. Žučne kiseline na pH 5.5 i 6.5 pored toga što povećavaju vrednost konstante brzine opadanja koncentracije lidokaina u vodenoj fazi istovremeno i smanjuju njenu ravnotežnu koncentraciju, dok na pH 7.4 deluju samo na konstantu brzine opadanja koncentracije lidokaina u vodenoj fazi.

Na osnovu eksperimenta u kome je ispitivan uticaj žučnih kiselina na depo lidokaina u hloroformu može se zaključiti da žučne kiseline sa većom konstantom ravnoteže kompleksa  $K$  u većoj meri povećavaju koncentraciju lidokaina u hloroformu, odnosno sprečavaju njegov prelaz u vodeni pufer pH 7.4 koji modeluje odvođenje leka sa kapilarnom krvi. Što znači, da kompleks sa vodoničnim vezama lidokaina i žučne kiseline pored toga što ubrzava transport lidokaina iz vodene faze u hloroform, takođe sprečava obrnuti proces - transport lidokaina iz hloroforma u vodenu fazu.

Opadanje koncentracije verapamila u vodenoj fazi u prisustvu žučnih kiselina (u hloroformu) je opisano bieksponecijalnom funkcijom. Takođe, žučne kiseline pri nižim pH vrednostima imaju veći efekat na opadanje koncentracije verapamila u vodenoj fazi nego pri većim vrednostima.

Eksperiment u kojem je ispitivan uticaj Na-soli žučnih kiselina na adsorpciju verapamila i lidokaina iz vodene sredine na aktivnom uglju je bio model površinskog delovanja žučnih kiselina na graničnoj površini voda-čelijska membrana. U slučaju verapamila svaka ispitivana žučna kiselina, izuzev triketoholne kiseline, povećava njegovu saturacionu masu u odnosu na kontrolu (vodeni rastvor ispitivanih leka, bez Na-soli žučnih kiselina). Ukoliko su Na-soli žučnih kiselina prisutne u koncentraciji koja je niža od kritične micelarne koncentracije ( $0.5\text{ CMC}$ ) saturacione mase verapamila su sledeće: (kontrola, vodeni rastvor ispitivanog leka, bez Na-soli žučnih kiselina)  $0.140\text{ mgg}^{-1}$ ; (holna kiselina)  $0.182\text{ mgg}^{-1}$ ; (7-monoketohenodeoksiholna kiselina)  $0.158\text{ mgg}^{-1}$ ; (7-monoketoholna kiselina)  $0.152\text{ mgg}^{-1}$ ; (7,12-diketoholna kiselina)  $0.142\text{ mgg}^{-1}$ ; (3,7,12-triketoholna kiselina)  $0.078\text{ mgg}^{-1}$ ). Efekat žučnih kiselina na povećanje saturacione mase verapamila u odnosu na kontrolni ogled opada sa supstitucijom OH grupe sa keto grupom kod žučne kiseline. Ukoliko su Na-soli ispitivanih žučnih kiselina bile iznad kritične micelarne koncentracije tada je saturaciona masa verapamila opadala. U ogledu sa lidokainom svaka ispitivana žučna kiselina je smanjila njegovu saturacionu masu. Saturacione mase lidokaina se statistički ne razlikuju kada su žučne kiseline prisutne pri koncentraciji od  $0.5\text{ CMC}$  odnosno  $\text{CMC}$ .

Pri  $0.5\text{ CMC}$  žučnih kiselina u prisustvu  $\text{Cr}^{3+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$  jona izostaje povećanje saturacione mase verapamila već dolazi do smanjenja u odnosu na kontrolnu vrednost, što je verovatno posledica nastajanja kompleksa žučnih kiselina i ispitivanih metalnih jona, pa je time sprečeno nastajanje vodoničnih veza između žučnih kiselina i verapamila.

- **Submicelarna solubilizacija lecitina i micelarna solubilizacija holesterola sa žučnim kiselinama**

Najveći efekat na solubilizaciju lecitina i holesterola imaju deoksiholna, henodeoksiholna i holna kiselina, dok supstitucija njihovih OH grupa sa keto grupom dovodi do smanjenja moći solubilizacije. Ispitivane žučne kiseline efikasnije rastvaraju lecitin od holesterola (za rastvaranje 1 molekula holesterola potrebno je 400 molekula holne kiseline, dok za rastvaranje 1 molekula lecitina potrebno je 0.32 molekula holne kiseline). U ovom radu je data i višestruka regresiona jednačina za solubilizaciju lecitina kao zavisne varijabile, pri čemu je određena korelacija kapaciteta solubilizacije lecitina sa molekulskim deskriptorima: *Clog P*, *Connolly*-jevom zapreminom (*CSEV*) i dipol-diol energijom žučnih kiselina. Dok je kapacitet solubilizacije holesterola u korelacij sa *Clog P*, deskriptorom ovalnosti molekula žučnih kiselina i molarnom refrakcijom, što ukazuje da se kod solubilizacije holesterola grade strukturno različite mešovite micide nego pri solubilizaciji lecitina.

- **Hemolitički potencijal i osmotska rezistencija žučnih kiselina**

Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti da između vrednosti kritične micelarne koncentracije žučnih kiselina i hemolitičkog potencijala postoji pozitivna korelacija. Povezanost kritične micelarne koncentracije i hemolitičkog potencijala žučnih kiselina ukazuje na značaj hidrofobnosti molekula. Naime, molekuli sa malim vrednostima *CMC* imaju velike hidrofobne površine, te grade mešovite micide sa lecitinom iz ćelijske membrane, pri čemu narušavaju integritet membrane.

Od ispitivanih žučnih kiselina smanjena osmotska rezistencija se javlja kod deoksiholne i henodeoksiholne kiseline, dok se kod njihovih keto derivata nije uočavala smanjena osmotska rezistencija.

Smanjena osmotska rezistencija kod deoksiholne i henodeoksiholne kiseline verovatno je posledica njihovog velikog kapaciteta solubilizacije lecitina, što dovodi do narušavanja integriteta membrane.

- **Određivanje uticaja Na-soli žučnih kiselina na resorpciju lidokaina i verapamila u tankom crevu**

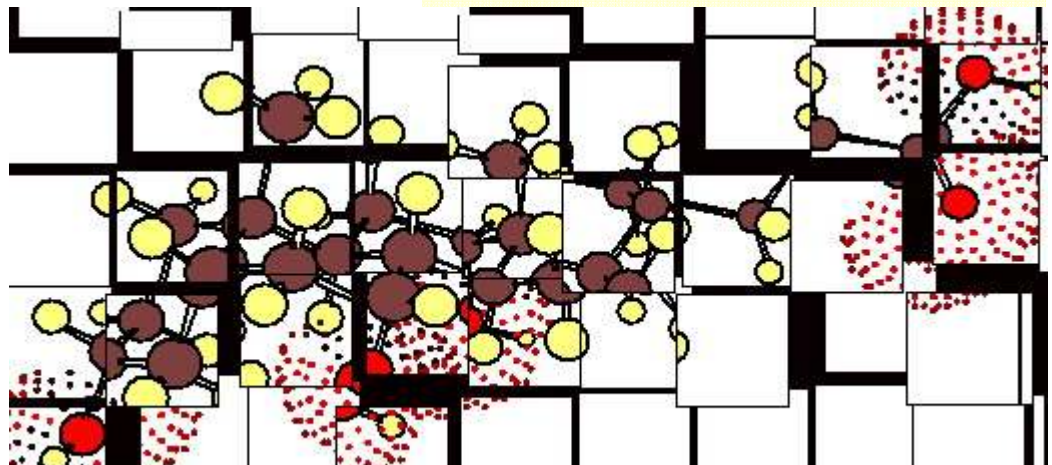
Opadanje koncentracije lidokaina u rastvoru koji okružuje membranu creva je statistički značajno povećano kod 7-monoketoholne kiseline u odnosu na kontrolu. Naime, lidokain i 7-monoketoholna kiselina grade kompleks sa vodoničnim vezama ( $K = 14.22 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ ), dok statistički značajno opadanje koncentracije verapamila se javlja ukoliko je membrana tretirana sa Na-holatom. Ovo se može takođe objasniti sa efikasnim građenjem kompleksa verapamila i holne kiseline. Dok izrazito hidrofobne žučne kiseline (deoksiholna i henodeoksiholna kiselina) ne povećavaju resorpciju ispitivanih lekova u tankom crevu.

Prema tome, građenje mešovite micide lecitina iz ćelijske membrane sa hidrofobnim žučnim kiselinama ne utiče na resorpciju ispitivanog leka, već da bi došlo do

brže resorpcije, žučna kiselina u membrani mora da gradi kompleks sa lekom, koji onda postaje više lipofilan.



# 7. Literatura



- [1] M. Mikov, J.P. Fawcett, editors, *Bile Acids*, Medishet Publisher, Geneva, 2007.
- [2] V. Vasović, S. Vukmirović, M. Poša, M. Mikov, A. Rašković, V. Jakovljević, *Eur. J. of Drug. Metabolism and Pharmacokin.* 31 (2006) 311.
- [3] A. Rašković, M. Mikov, K. Kuhajda, S. Kevrešan, M. Poša, V. Jakovljević, *Eur. J. of Drug. Metabolism and Pharmacokin.*, (in press, 2008.).
- [4] M. Poša, S. Kevrešan, M. Mikov, V. Ćirin-Novta, K. Kuhajda, *Eur. J. of Drug. Metabolism and Pharmacokin.* 32 (2007) 109 – 117.
- [5] A. Roda, A.F. Hofmann, K.J. Mysels, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 6362.
- [6] A. Roda, A. Carre, A. Fini, A. Sipahi, M. Baraldini, *J. Pharm. Sci.* 84 (1995) 593-598.
- [7] H. Kawamura, Y. Murata, T. Yamaguchi, H. Igimi, M. Tanaka, G. Sugihara, J.P. Kratochvil, *J. Phys. Chem.* 93 (1989) 3321-3326.
- [8] E. Bottari, A.A. D'Archivio, M.R. Festa, L. Galantini, E. Giglio, *Langmuir* 15 (1999) 2996-2998.
- [9] R. Coleman, *Biochem. Soc. Trans.* 15 (1987) S68-S69
- [10] W. Camile (ed.), *The Practice of Medicinal Chemistry*, Academic Press, Oxford, 2003.
- [11] M. Poša, S. Kevrešan, M. Mikov, V. Ćirin-Novta, C. Sârbu, K. Kuhajda, *Colloids and Surfaces B: 59* (2007) 179.
- [12] M.A. Schwartz, R.H. Neubert, G. Dongowski, *Pharm. Res.* 13 (1996) 1174.
- [13] G.S Gordon, A.C. Moses, R.D. Silver, J.R. Flier, M.C. Carey, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 7419.
- [14] C.L. Bowe, L. Mokhtarzadeh, P. Venkatesen, S. Babu, H. Axelrod, M.J. Sofia, R. Kakarla, T.Y. Chan, J.S. Kim, H.J. Lee, G.L. Amidon, S.Y. Choe, S. Walker, D. Kahne, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 12218.
- [15] G.A.D. Haslewood, *Biochem. J.* 40 (1946) 52.
- [16] P. Eneroth, B. Gordon, R. Ryhage, J. Sjoval, *J. Lipid Research* 7 (1966) 524.
- [17] G.A.D. Haslewood, *Biochem. J.* 38 (1944) 108.
- [18] T.S. Sihm, *J. Biochem.* 27 (1938) 425.
- [19] I. Imai, *Z. Physiol. Chem.* 248 (1937) 65.
- [20] G.A.D. Haslewood, *Biochem. J.* 56 (1954) 581.
- [21] S.S. Ali, A. Kuksis, J.M.R. Beveridge, *Can. J. Biochem.* 44 (1966) 957.
- [22] L.F. Fieser, S. Rajagopalan, *Biochem. J.* 56 (1954) 581.
- [23] H. Danielsson, P. Eneroth, K. Hellstrom, J. Sjoval, *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 3657.
- [24] P. Weyland, dissertation, Munich, 1920.
- [25] H. Wieland, S. Kishi, *Z. Physiol. Chem.* 214 (1933) 47.
- [26] G.A.D. Haslewood, *Bile Salts*, Methuen, London, 1967.
- [27] P.P. Nair i D. Kritchevsky, editori, Plenum Press, New York, 1971.
- [28] H. Danielsson, A. Kallner, J. Sjoval, *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 3846.
- [29] H. Danielsson, P. Eneroth, K. Hellstrom, S. Lindstedt, J. Sjoval, *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 2299.
- [30] K. Yamasaki, K. Kyogoku, *Z. Physiol. Chem.* 233 (1935) 29.
- [31] H. Wieland, E. Boersch, *Z. Physiol. Chem.* 106 (1919) 190.
- [32] T. Iida, F.C. Chang, *J. Org. Chem.* 47 (1982) 2972.
- [33] A. Roda, A. Minutello, M.A. Angellotti, A. Fini, *J. Lipid Res.* 31 (1990) 1433.

- [34] K. Miyajima, K. Machida, T. Taga, H. Komatsu, M. Nakagaki, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 84 (1988) 2537.
- [35] A.M. Dopico, J.V. Walsh, J.J. Singer, *J. Gen. Physiology* 119 (2002) 251.
- [36] M.J. Armstrong, M.C. Carey, *J. Lipid Research* 23 (1982) 70.
- [37] G.A. Haslewood, *Biochem.* 37 (1936) 109.
- [38] F.H. Westheimer, *Chem. Rev.* 45 (1949) 419.
- [39] J. Schreiber, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* 38 (1955).
- [40] F. Ruff, I. Csizmadia, *Szerves reakciómechanizmusok vizsgálata*, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 2002.
- [41] K. Heyns, H. Paulsen, *Angew Chem.* 69 (1957) 600.
- [42] Gy. Bruckner, *Szerves kémia I-1, Nyílt szénláncú vegyületek*, Tankönyvkiadó, Budapest, 1990.
- [43] H. Danielsson, P. Eneroth, K. Hellstrom, J. Sjoval, *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 3657.
- [44] K.Y. Tsreng, *J. Lipid Research* 19 (1978) 501.
- [45] M. Fetizon, M. Golfier, *C. R. Acad. Sci. Ser. C.* 267 (1968) 900.
- [46] F.J. Kakis, M. Fetizon, N. Douchkine, M. Golfer, P. Mourgeues, T. Prange, *J. Org. Chem.* 39 (1974) 523.
- [47] S. Kuwada, S. Furushiro, M. Kawashima, *Am. Rept. Takeda Research Lab.* 8 (1949).
- [48] D. Miljković, K. Kuhajda, J. Hranisavljević, *J. Chem. Research (S)* 106 (1996).
- [49] H. Wieland, E. Dane, *Physiol. Chem.* 212 (1932) 41.
- [50] A. Windaus, *Ann.* 477 (1926) 244.
- [51] L.F. Fieser, S. Rajagoplan, *J. Am. Chem. Soc.* 72 (1950) 5530.
- [52] J.Y. Chiang, *Am. J. Physiol.* 284 (2003) G349
- [53] J. T. Davies, E.K. Rideal, *Interfacial Phenomena*, Academic Press, New York, 1961
- [54] G.L. Gaines, *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*, Wiley Interscience, New York, 1966.
- [55] M.C. Carey, Physical chemical properties of bile acid and their salts. In *New Comprehensive Biochemistry*. Vol. 12. Sterols and Bile Acids H. Danielsson, J. Sjoval, editors, Elsevier, Amsterdam, 1985.
- [56] D.J. Crisp, *Surface Chemistry*, Butterworths, London, 1949.
- [57] P. Ekwall, R. Ekholm, A. Norman, *Acta Chem. Scand.* 11 (1957) 693.
- [58] D.G. Dervichian, *Progress in Chemistry of Fats and Other Lipids*, Pergamon Press, London, 1954.
- [59] D.G. Dervichian, *Techniques de Laboratoire*, Masson, Paris, 1954.
- [60] J.M. Kaufman, P.W. Westerman, M.C. Carey, *J. Lipid Res.* 41 (2000) 991.
- [61] M.R. Leonard, M.A. Bogle, M.C. Carey, J.M. Donovan, *Biochemistry* 39 (2000) 16064.
- [62] M. Li, A.A. Acero, H. Zhengqing, S.A. Rice, *Nature* 367 (1994) 151.
- [63] P. Ekwall, R. Ekholm, A. Norman, *Acta Chem. Scand.* 11 (1957) 703.
- [64] A.L. Lopez, S.G. Fernandez, E. Otero Anelle, *Koll. Zeit.* 211 (1966) 71.
- [65] J.M. Trillo, S.G. Fernandez, P.S. Pederó, *Anales Fisica Quimica B63* (1967) 29.
- [66] N.L. Gershfeld, *Advan. Chem. Ser.* 84 (1958) 115.
- [67] H.E. Ries, Jr. *Sci. Am. March* 2 (1961) 35.

- [68] P. Ekwall, R. Ekholm, Proceedings of the International Congress on Surface Activity, 2nd ed., London, 1957, p.23, Butterworths, London, 1957.
- [69] J.M. Kauffman, R. Pellicciari, M.C. Carey, J. Lipid Res.46 (2005) 571.
- [70] R.N. Redinger, Can. J. Gastroenterol. 17 (2003) 265.
- [71] J. Cui, L. Huang, A. Zaho, J.L. Lew, J. Yu, S. Sahoo, P.T. Meinke, I. Royo, F. Pelaez, S.D. Wright, J. Biol. Chem. 278 (2003) 10214.
- [72] L. Mi, S. Devarakonda, J.M. Harp, Q. Hann, R. Pellicciari, T.M. Willson, S. Khorasanizadeh, F. Rastinejad, Mol. Cell. 11 (2003) 1093.
- [73] J.H. Shulman, E.K. Rideal, Proc. Roy. Soc. B112 (1937) 29.
- [74] K.D. Dreher, J.H. Shulman, A.F. Hofmann, J. Coll. Interf. Sci. 25 (1967) 71.
- [75] P. Desnuelle, J. Molines, D.G. Dervichian, Bull. Soc. Chim. France 18 (1951) 197.
- [76] L. De Bernard, D.G. Dervichian, Bull. Soc. Chim. Biol. 37 (1955) 834.
- [77] L. De Bernard, Bull. Soc. Chim. Biol. 40 (1958) 161).
- [78] D.M. Small, The physical chemistry of cholanic acids, u The Bile Acids, Vol. 1, P.P. Nair i D. Kritchevsky, editori, Plenum Press, New York, 1971.
- [79] D.J. Crisp, Surface Chemistry, Butterworths, London, 1949.
- [80] D.G. Oakenfull, L.R. Fisher, J. Pys. Chem. 81 (1977) 1838.
- [81] D.G. Oakenfull, L.R. Fisher, J. Pys. Chem. 82 (1978) 2443.
- [82] D.G. Oakenfull, L.R. Fisher, Aust. J. Chem. 32 (1979) 31.
- [83] D.M. Small, Amerm. Chem. Soc. Adv. Chem. Series. 84 (1968) 31.
- [84] D.M. Small, S.A. Penkett, D. Chapman, Biochim. Biophys. Acta 173 (1969) 178.
- [85] D.M. Small, u The Bile Acids, Chemistry, Physiology and Metabolism, Plenum Press, New York, 1973.
- [86] M.C. Carey, D.M. Small, J. Clin. Invest. 61 (1978) 998.
- [87] D.G. Oakenfull, L.R. Fisher, J. Pys. Chem. 84 (1980) 936.
- [88] D.G. Oakenfull, u Aggregation Processes in Solution, Elsevier, Amsterdam, 1983.
- [89] M. Vednere, R. Natarayan, S. Lindenbaum, J. Phys. Chem. 84 (1980) 1900.
- [90] G. Conte, R. DiBlasi, E. Giglio, A. Paretta, N.V. Pavel, J. Phys. Chem. 88 (1984) 5720.
- [91] G. Esposito, E. Giglio, N.V. Pavel, A. Zanobi, J. Phys. Chem. 91 (1987) 356.
- [92] G. Esposito, A. Zanobi, E. Giglio, N.V. Pavel, I.D. Campell, J. Phys. Chem. 91 (1987) 83.
- [93] D. Langevin, u Reverse Micelles, P.L. Luisi, B.E. Straub, editori, Plenum Press, New York, 1984.
- [94] D. Langevin, Phys. Scr. T13 (1986) 252.
- [95] M.P. Pileni. J. Phys. Chem. 97 (1993) 6961.
- [96] D. Njus, Fundamental Principles of Membrane Byophysics, Wayne State University Press, Wayne, 2000.
- [97] SH atlasz: Biologia, Springer, Budapest, 1991.
- [98] SH atlasz: Élettan, Springer, Budapest, 1994.
- [99] C.F. Fox, Biochemistry of Cell Walls and Membranes, Butterworths, London, 1975.
- [100] S.G. Schultz, Basic Principles of Membrane Transport, Cambridge University Press, Cambridge, 1980.

- [101] J.D. Robinson, A History of Membrane Transport and Bioenergetics, Oxford University Press, New York, 1997.
- [102] S.G. Schultz, Basic Principles of Membrane Transport, Cambridge University Press, London, 1980.
- [103] J. Crank, The Mathematics of Diffusion, Clarendon Press, Oxford, 1975.
- [104] R.I. Macey, u Membrane Physiology, T.E. Andreoli, editor, Plenum, New York, 1978.
- [105] L. Onsager, Physical Rev. 37 (1937) 405.
- [106] A. Höpner, u Physical Chemistry, P.W. Atkins, Oxford U. Press, Oxford, 1990.
- [107] M.C. Carey, G.S Gordon, A.C. Moses, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82 (1985) 7419.
- [108] S. McLaughlin, J. Dilger, Physiol. Rev. 60 (1980) 825.
- [109] J. Kasianowicz, R. Benz, S. McLaughlin, J. Membrane Biol. 82 (1984) 179.
- [110] S.P. Gupta, Chem. Rev. 89 (1989) 1765.
- [111] H. van de Waterbeemd, J. Drug Target. 6 (1999) 151.
- [112] G.R. Stricharts, J.M. Ritchie, u Local Anaesthetics: HandBook of Experimental Pharmacology, G.R. Stricharts, editor, Berlin, Springer-Verlag, 1985.
- [113] B. Hille, u Mechanisms of Anaesthesia, Vol. 2, I. Fink, editor, Raven Press, New York, 1980.
- [114] F.D. King (ed.), Medicinal Chemistry Principles and Practice, R.S.C., Cambridge, 2002.
- [115] C. Hansch, A. Leo, Exploring QSAR: Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology, ACS, Washington DC, 1995.
- [116] R.G. Brerton, Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2003.
- [117] J. Podani, Bevezetés a többváltozós biológiai adatfeltárás rejtelmaibe, Scientia Kiadó, Budapest, 1997.
- [118] Gy. Horvai, (ed.), Sokváltozós adatelemzés (kemometria), Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 2001.
- [119] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, Buydens, S. De Yong, P.J. Levi, J. Smeyers-Verbeke, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Elsevier, Amsterdam, 1997.
- [120] M. Karelson, Molecular Descriptors in QSAR/QSPR, Wiley & Sons, Inc., New York, 2000.
- [121] R. Todeschini, V. Consonni, Handbook of Molecular Descriptors, Weinheim, Wiley-VHC, 2000
- [122] N.R. Draper, H.S. Smith, Applied Regression, John Wiley & Sons Inc., New York, 1981.
- [123] W.I. Krzanowski, Applied Statistics 36 (1987) 22.
- [124] D. J. Livingstone u Medicinal Chemistry, Principles and Practice, F.D. King (ed.), R.S.C. Cambridge, 2002.
- [125] J.E. Jackson, A. Users Guide to Principal Components, Wiley, New York, 1991.
- [126] H. Wold, u Soft Modelling by Latent Variables, J. Gani, editor, Academic Press, London, 1975.
- [127] P.M. Miličić, M.P. Ušćumlić, Elementi više matematike, Građevinska knjiga a.d., Beograd, 2006.

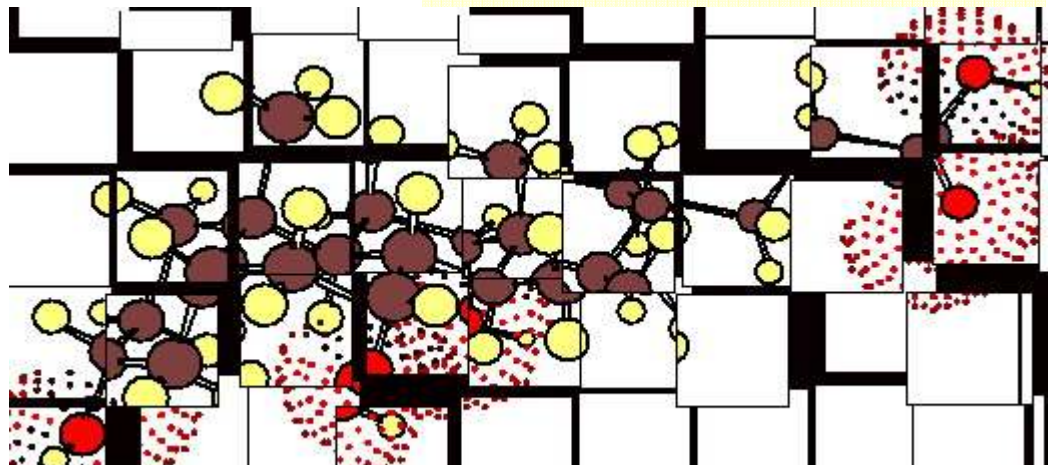
- [128] N. Bronstein, editor, *Matematički Priručnik*, Soho Graph, Beograd, 2004.
- [129] S. Wold, K. Esbensen, P. Geladi. *Principal Component Analysis*, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2 (1987) 37.
- [130] G.P. McCabe, *Technometrics* 26 (1984) 137.
- [131] H. Pop, C. Sârbu, *Anal. Chem.* 68 (1996) 771.
- [132] C. Sârbu, K. Kuhajda, S. Kevrešan, *J. Chromatogr.* 917 (2001) 361.
- [133] L. Füstös, Gy. Mszéna, N. Simonné-Mosolygó, *A sokváltozós adatelemzés statisztikai módszerei*, Akadémia Kiadó, Budapest, 1986.
- [134] D.L. Massart, L. Kaufmann, *Interpretation of Analytical Data by the Use of Cluster Analysis*, Wiley, New York, 1983.
- [135] L. Kaufmann, P.J. Rousseeuw, *Finding Groups in Data: An Introduction to Cluster Analysis*, Wiley, New York, 1990.
- [136] A. De Juan, G. Fonrodona, E. Casas, *Trends in Anal. Chem.* 16 (1997) 52.
- [137] E.W. Forgy, *Biometrics* 21 (1965) 768.
- [138] L.X. Sun, F. Xu, Y.Z. Liang, Y.L. Lie, R.Q. Ru, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 25 (1994) 51.
- [139] I. Kolozsvári, W. Wegscheider, *J. Chemometrics* 4 (1990) 255.
- [140] R. De Maesschalck, D. Jouan-Rimbaud, D.L. Massart, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 50 (2000) 1.
- [141] R.D. Browan, Y.C. Martin, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 36 (1996) 1.
- [142] V. Schoonjans, F. Questier, B. Walczak, D.L. Massart, A.P. Borosy, *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 21 (2000) 1197.
- [143] S. Paula, W. Sus, J. Tuchtenhagen, A. Blume, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 11742-11751.
- [144] A. Blume, J. Tuchtenhagen, S. Paula, *Prog. Colloid Polym. Sci.* 93 (1993) 118.
- [145] S.J. Gill, I. Wadso, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73 (1976) 2955.
- [146] S.J. Gill, S.F. Dec, G. Olofsson, I. Wadso, *J. Phys. Chem.* 89 (1985) 3758.
- [147] R. Balducci, A. Roda, R.S. Pearlman, *J. Sol. Chem.* 18 (1989) 355.
- [148] J.J. Nusselder, J.B. Engberts, *J. Colloid Interface Sci.* 143 (1992) 353.
- [149] K.S. Birdi, *Colloid Polym. Sci.* 261 (1983) 45.
- [150] S. Paredes, M. Tribout, J. Ferreira, J. Leonis, *J. Colloid Polym. Sci.* 254 (1976) 637.
- [151] P. Mukerjee, *Adv. Colloid Interface Sci.* 1 (1967) 241.
- [152] P. Mukerjee, *J. Phys. Chem.* 66 (1962) 1375.
- [153] E. Ruckenstein, R. Nagarajan, *J. Phys. Chem.* 79 (1975) 2622.
- [154] C. Tanford, *J. Phys. Chem.* 78 (1974) 2469.
- [155] M.C. Carey, D.M. Small, *J. Colloid Interface Sci.* 31 (1969) 382.
- [156] M.C. Carey, D.M. Small, *Am. J. Med.* 45 (1970) 590.
- [157] D.M. Small, *Adv. Chem. Ser.* 84 (1968) 31.
- [158] C. Tanford, *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, 2<sup>nd</sup> ed, Wiley, New York, 1980.
- [159] A. Moroi, *Micelles, Theoretical and Applied Aspects*, Plenum Press, New York, 1992.
- [160] D. Canet, G.C. Levy, I.R. Peat, *J. Magn. Reson.* 18 (1975) 199.
- [161] E.D. Becker, J.A. Ferreti, R.K. Gupta, G.H. Weiss, *J. Magn. Reson.* 37 (1980) 381.

- [162] H. Hanssum, *J. Magn. Reson.* 45 (1981) 461.
- [163] S. Gouin, X.X. Zhu, *Langmuir* 14 (1998) 4025.
- [164] B. Vulliez, J.L. Eisele, *Anal. Biochem.* 208 (1993) 241.
- [165] S. Reis, C. Guimaraes Moutinho, C. Matos, B. De Castro, P. Gameiro, J.L.F.C. Lima, *Anal. Biochem.* 334 (2004) 117.
- [166] U. Subudhi, A.K. Mishra, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 57 (2007) 102.
- [167] P. Gardiel, A. Hildebrand, *J. Therm. Anal. Cal.*, 82 (2005) 483.
- [168] P. Gardiel, A. Hildebrand, R. Neubert, A. Blume, *Langmuir* 16 (2000) 5267.
- [169] G.M. Crippen, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 27 (1987) 21.
- [170] K. Heberger, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 47 (1999) 41.
- [171] M.L. Connolly, *J. Mol. Graphics* 11 (1993).
- [172] D.F. Evans, B.W. Ninham, *J. Phys. Chem.* 87 (1983) 5025.
- [173] D.F. Evans, B.W. Ninham, *J. Phys. Chem.* 90 (1986) 226.
- [174] F.M. Menger, J.M. Jerkinica, J.C. Johnston, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1987) 4676.
- [175] F.M. Menger, *Acc. Chem. Reas.* 12 (1979) 111.
- [176] K.A. Dill, P.J. Flory, *J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 3115.
- [177] K.A. Dill, P.J. Flory, *J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 676.
- [178] B.L. Partay, P. Jedlovszky, M. Sega, *J. Phys. Chem. B.* 111 (2007) 9886.
- [179] M. Costas, B. Kronberg, R. Silveston, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 90 (1994) 1513.
- [180] E.D. Becker, *Spectrochim. Acta* 17 (1961) 436.
- [181] R. Mathur, E.D. Becker, R.B. Bradly, N.C. Li, *J. Phys. Chem.* 67 (1963) 2190.
- [182] W.R. Carper, C.M. Buess, G.R. Slipp, *J. Phys. Chem.* 74 (1970) 4229.
- [183] J. Popović, *Matematički Principi u Farmakokinetici Kompartmanskoj Analizi i Biofarmaciji*, Medicinski Fakultet, Novi Sad, 1998.
- [184] M.J. Pilling, P.W. Seakins, *Reakciókinetika*, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 1997.
- [185] N. Bronstein (ed.), *Matematički Priručnik*, Soho Graph, Beograd, 2004.
- [186] K. Hauffe, S. Roy Morrison, *Adsorption*, Walter de Gruyter, Berlin, 1974.
- [187] J. Farkas, O. Kaposi, *Bevezetés a fizikai kémiai mérésekbe*, Tankönyvkiadó, Budapest, 1988.
- [188] A. Nikolić, B. Jović, S. Csanady, S. Petrović, *J. of Molecular Struc.* 834-836 (2007) 249-252.
- [189] S. Görög, *Spektrofotometriás gyogyszeranalizis*, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1993.
- [190] P.W. Atkins, *Fizikai kémia*, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 2002.
- [191] V. Bertolasi, V. Ferretti, L. Pretto, G. Fantin, *Acta Crystallographica Section B: Structural Science* 61 (2005) 346.
- [192] S. Hadživuković, *Statističke metode s primenom u poljoprivrednim i biološkim istraživanjima*, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 1991.
- [193] G.T. Tucker, L.E. Mather, *Br. J. Anaesthesia* 12 (1975) 213.
- [194] J.E.F. Reynolds, *Martindale-The Extra Pharmacopoeia*, McMillan, 1996.
- [195] H. Igimi, M.C. Carey, *J. Lipid Res.* 22 (1981) 254.
- [196] R. Sewell, N. Hoffman, S. Cockbain, R. Smallwood, *Bile Formation: A Comparison of the Effects of Hydroxy and Keto Bile Acids*. In *Biological Effects*

- of Bile Acids, G. Paumgartner, A. Stiehl, W. Geork, (eds.), MTP Press Limited International Medical Publisher, Lancaster, 1979.
- [197] E.A. Stroev, V.G. Makarova, Laboratory Manual in Biochemistry, Mir Publishers, Moscow 1989.
- [198] V. Jakovljević, Eksperimentalna Farmakologija, Alfa Graf, Novi Sad, 2006.
- [199] C. Sârbu, C. Onișor, M. Poša, K. Kuhajda, S. Kevrešan, Talanta 75 (2008) 651.
- [200] N.W. Tietz, Fundamentals of Clinical Chemistry, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1987.
- [201] M. Poša, S. Kevrešan, M. Mikov, V. Ćirin-Novta, K. Kuhajda, Colloids Surf. B 64 (2008) 151.
- [202] B.R. Kowalski, M.A. Sharaf, D.L. Illman, Chemometrics, Wiley, New York, 1986.
- [203] M.S. Tute, C.A. Ramsden, Quantitative Drug Design, Pergamon Ed., Elmsford, 1990.
- [204] T. Cserhati, J. Biochem. Biophys. Methods 27 (1993) 133.
- [205] H. Megyesi, L. Biczók, J. Phys. Chem. B 111 (2007) 5635.
- [206] K. Matsuoka, M. Maeda, Y. Moroi, Colloids Surf. B 32 (2003) 87.
- [207] K. Matsuoka, Y. Moroi, Biochim. Biophys. Acta 1580 (2002) 189.
- [208] D.M. Small, S.A. Penkett, D. Chapman, Biochim. Biophys. Acta 176 (1969) 178.
- [209] R. Baskin, L.D. Frost, Colloids Surf. B 62 (2008) 238.
- [210] S. Baščarević, Farmakološko delovanje sintetskog derivata žučnih kiselina  $3\alpha,7\alpha$ -dihidroksi-12-keto- $5\beta$  holanata, doktorska disertacija, Medicinski fakultet u Prištini, Kruševac, 2000.

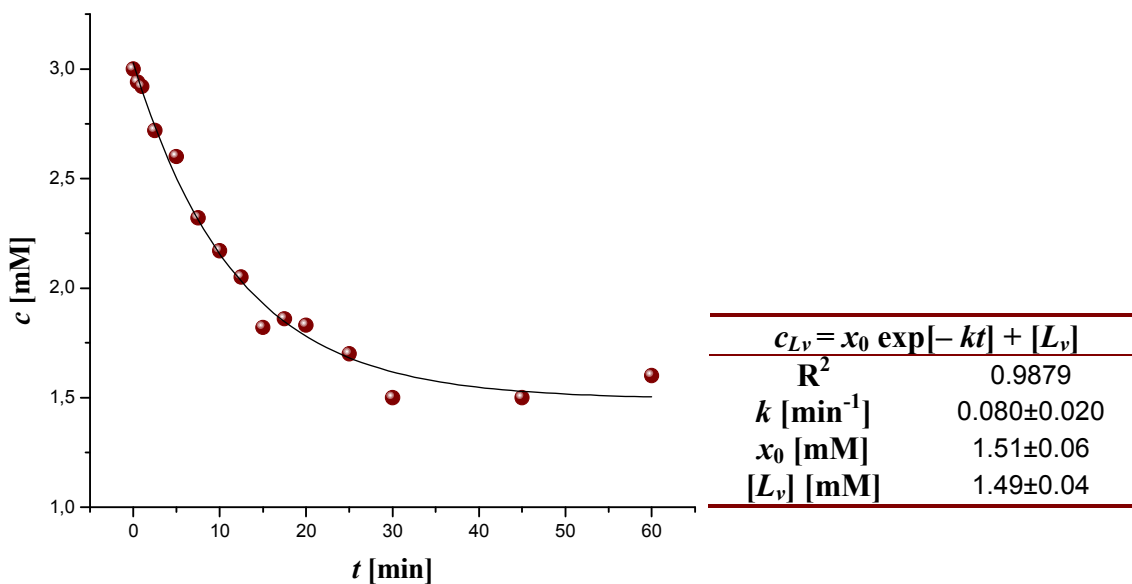


# 8. Prilog

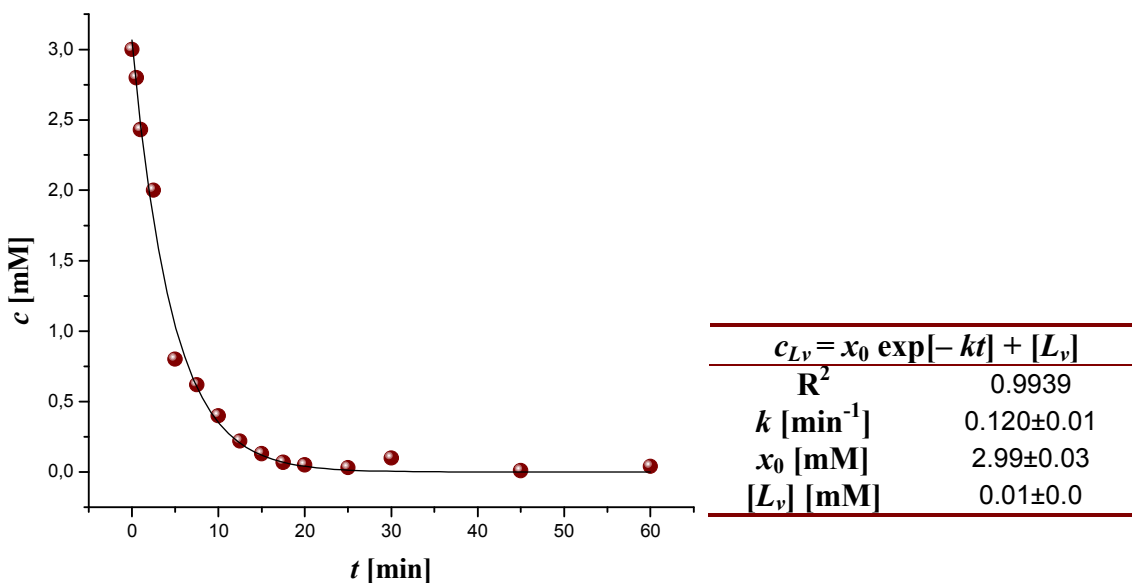


## 8.1. UTICAJ ŽUČNIH KISELINA NA TRANSPORT ISPITIVANIH LEKOVA IZ VODENE FAZE U HLOROFORM

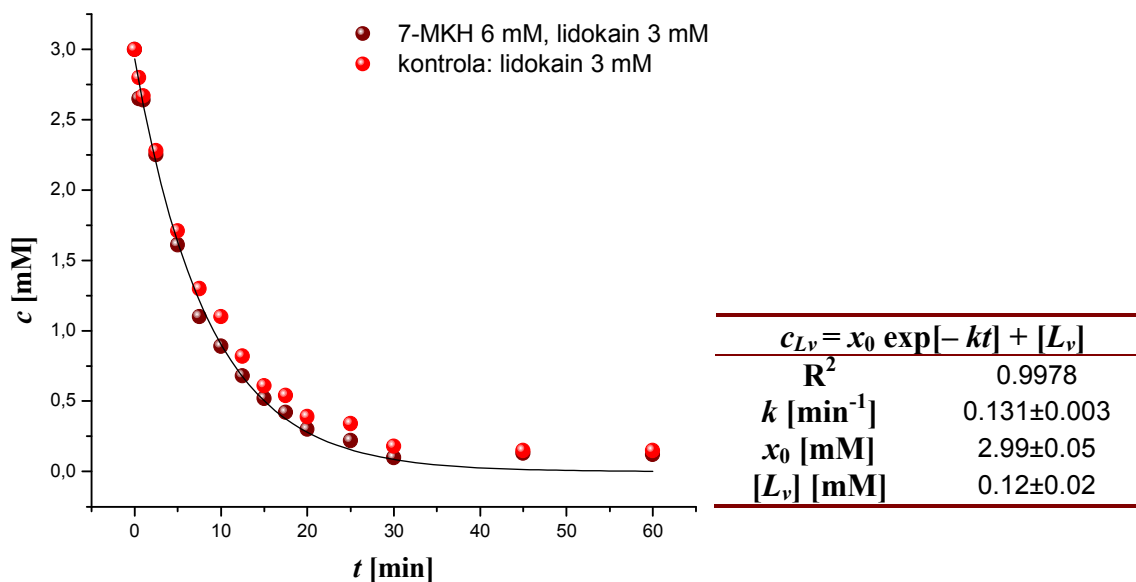
*Promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 5.5; bez žučnih kiselina u hloroformu*



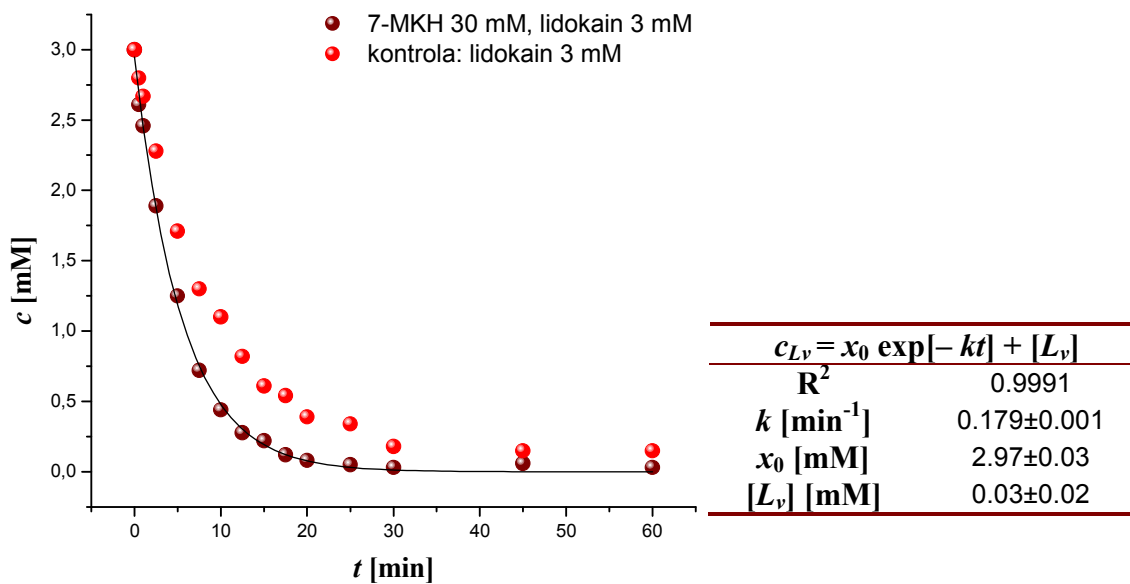
*Promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 7.4; bez žučnih kiselina u hloroformu*



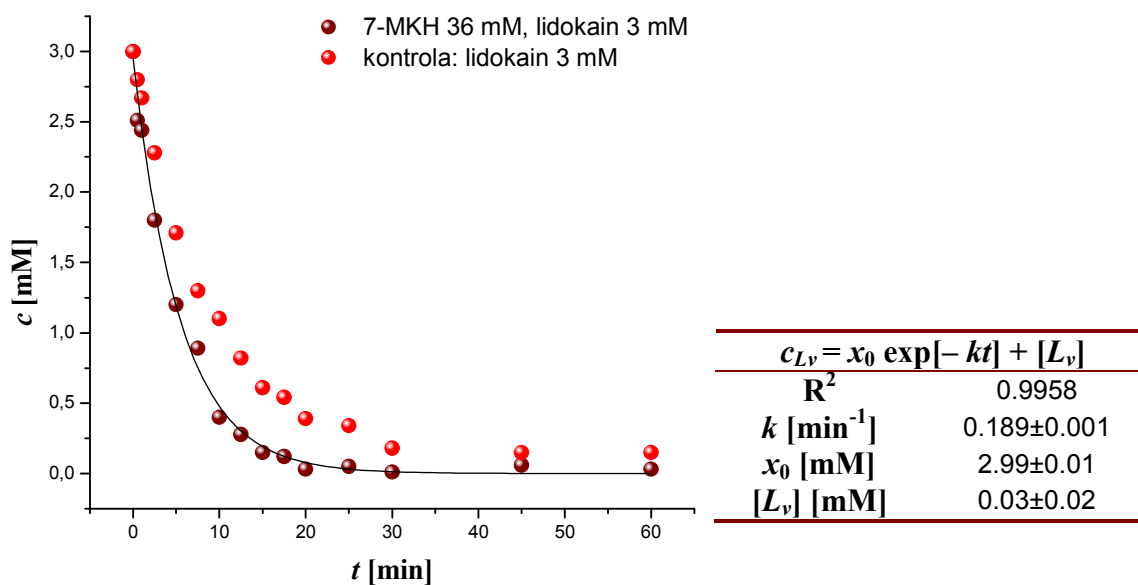
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu 7-monoketoholne kiseline u hloroformu ( $c = 6 \text{ mM}$ )**



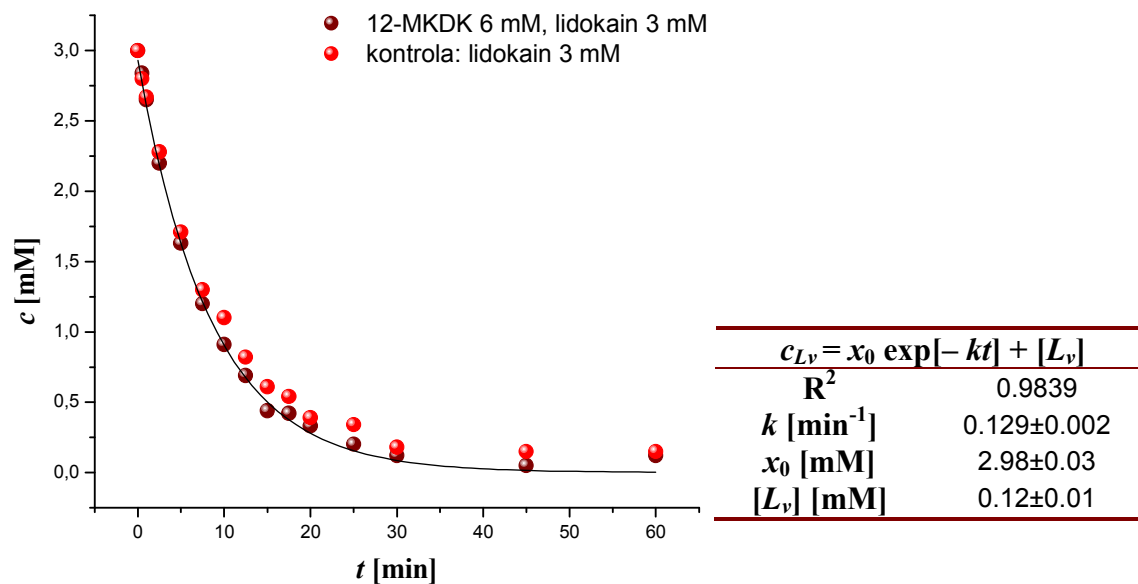
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu 7-monoketoholne kiseline u hloroformu ( $c = 30 \text{ mM}$ )**



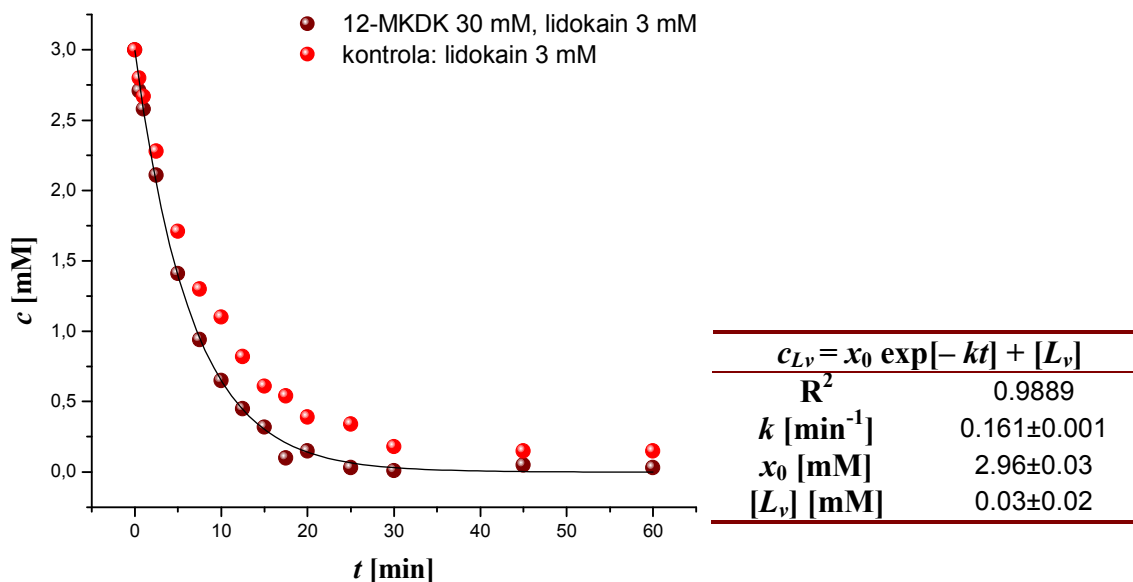
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu 7-monoketoholne kiseline u hloroformu ( $c = 36 \text{ mM}$ )**



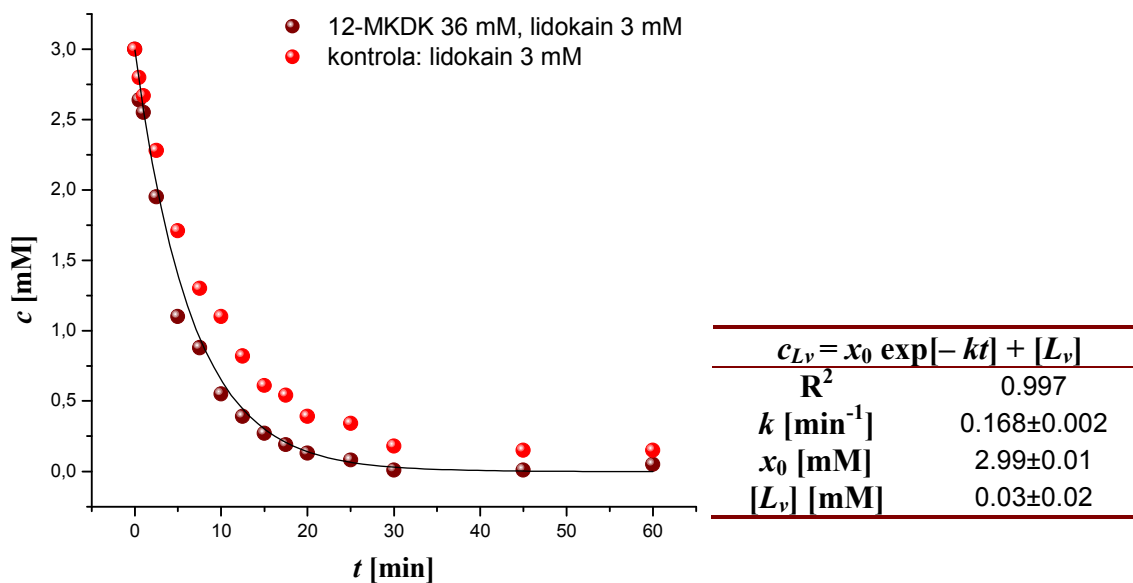
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu 12-monoketodeoksiholne kiseline u hloroformu ( $c = 6 \text{ mM}$ )**



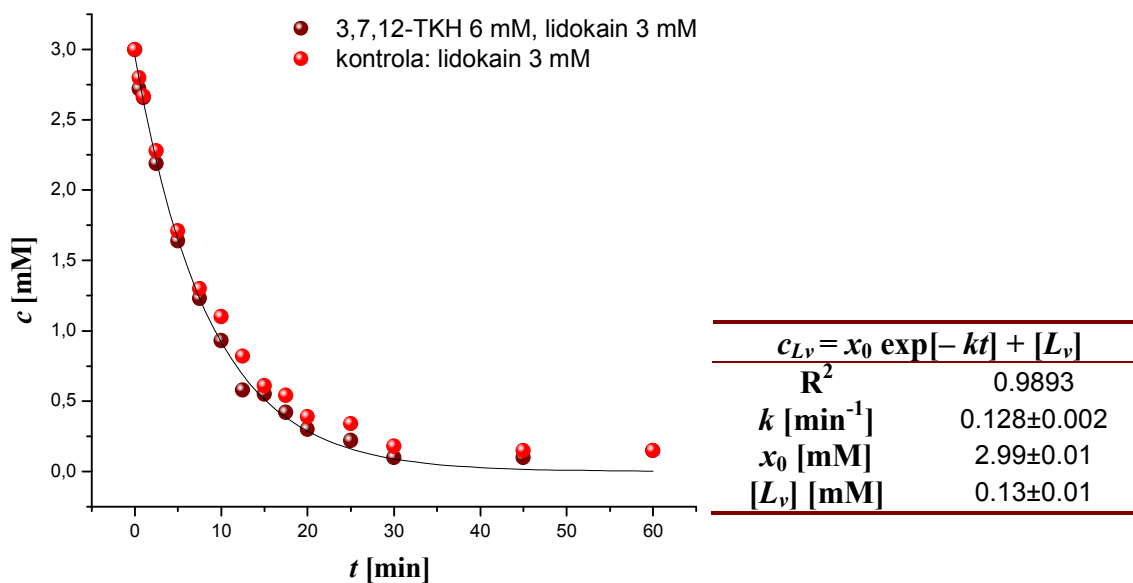
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu 12-monoketodeoksiholne kiseline u hloroformu ( $c = 30 \text{ mM}$ )**



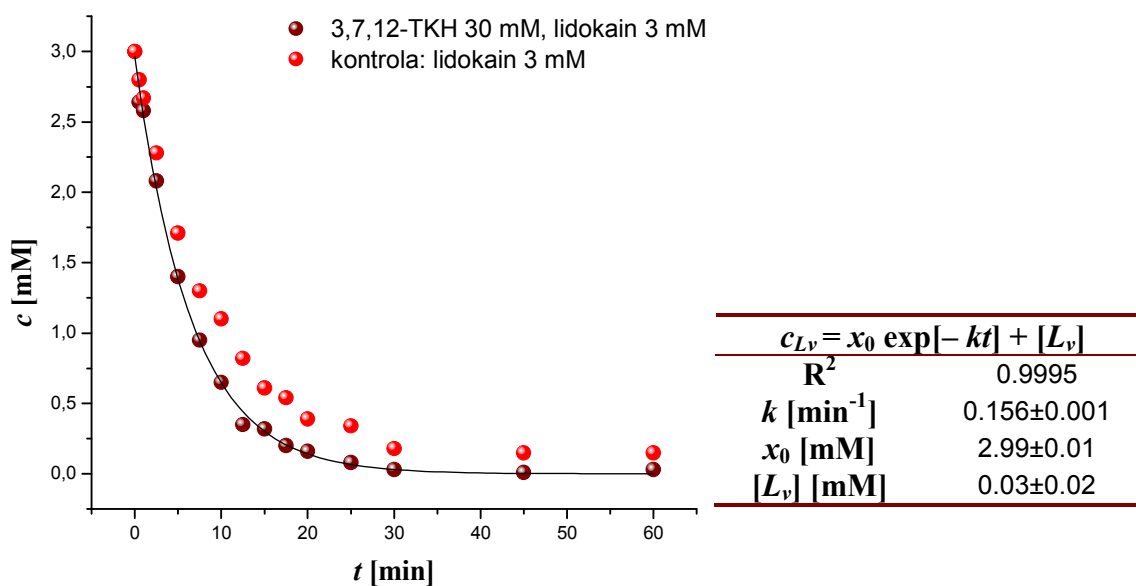
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu 12-monoketodeoksiholne kiseline u hloroformu ( $c = 36 \text{ mM}$ )**



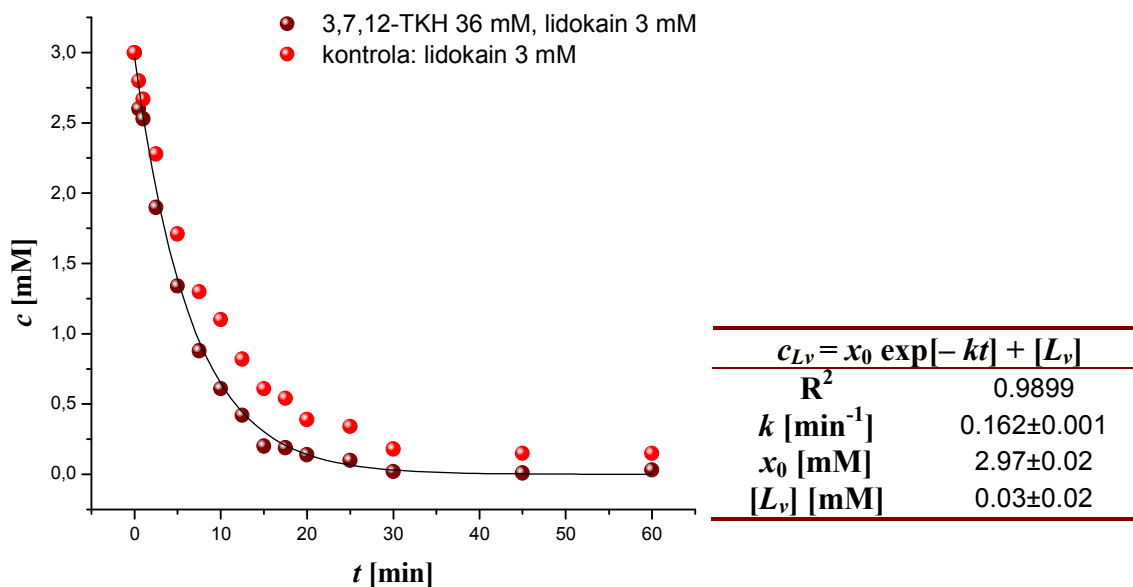
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu 3,7,12-triketoholne kiseline u hloroformu ( $c = 6 \text{ mM}$ )**



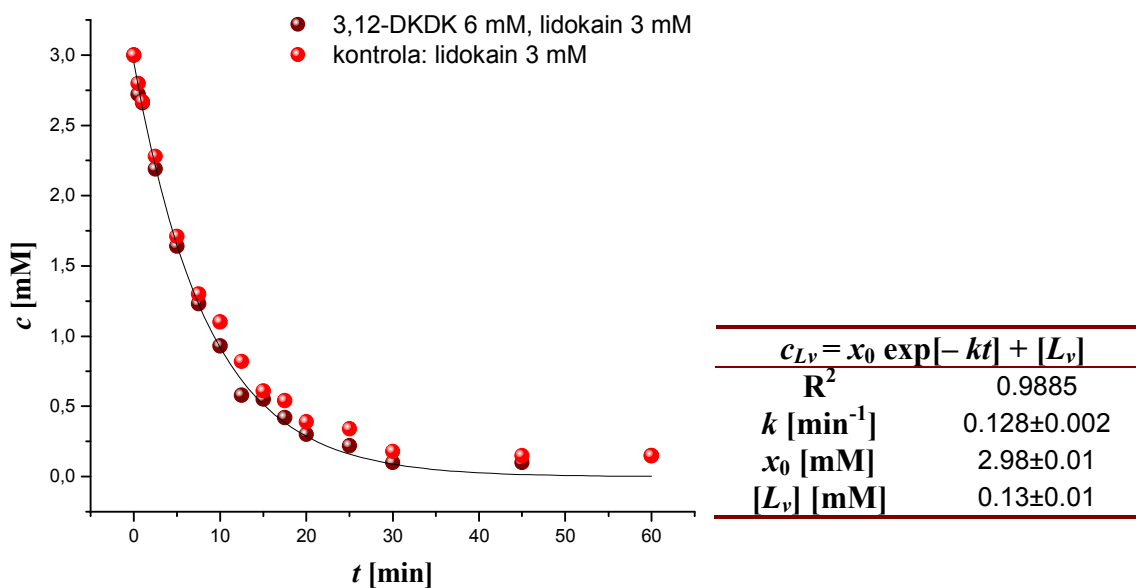
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu 3,7,12-triketoholne kiseline u hloroformu ( $c = 30 \text{ mM}$ )**



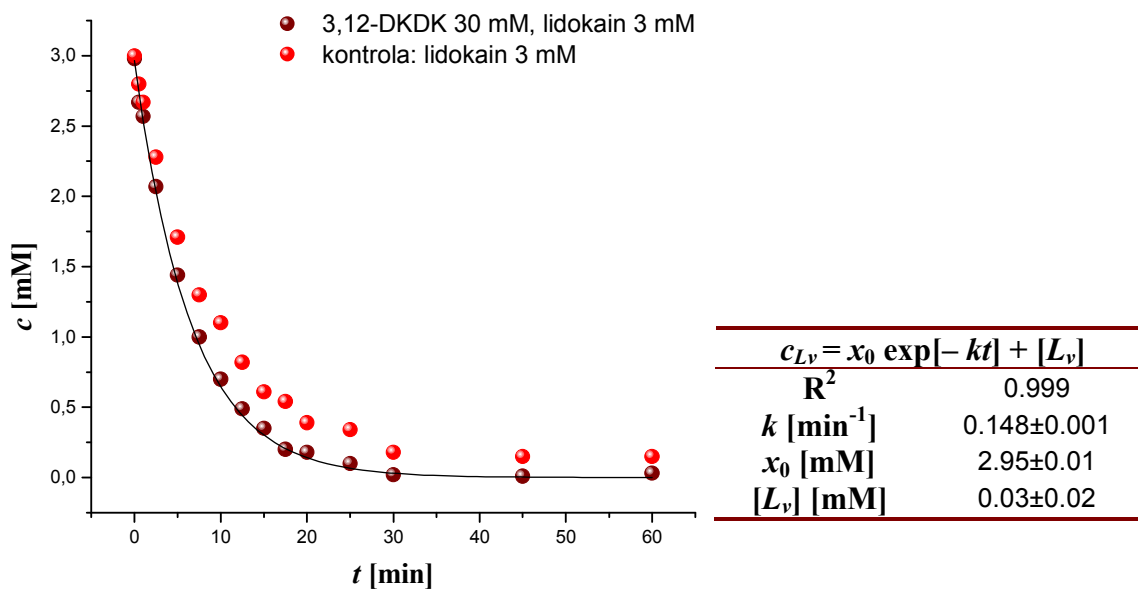
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu 3,7,12-triketoholne kiseline u hloroformu ( $c = 36 \text{ mM}$ )**



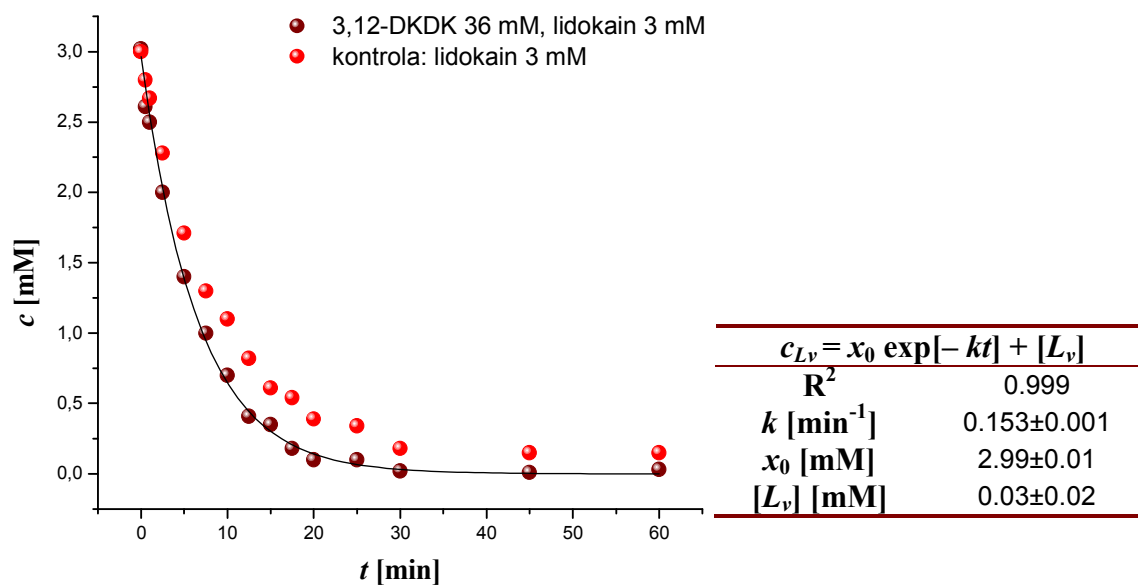
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu 3,12-diketodeoksiholne kiseline u hloroformu ( $c = 6 \text{ mM}$ )**



**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu 3,12-diketodeoksiholne kiseline u hloroformu ( $c = 30 \text{ mM}$ )**

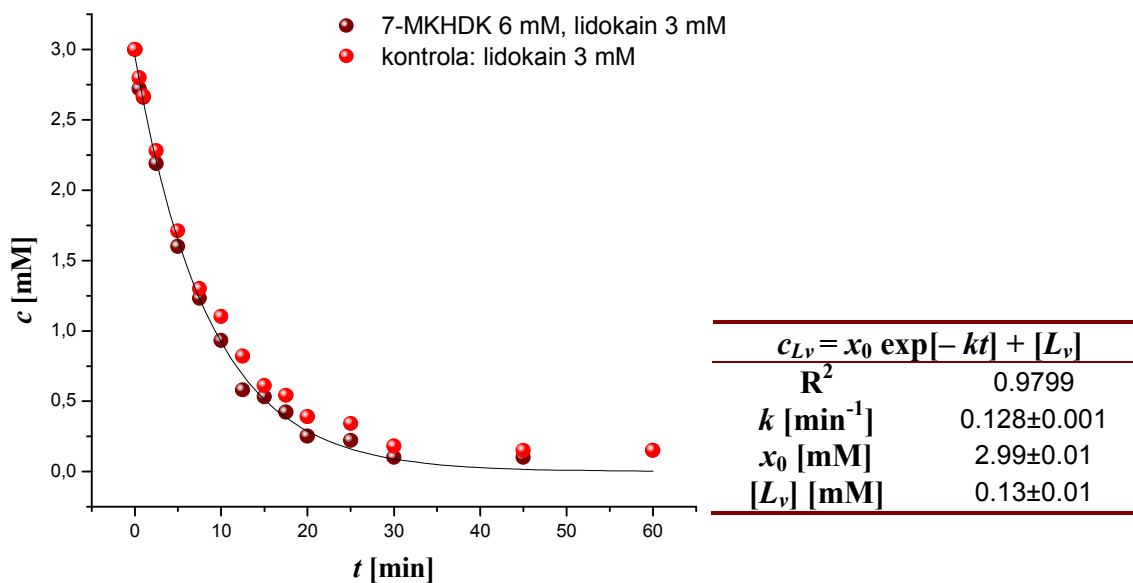


**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu 3,12-diketodeoksiholne kiseline u hloroformu ( $c = 36 \text{ mM}$ )**

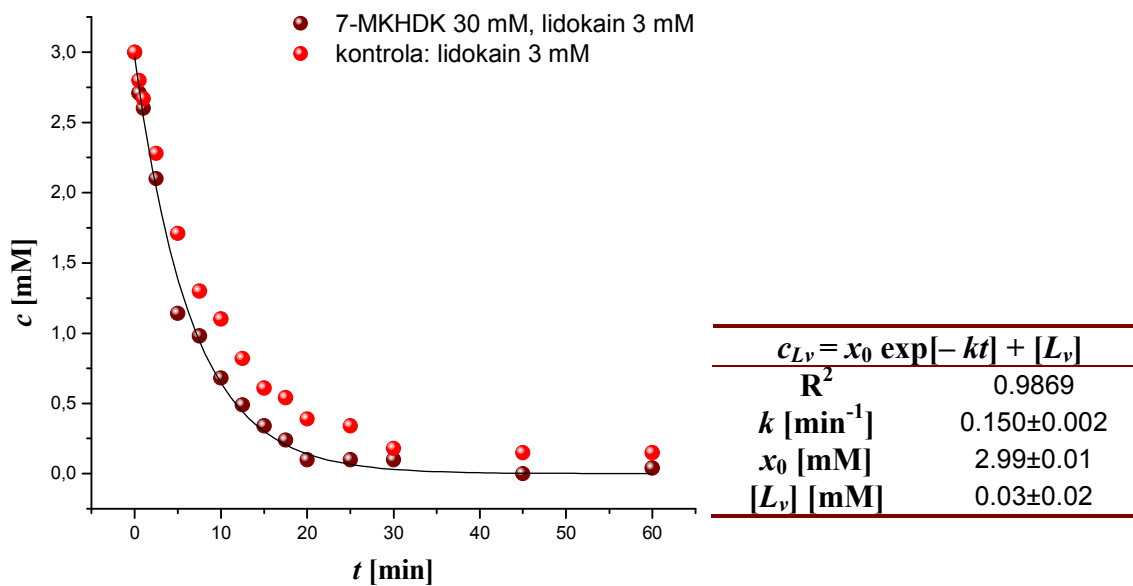




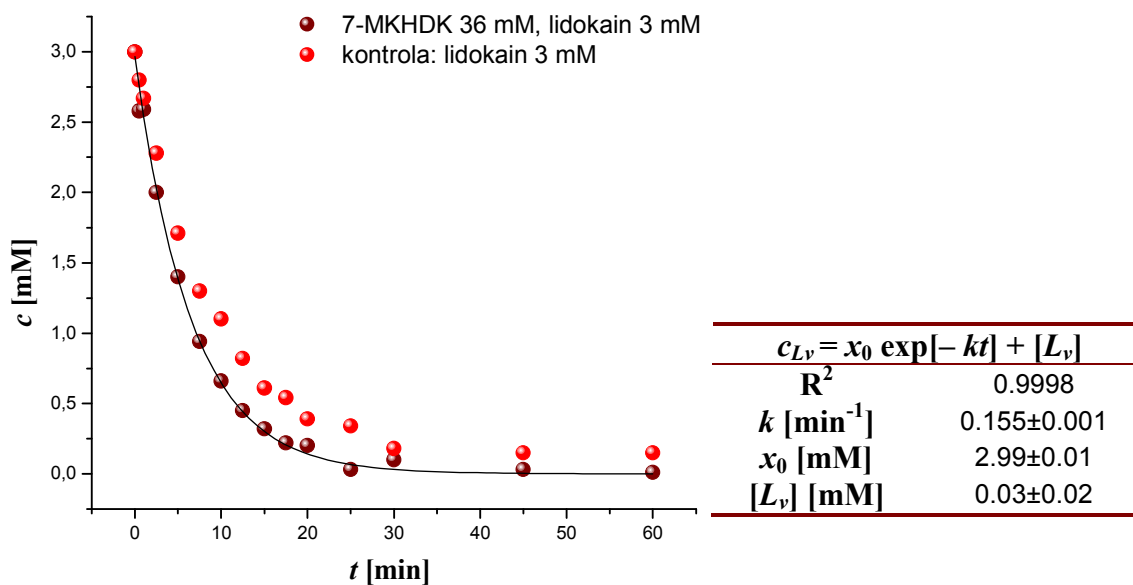
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu 7-monoketohenodeoksiholne kiseline u hloroformu ( $c = 6 \text{ mM}$ )**



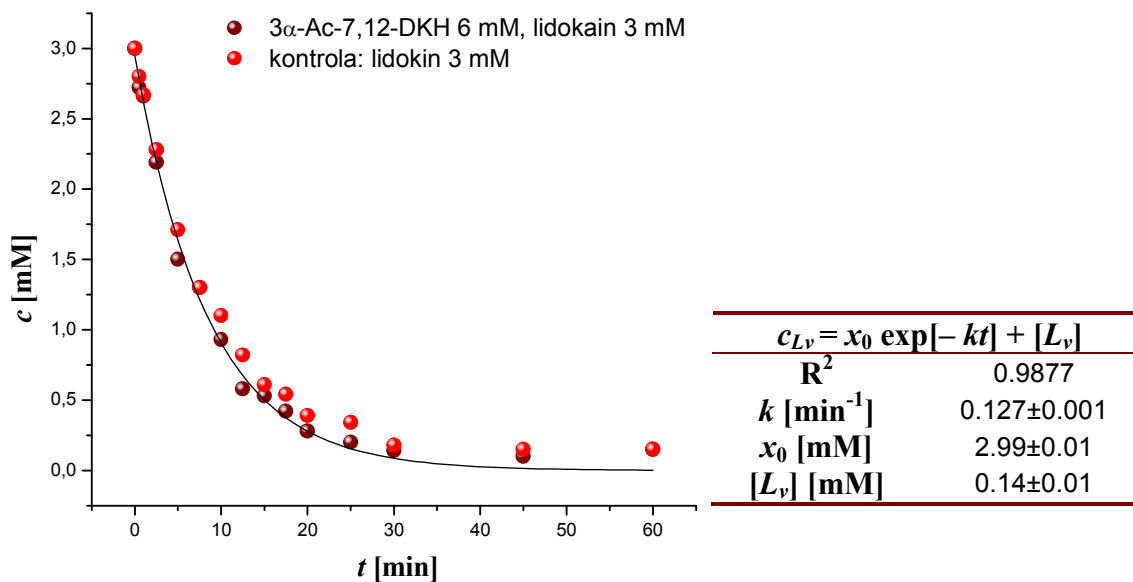
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu 7-monoketohenodeoksiholne kiseline u hloroformu ( $c = 30 \text{ mM}$ )**



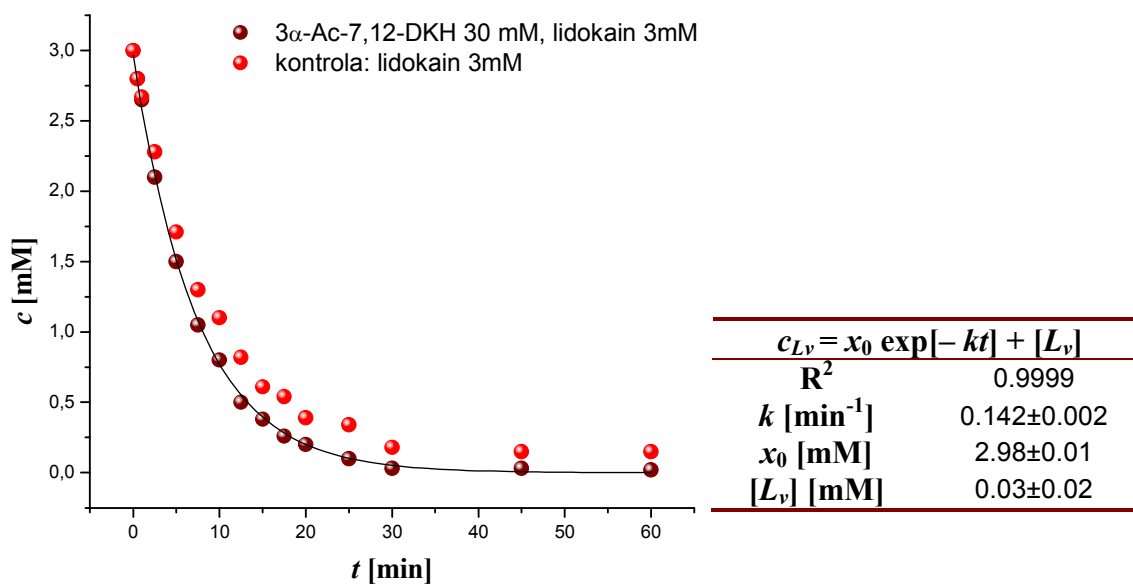
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu 7-monoketohenodeoksiholne kiseline u hloroformu ( $c = 36 \text{ mM}$ )**



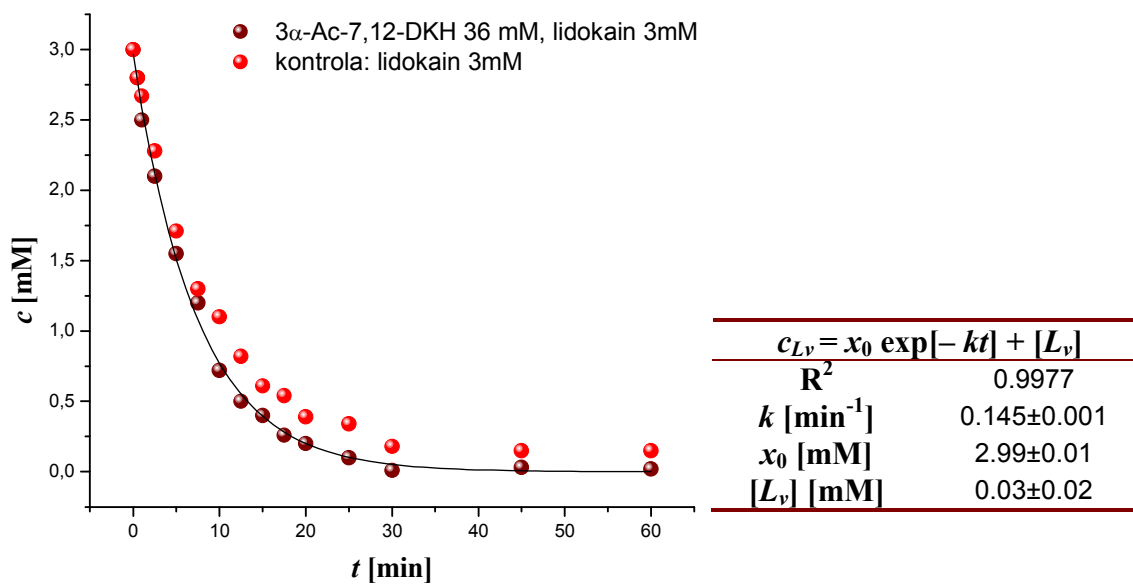
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu 3 $\alpha$ -acetyl-7,12-diketoholne kiseline u hloroformu ( $c = 6 \text{ mM}$ )**



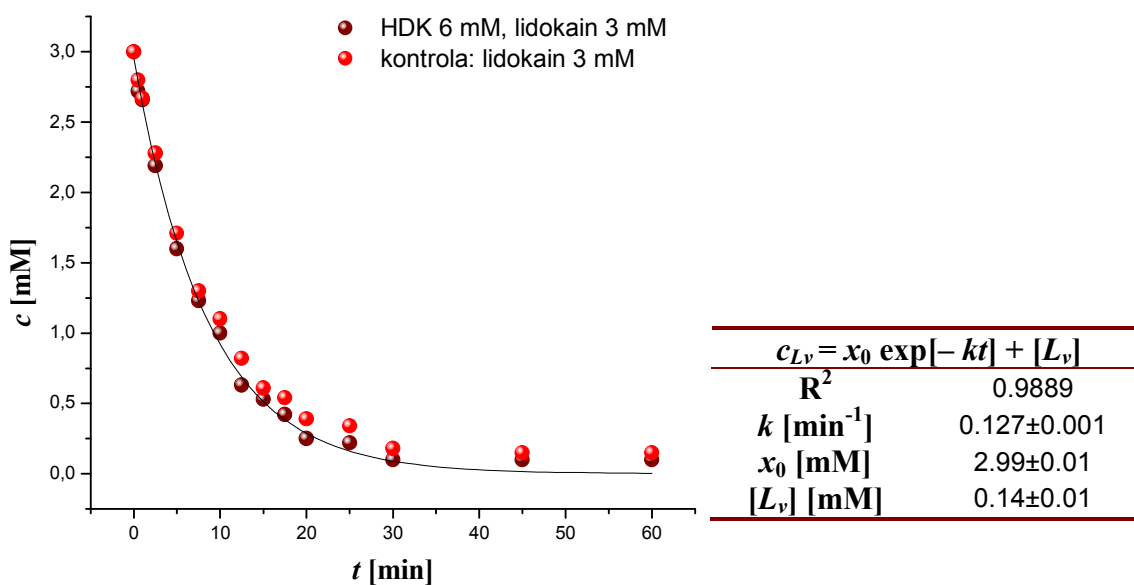
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu 3 $\alpha$ -acetyl-7,12-diketoholne kiseline u hloroformu ( $c = 30$  mM)**



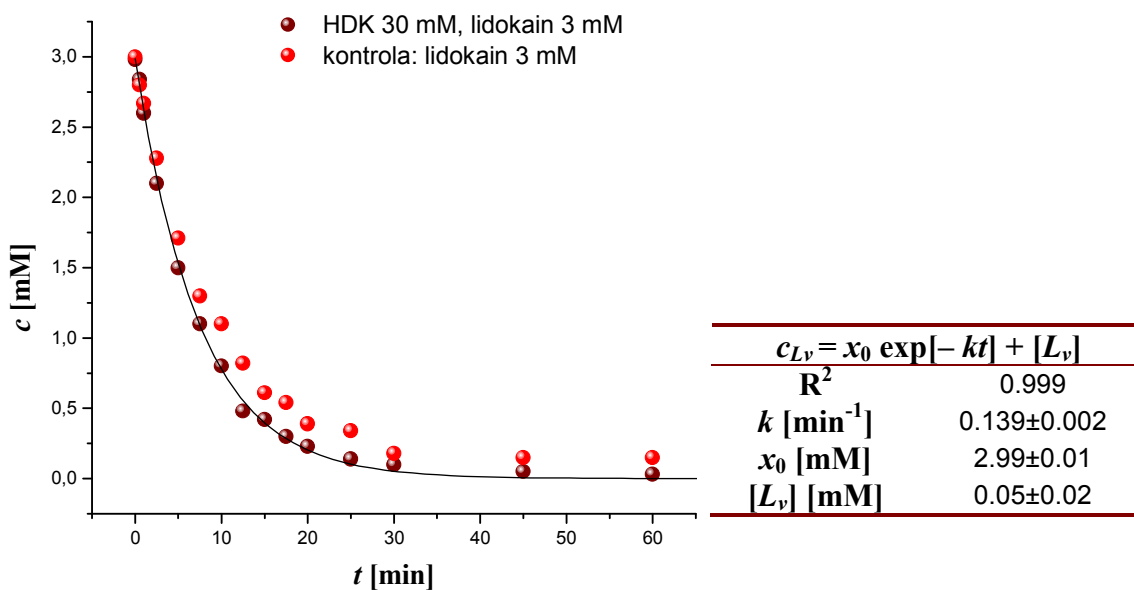
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu 3 $\alpha$ -acetyl-7,12-diketoholne kiseline u hloroformu ( $c = 36$  mM)**



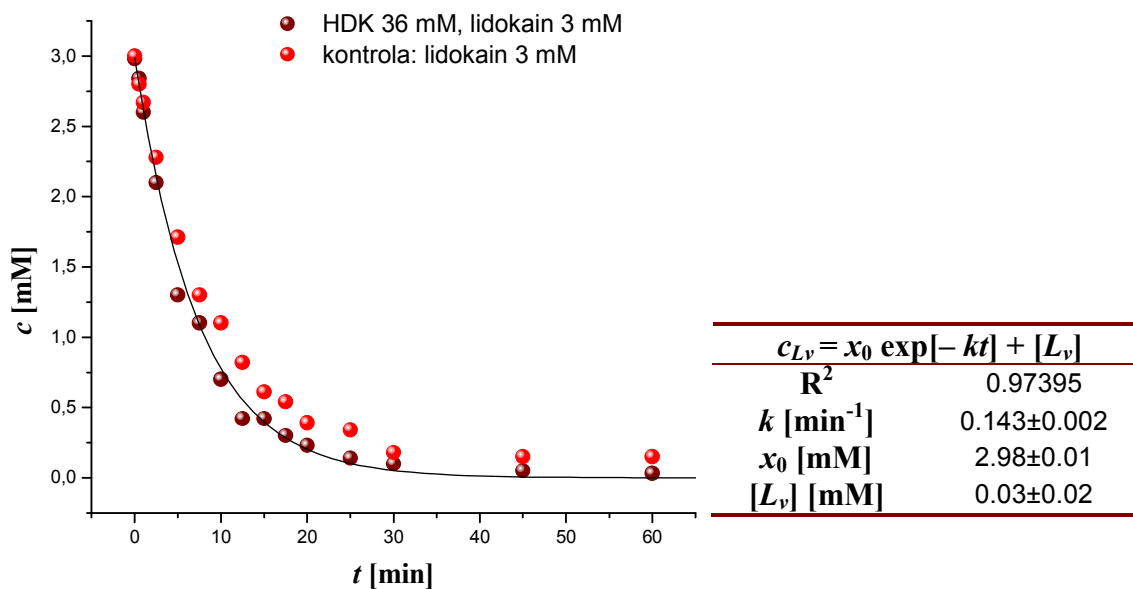
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu henodeoksiholne kiseline u hloroformu ( $c = 6 \text{ mM}$ )**



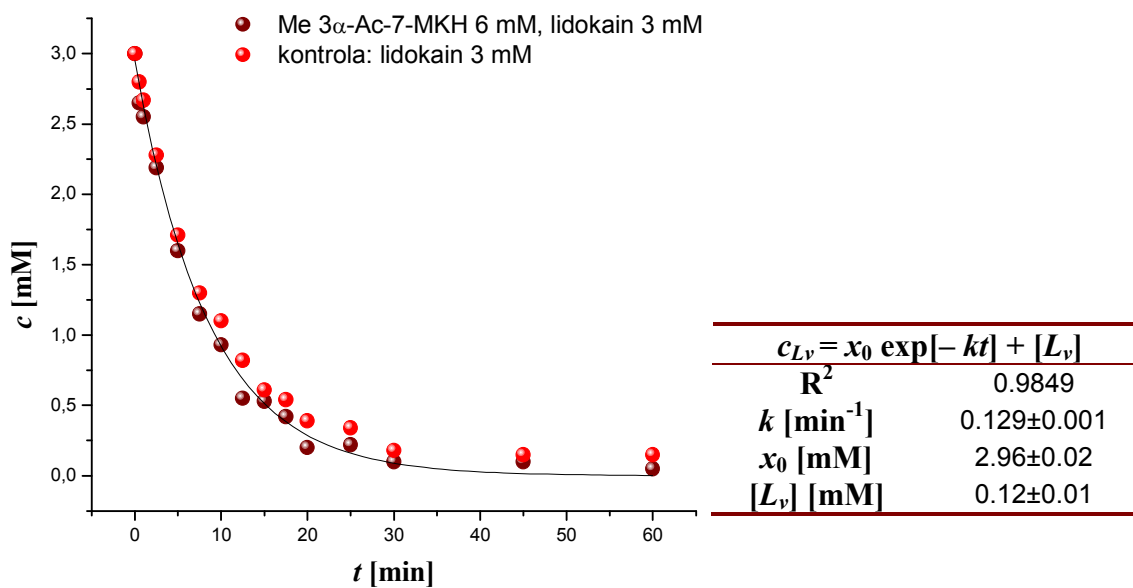
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu henodeoksiholne kiseline u hloroformu ( $c = 30 \text{ mM}$ )**



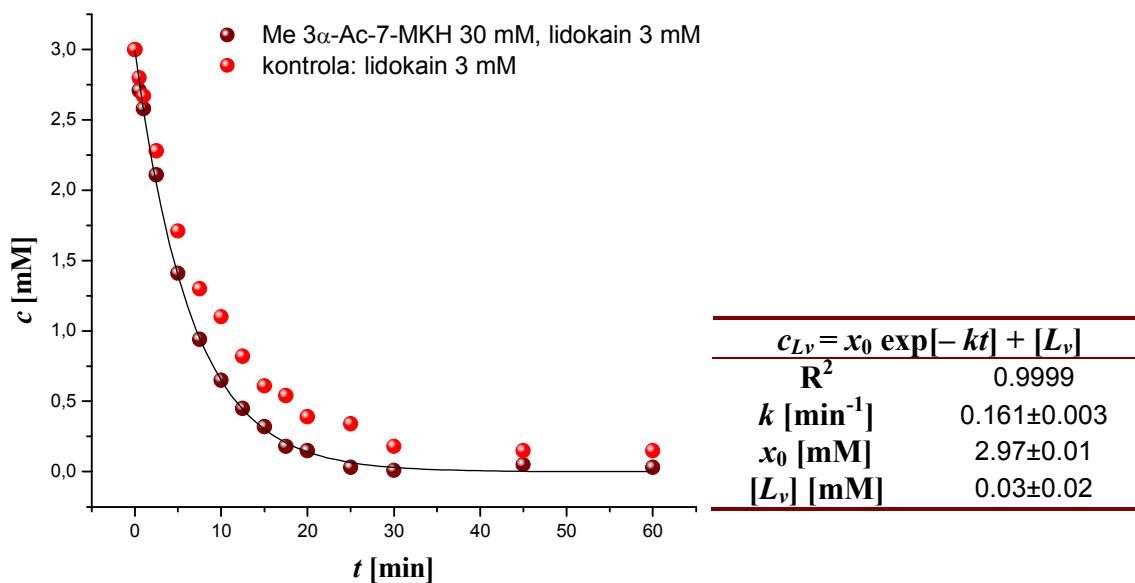
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu henodeoksiholne kiseline u hloroformu ( $c = 36 \text{ mM}$ )**



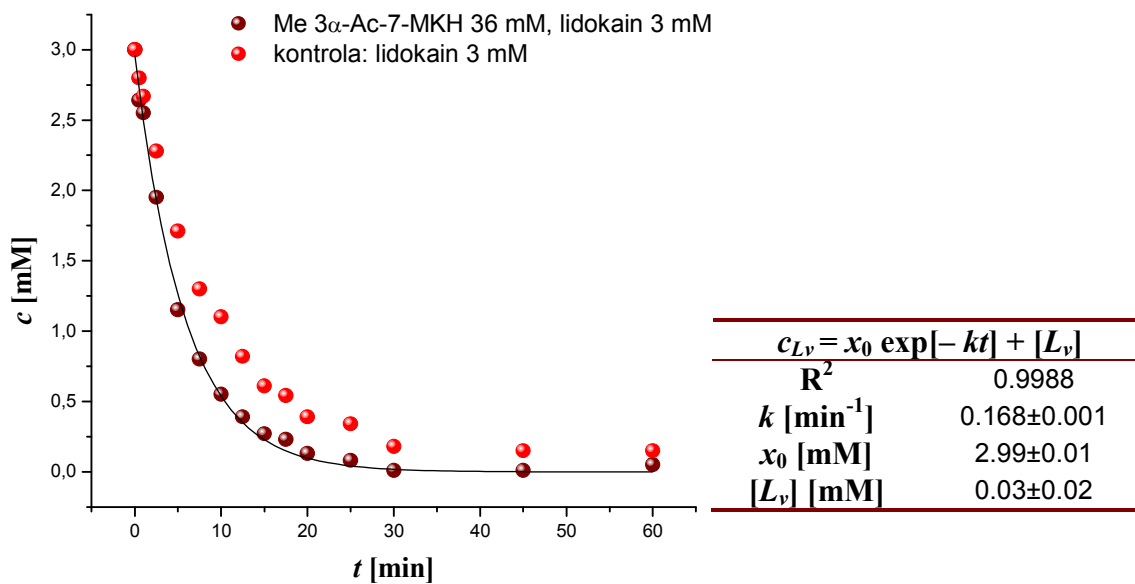
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu metilestra 3 $\alpha$ -acetyl-7-monoketoholne kiseline u hloroformu ( $c = 6 \text{ mM}$ )**



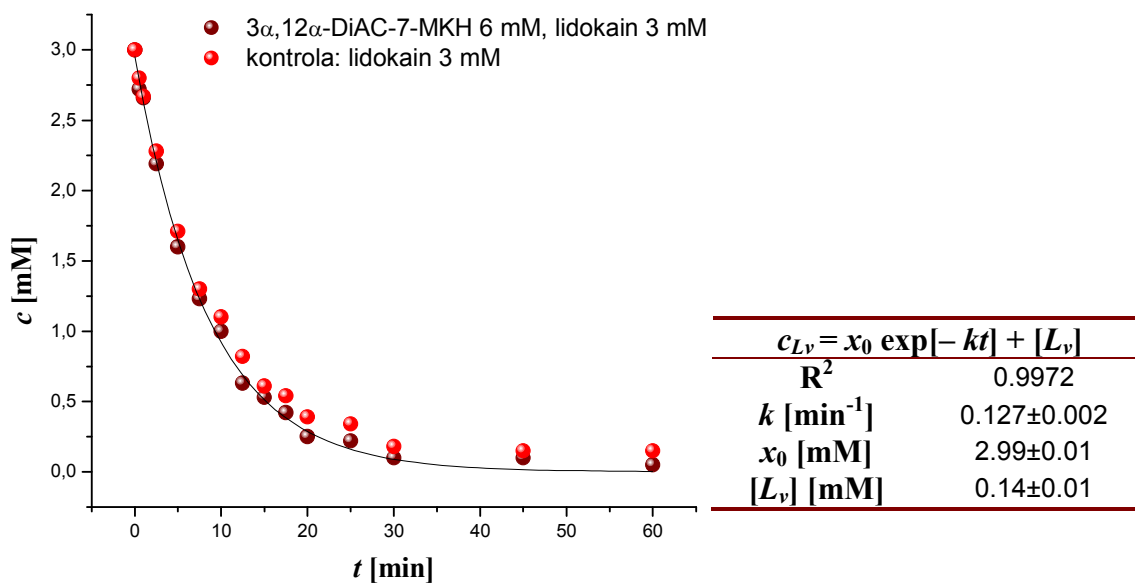
***Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu metilestra 3 $\alpha$ -acetyl-7-monoketoholne kiseline u hloroformu ( $c = 30$  mM)***



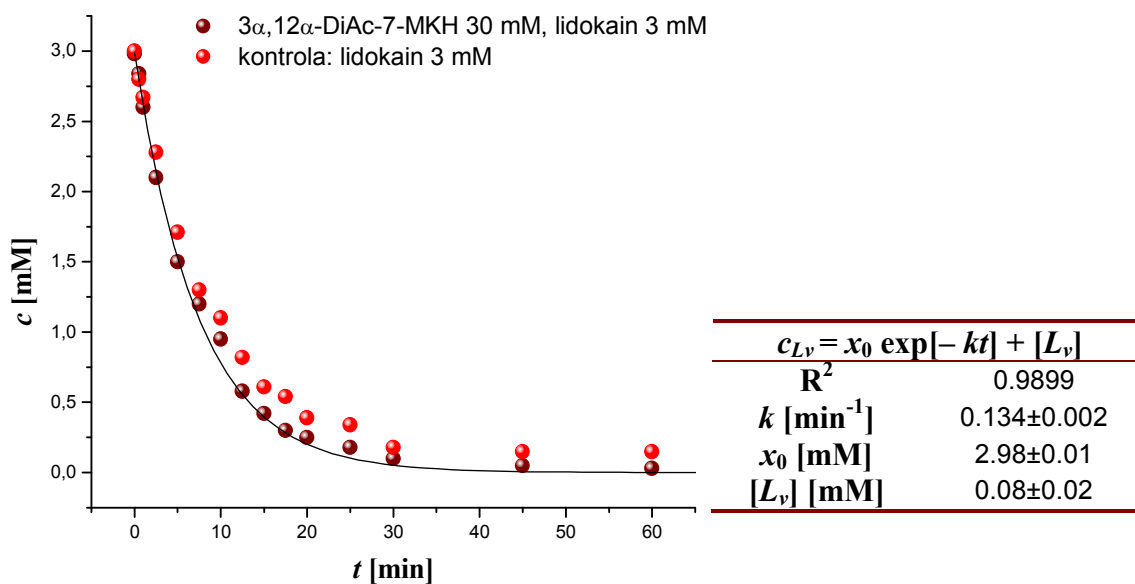
***Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu metilestra 3 $\alpha$ -acetyl-7-monoketoholne kiseline u hloroformu ( $c = 36$  mM)***



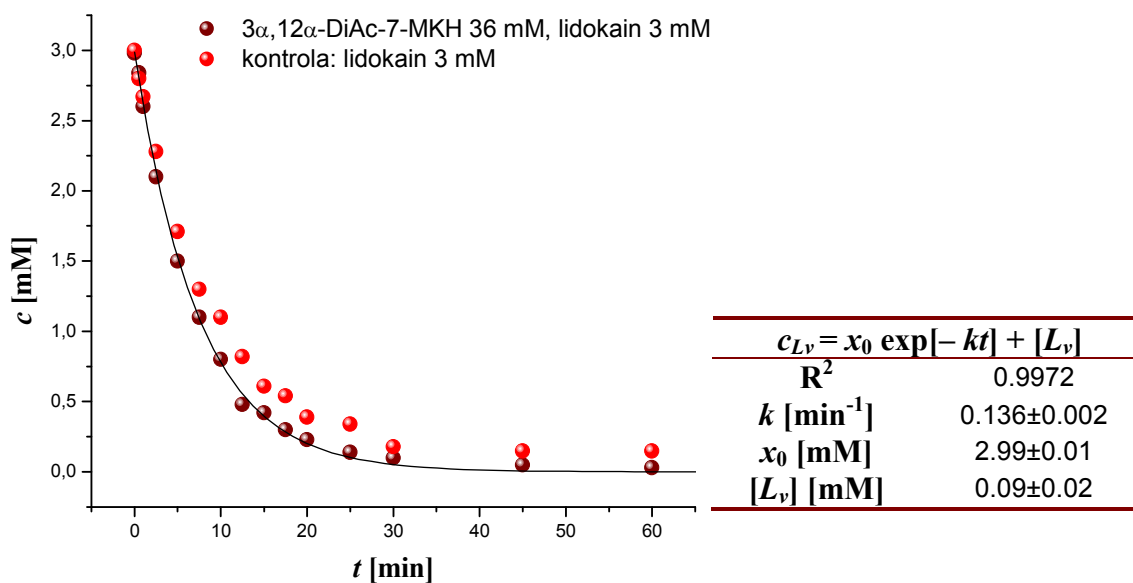
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -diacetil-7-monoketoholne kiseline u hloroformu ( $c = 6$  mM)**



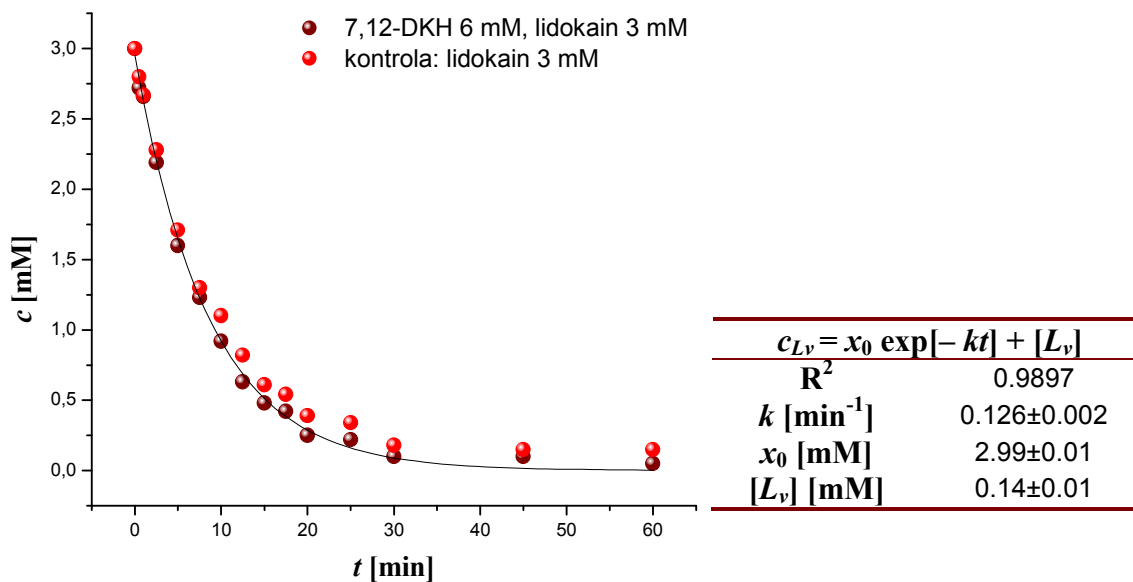
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -diacetil-7-monoketoholne kiseline u hloroformu ( $c = 30$  mM)**



**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -diacetil-7-monoketoholne kiseline u hloroformu ( $c = 36$  mM)**

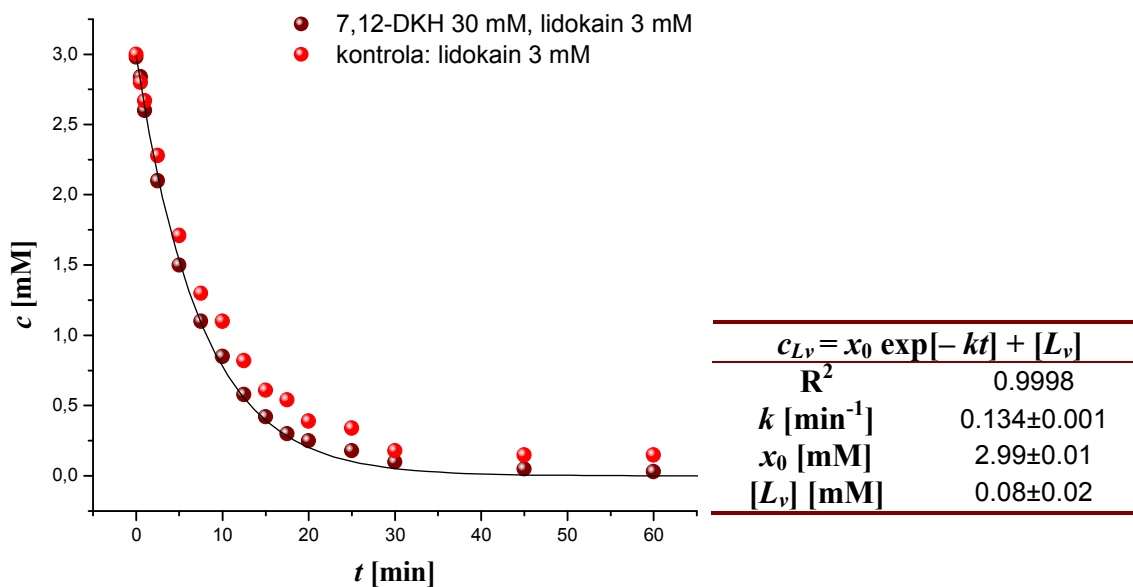


**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu 7,12-diketoholne kiseline u hloroformu ( $c = 6$  mM)**

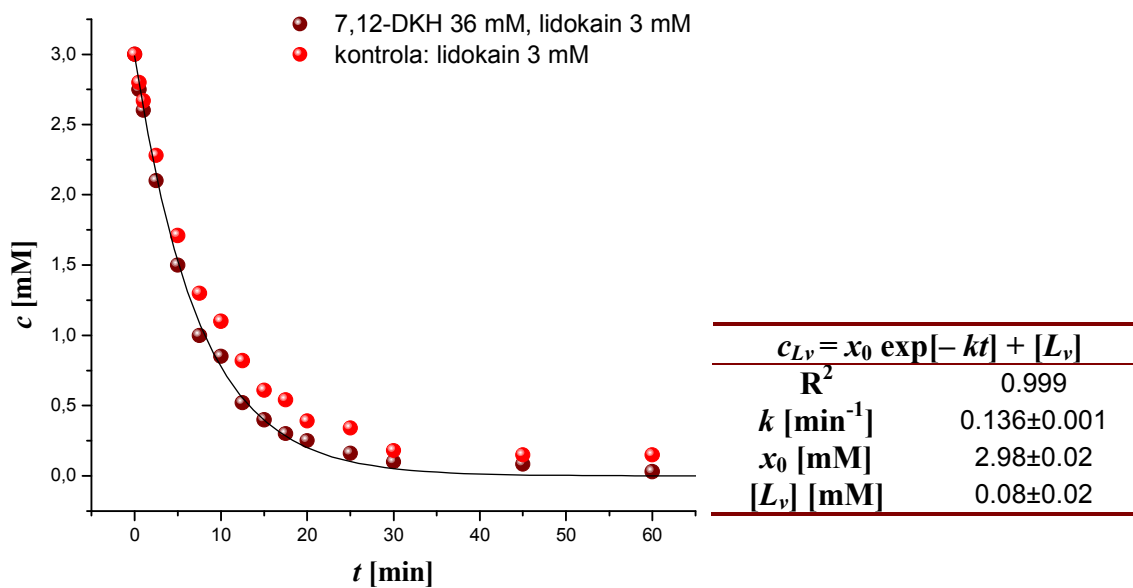




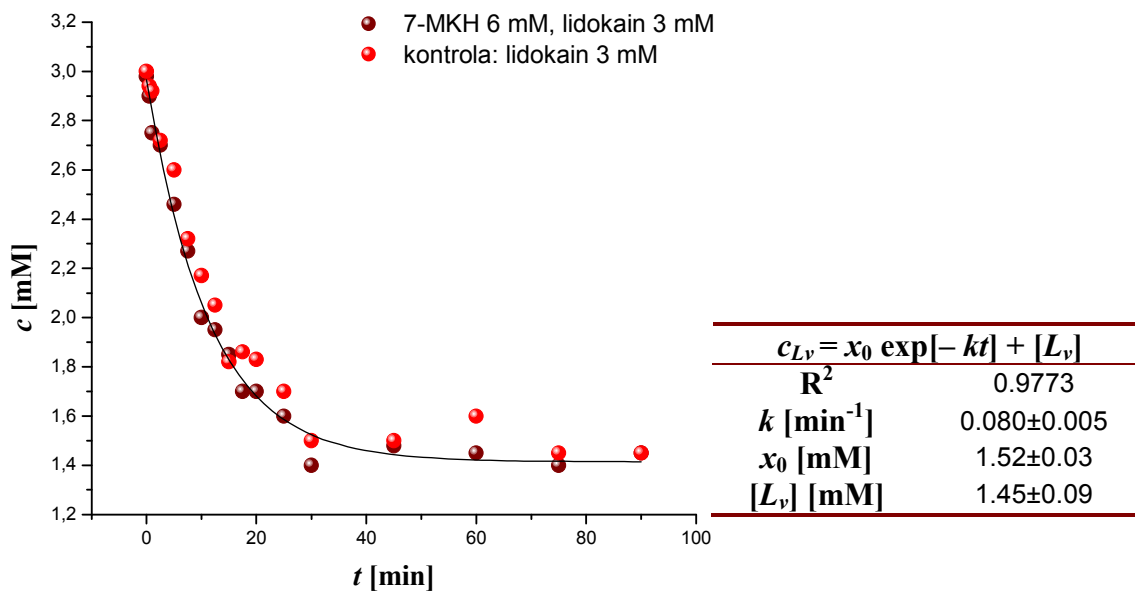
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu 7,12-diketoholne kiseline u hloroformu ( $c = 30$  mM)**



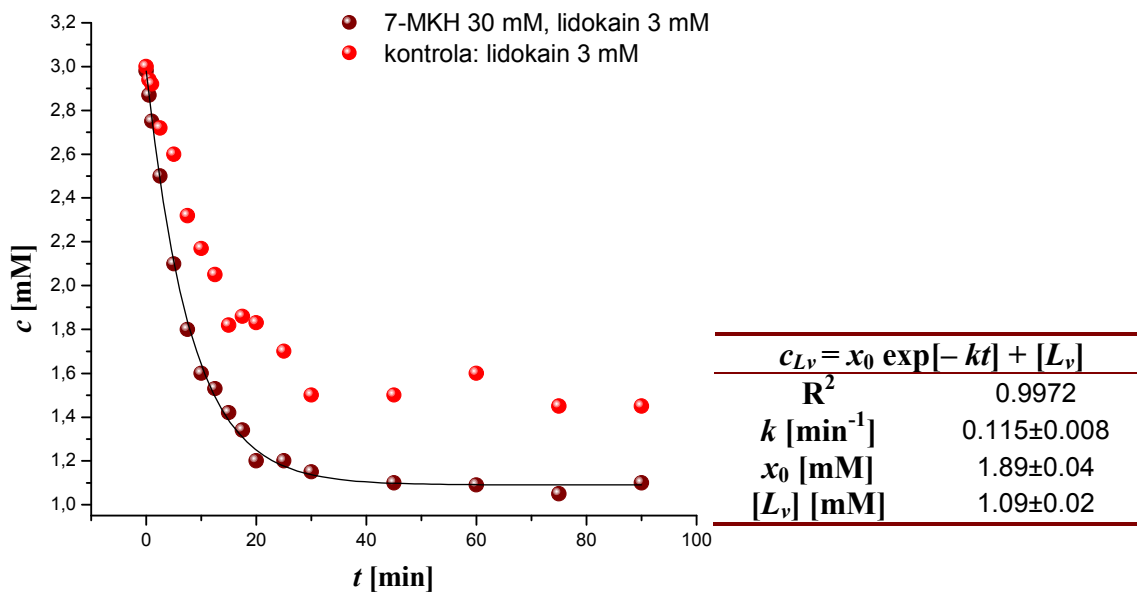
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu 7,12-diketoholne kiseline u hloroformu ( $c = 36$  mM)**



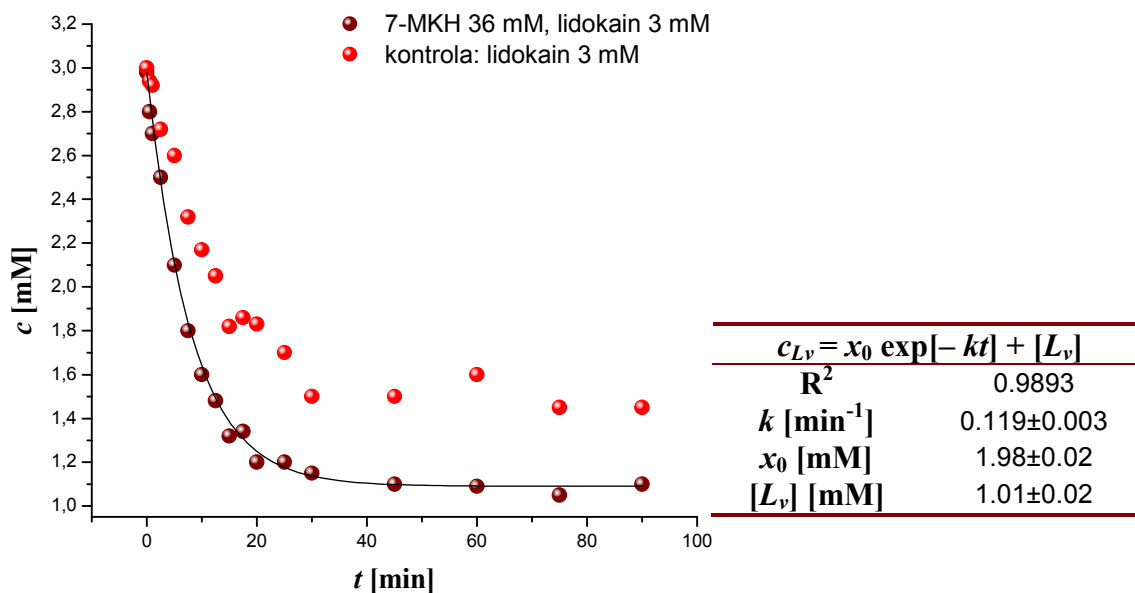
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 5.5 u prisustvu 7-monoketoholne kiseline u hloroformu ( $c = 6 \text{ mM}$ )**



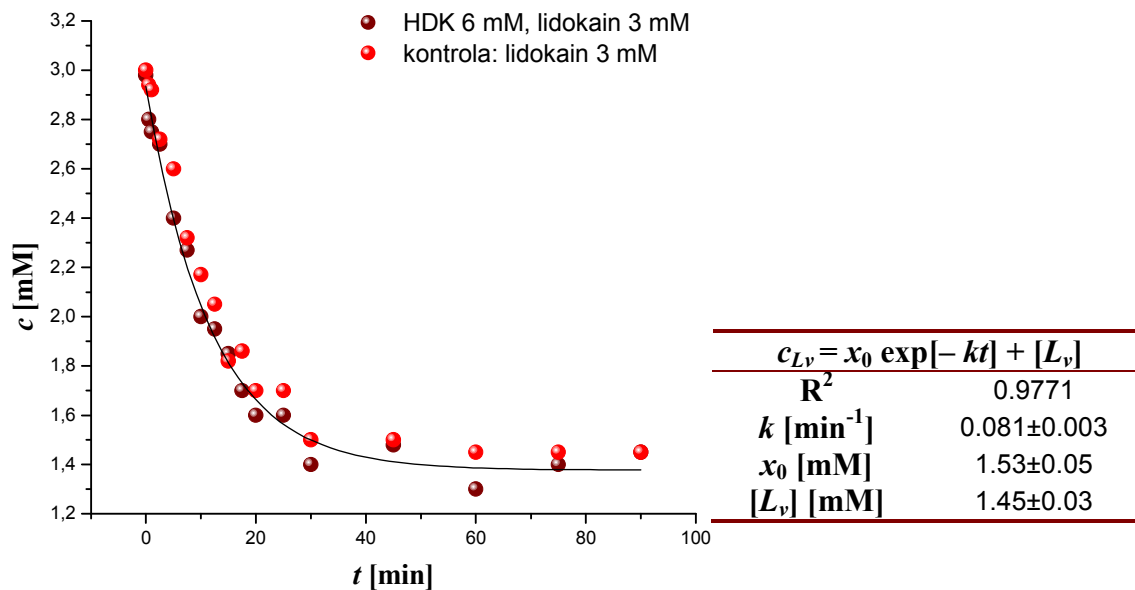
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 5.5 u prisustvu 7-monoketoholne kiseline u hloroformu ( $c = 30 \text{ mM}$ )**



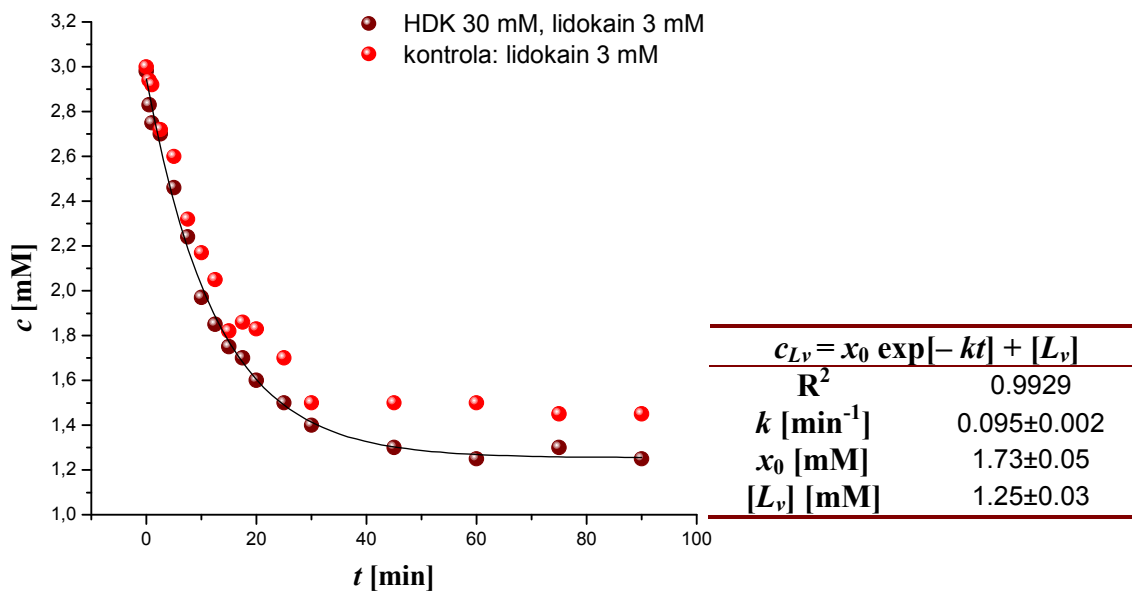
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 5.5 u prisustvu 7-monoketoholne kiseline u hloroformu ( $c = 36 \text{ mM}$ )**



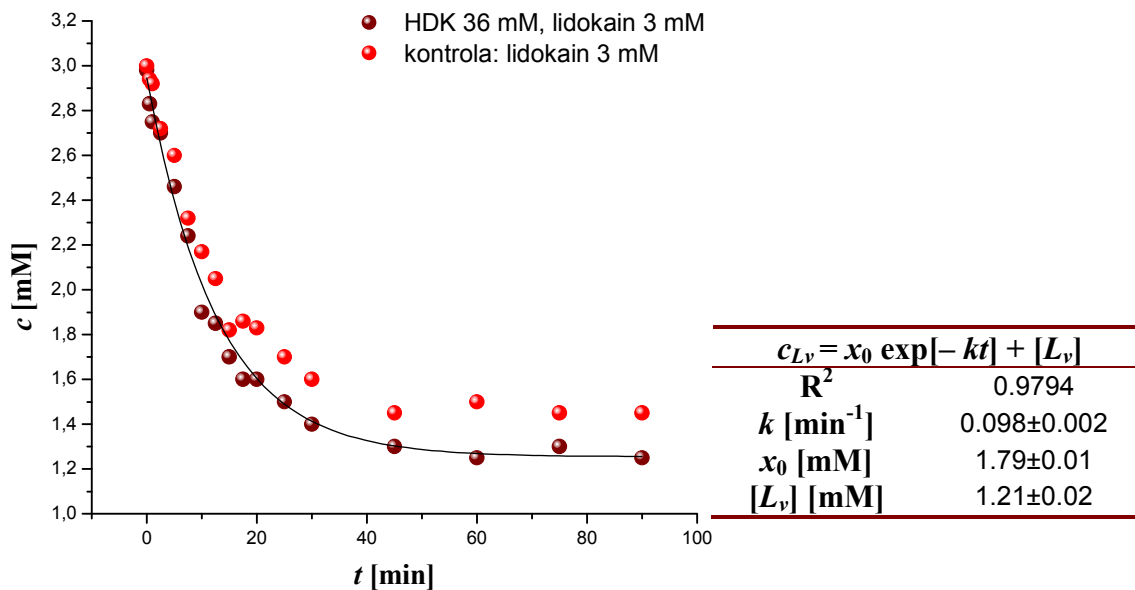
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 5.5 u prisustvu henodeoksiholne kiseline u hloroformu ( $c = 6 \text{ mM}$ )**



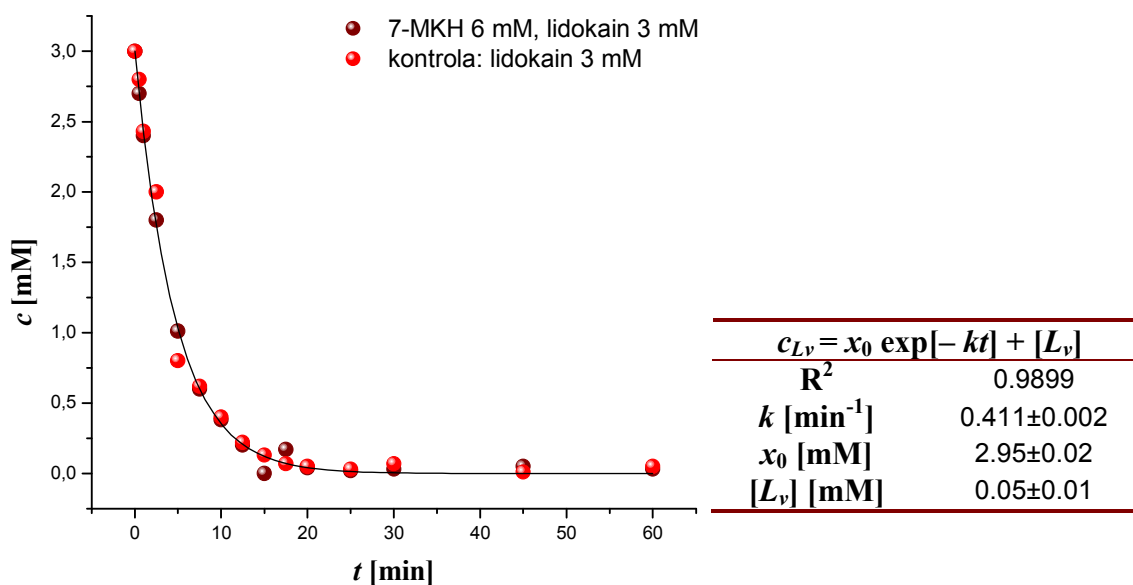
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 5.5 u prisustvu henodeoksiholne kiseline u hloroformu ( $c = 30$  mM)**



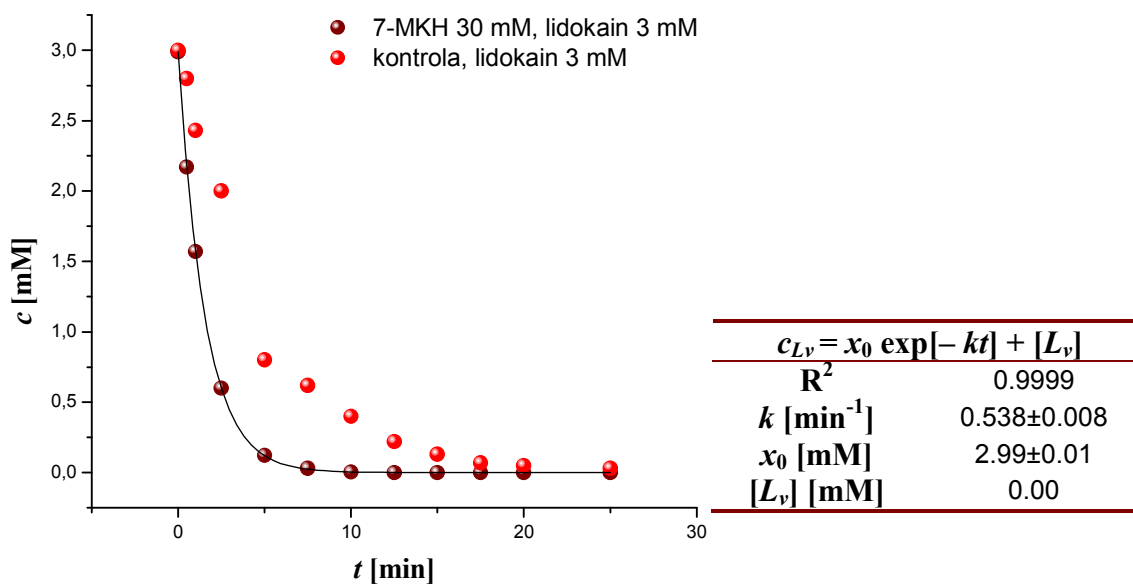
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 5.5 u prisustvu henodeoksiholne kiseline u hloroformu ( $c = 36$  mM)**



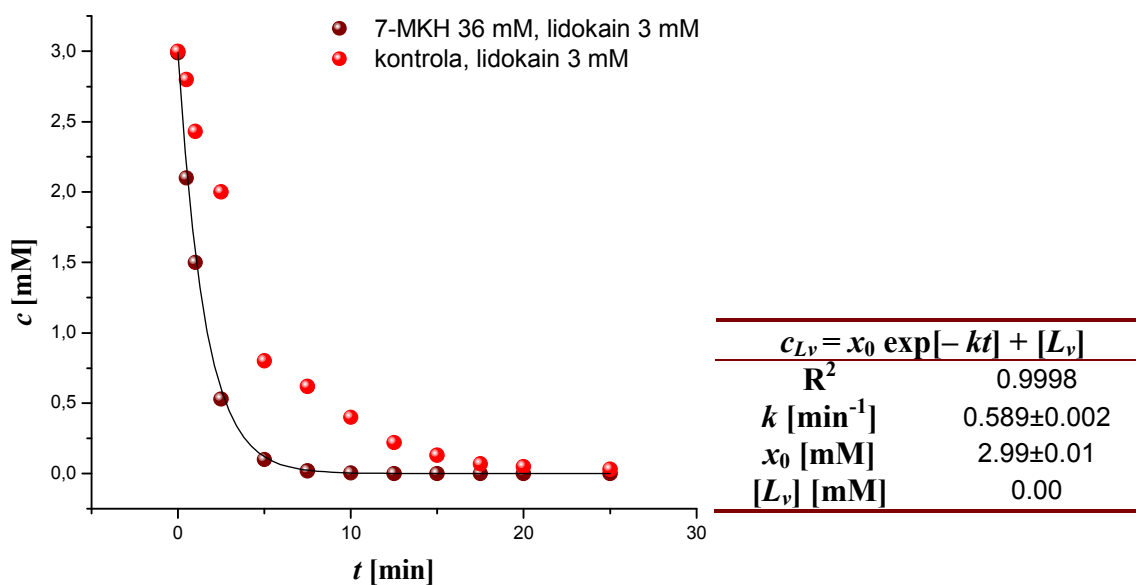
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 7.4 u prisustvu 7-monoketoholne kiseline u hloroformu ( $c = 6 \text{ mM}$ )**



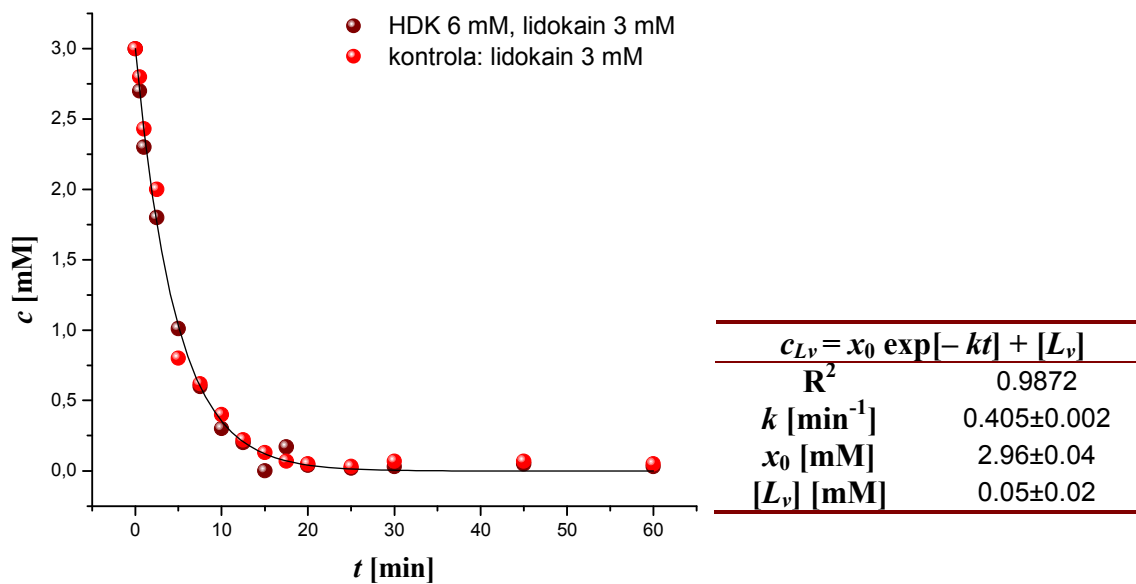
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 7.4 u prisustvu 7-monoketoholne kiseline u hloroformu ( $c = 30 \text{ mM}$ )**



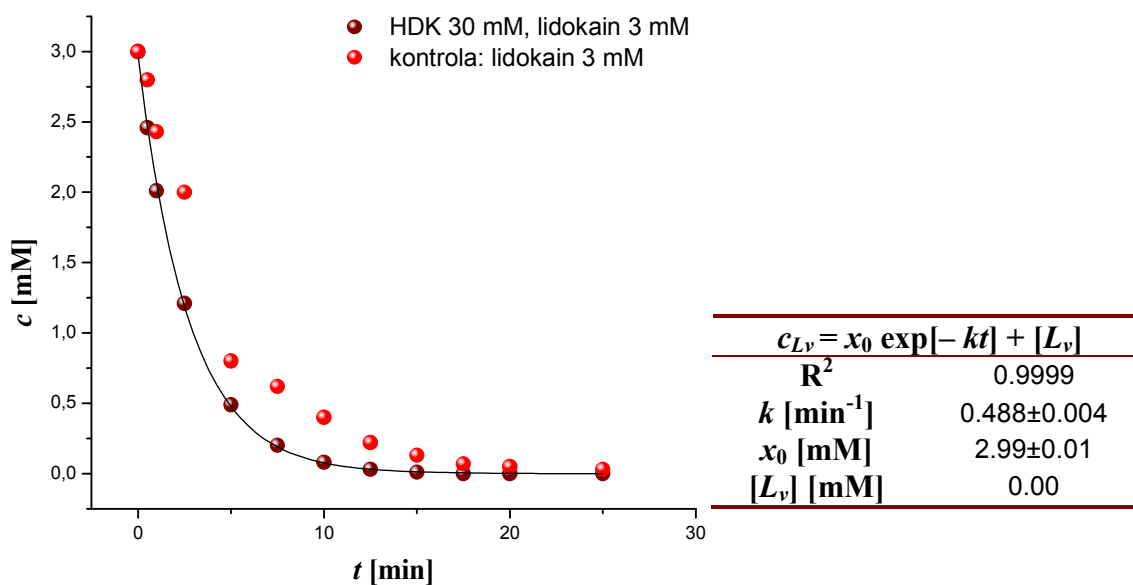
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 7.4 u prisustvu 7-monoketoholne kiseline u hloroformu ( $c = 36 \text{ mM}$ )**



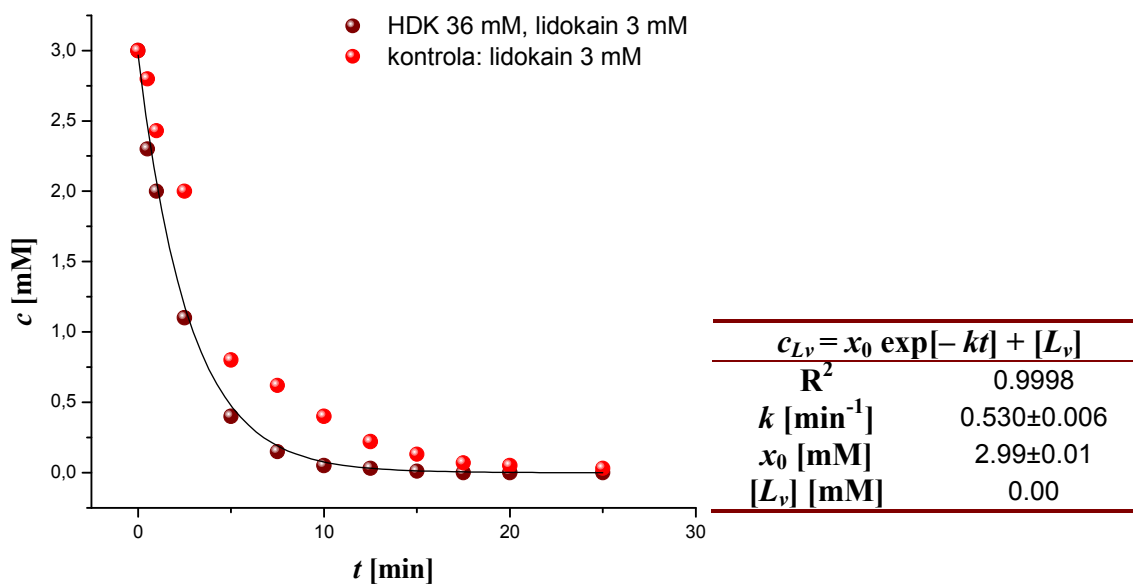
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 7.4 u prisustvu henodeoksiholne kiseline u hloroformu ( $c = 6 \text{ mM}$ )**



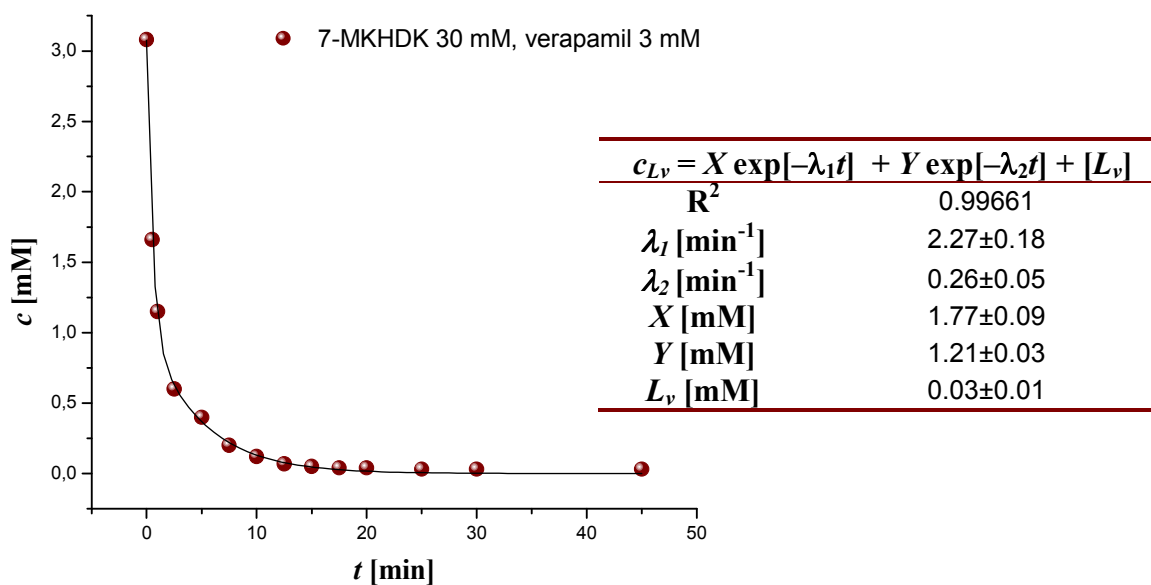
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 7.4 u prisustvu henodeoksiholne kiseline u hloroformu ( $c = 30$  mM)**



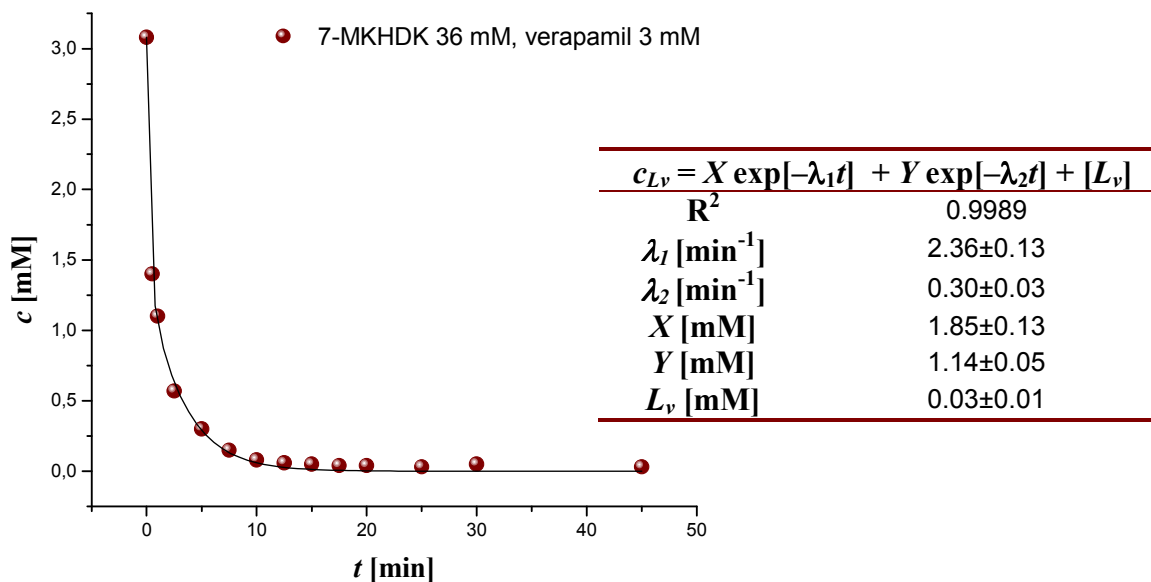
**Monoeksponencijalna promena koncentracije lidokaina u vodenoj fazi pH 7.4 u prisustvu henodeoksiholne kiseline u hloroformu ( $c = 36$  mM)**



**Bieksponencijalna promena koncentracije verapamila u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu 7-monoketohenodeoksiholne kiseline u hloroformu ( $c = 30 \text{ mM}$ )**

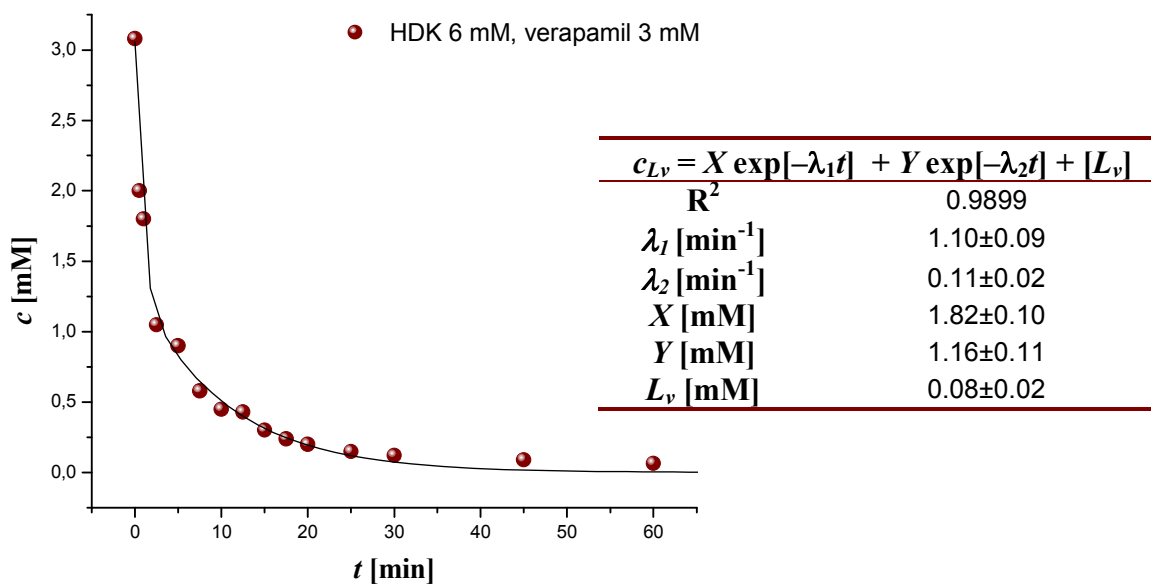


**Bieksponencijalna promena koncentracije verapamila u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu 7-monoketohenodeoksiholne kiseline u hloroformu ( $c = 36 \text{ mM}$ )**

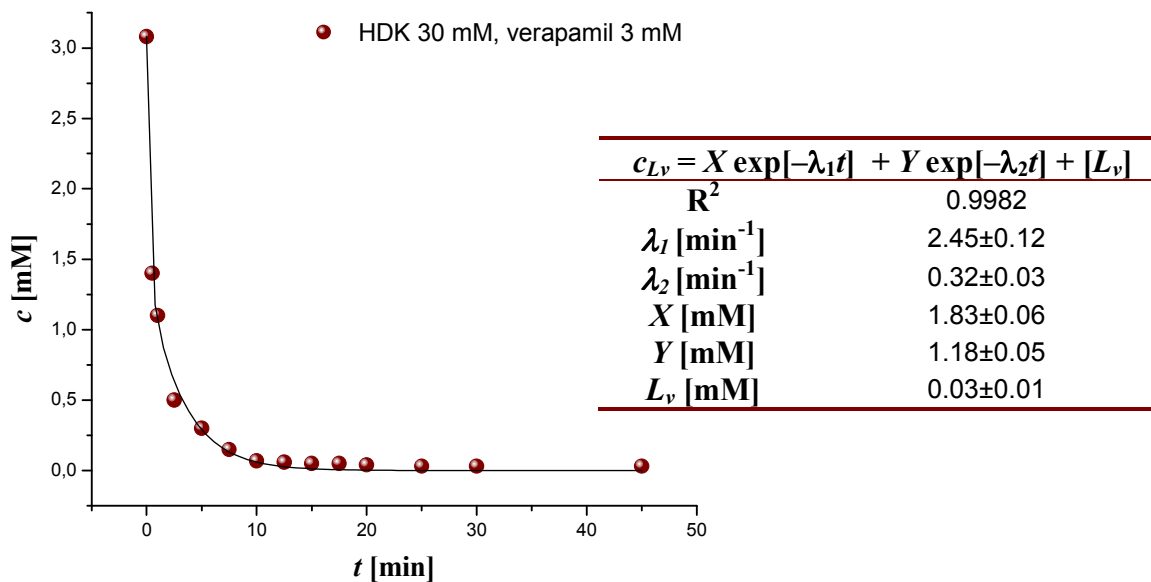




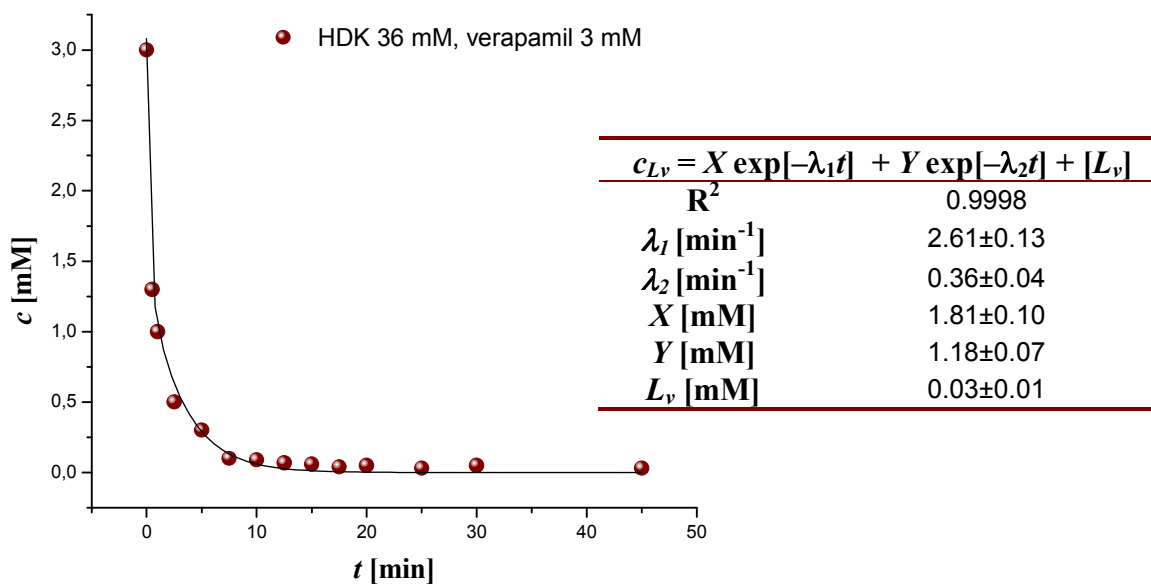
**Bieksponencijalna promena koncentracije verapamila u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu henodeoksiholne kiseline u hloroformu ( $c = 6 \text{ mM}$ )**



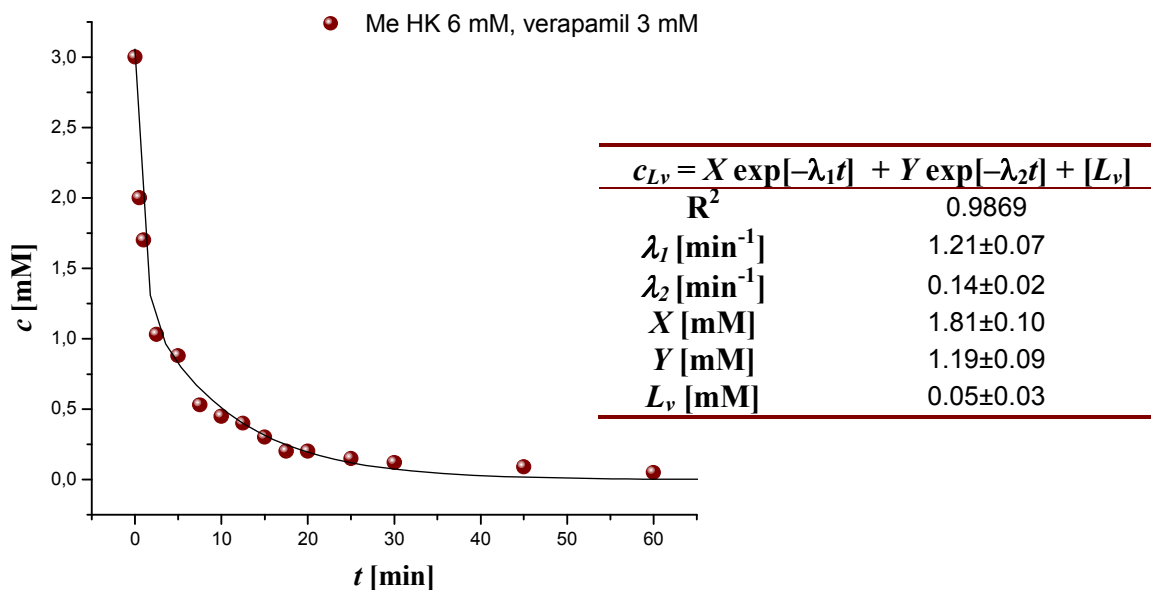
**Bieksponencijalna promena koncentracije verapamila u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu henodeoksiholne kiseline u hloroformu ( $c = 30 \text{ mM}$ )**



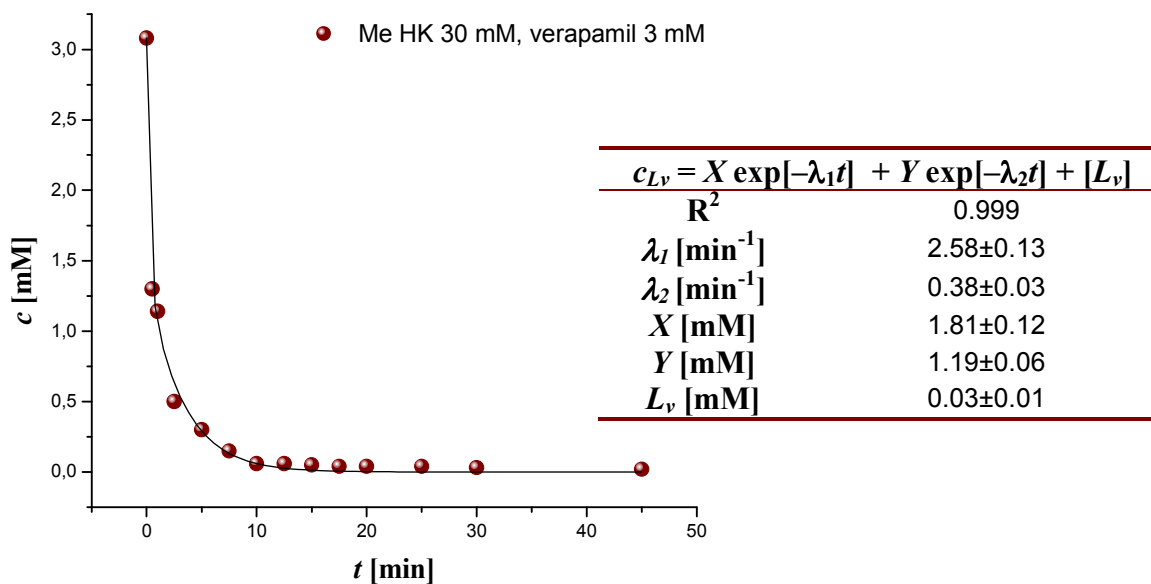
**Bieksponencijalna promena koncentracije verapamila u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu henodeoksiholne kiseline u hloroformu ( $c = 36 \text{ mM}$ )**



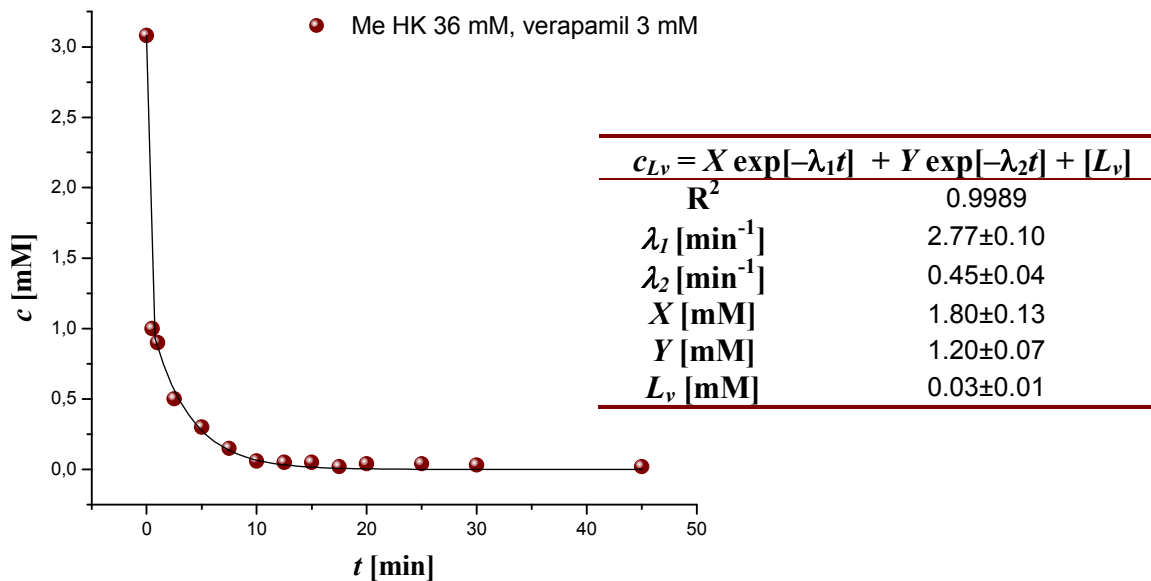
**Bieksponencijalna promena koncentracije verapamila u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu metilestra holne kiseline u hloroformu ( $c = 6 \text{ mM}$ )**



**Bieksponencijalna promena koncentracije verapamila u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu metilestra holne kiseline u hloroformu ( $c = 30 \text{ mM}$ )**

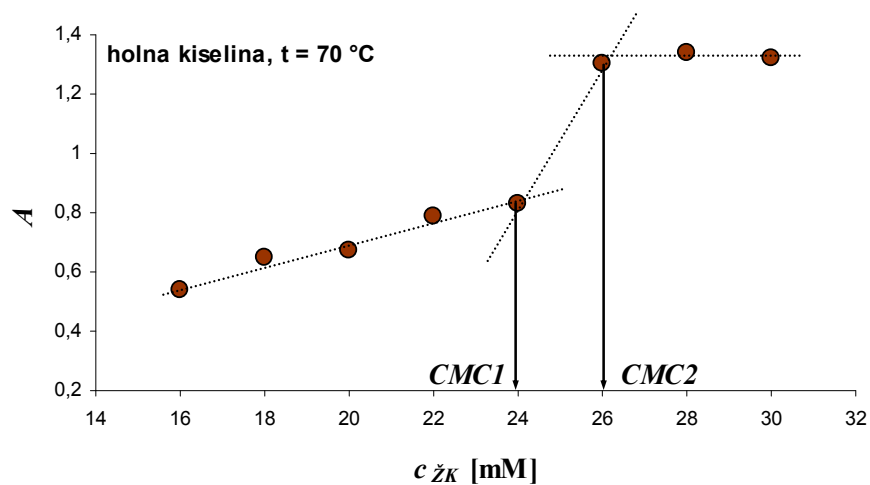
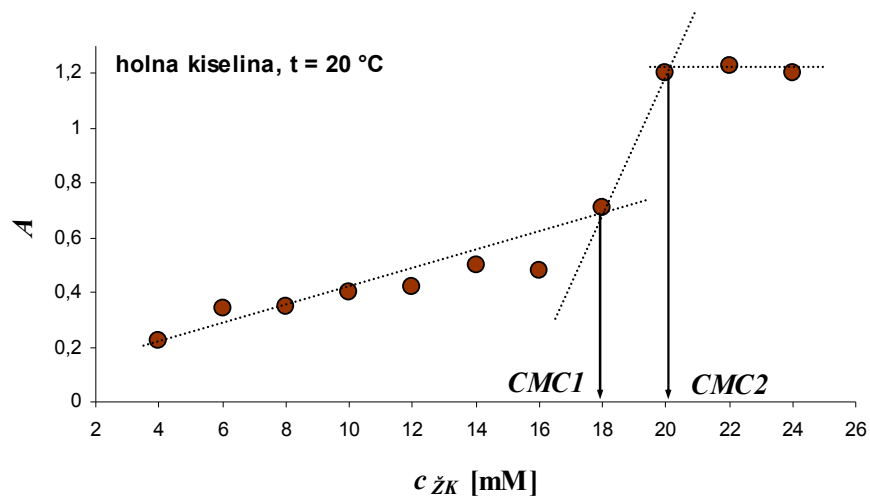


**Bieksponencijalna promena koncentracije verapamila u vodenoj fazi pH 6.5 u prisustvu metilestra holne kiseline u hloroformu ( $c = 36 \text{ mM}$ )**



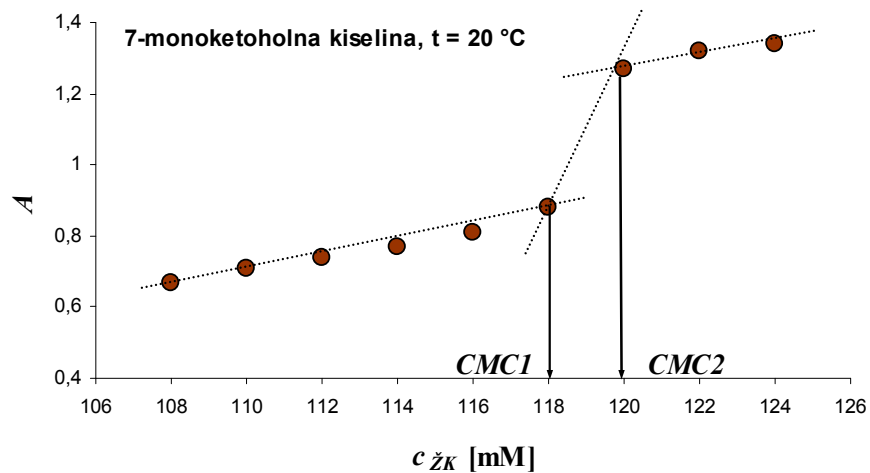
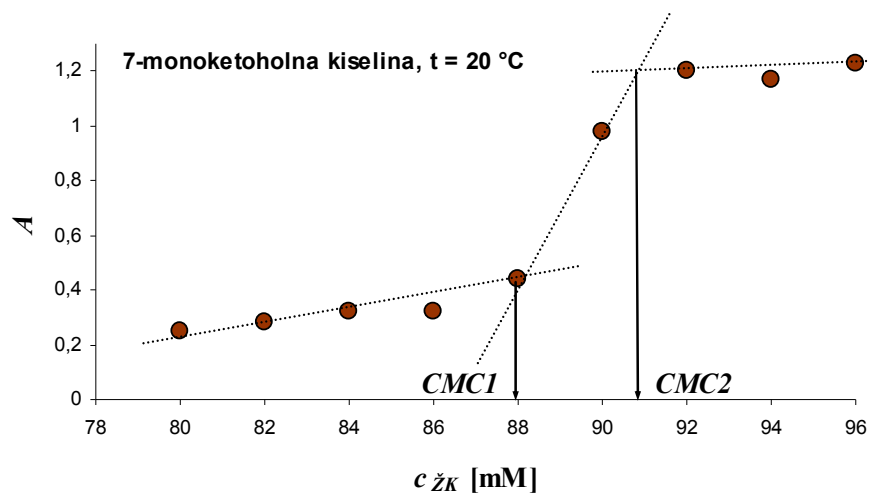
## 8.2. PRIMERI ZA TEMPERATURNU ZAVISNOST KRITIČNE MICELARNE KONCENTRACIJE (metoda solubilizacije)

*holna kiselina*<sup>11</sup>

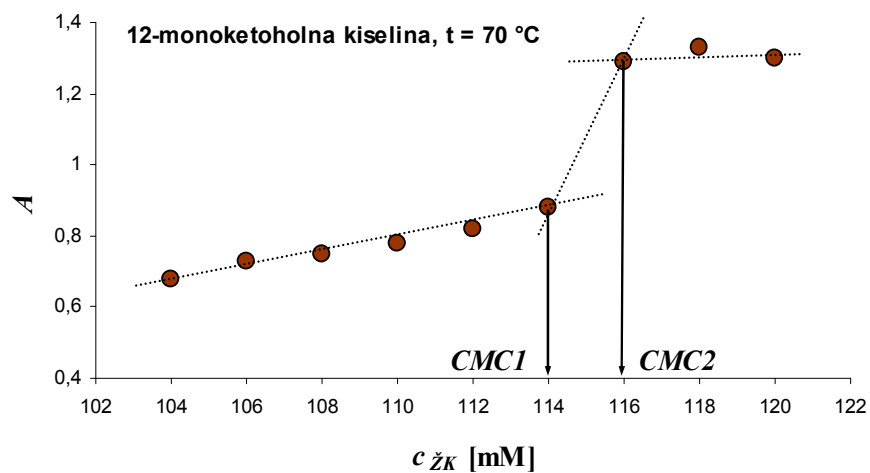
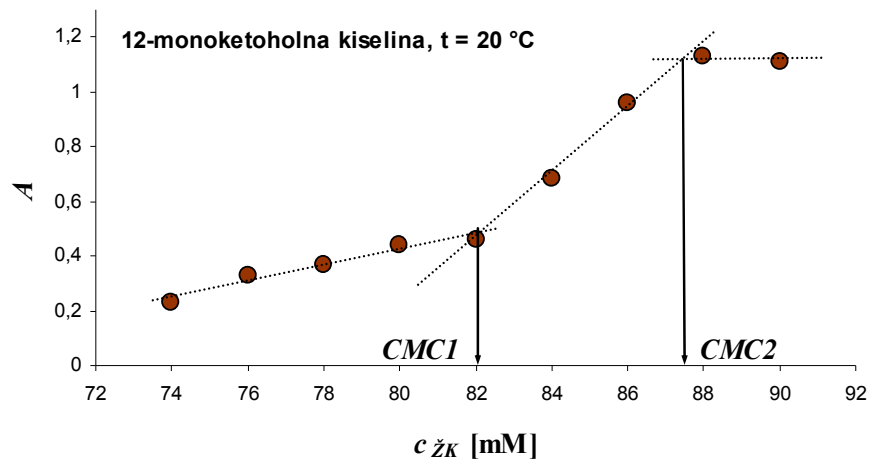


<sup>11</sup>  $CMC$  se dobija kao aritmetička sredina  $CMC1$  i  $CMC2$

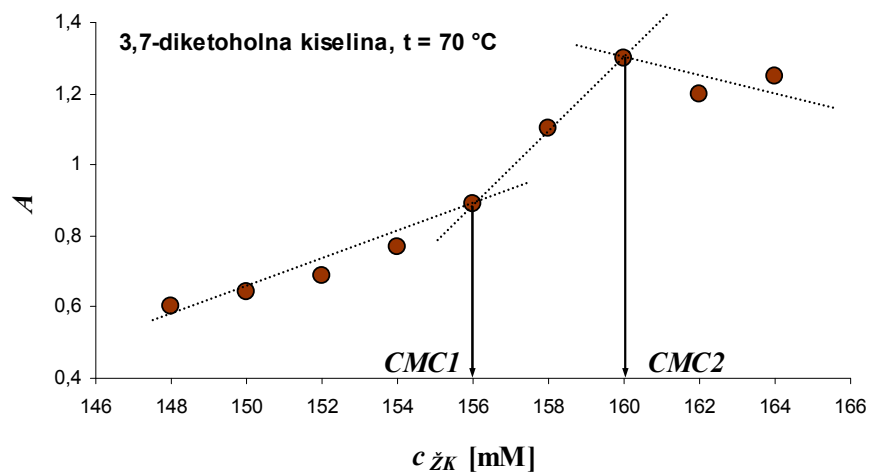
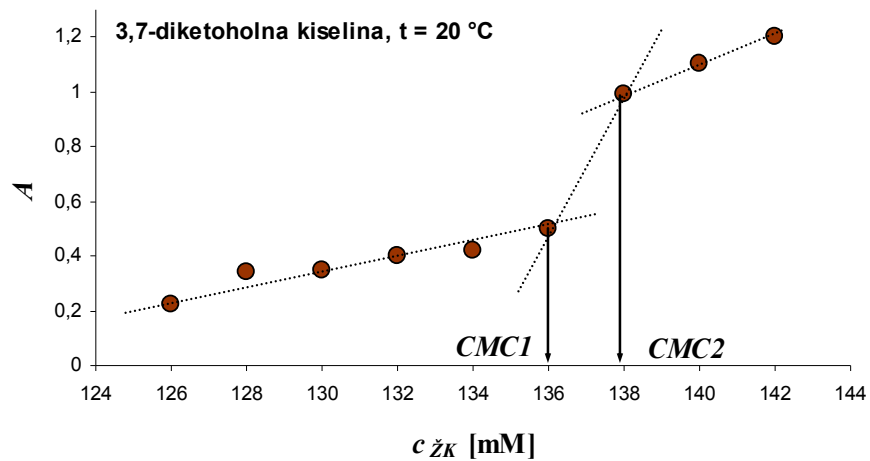
## 7-monoketoholna kiselina



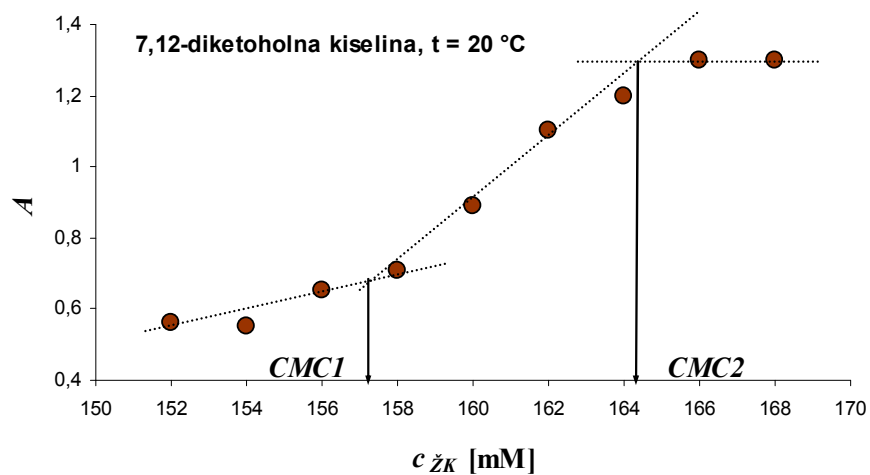
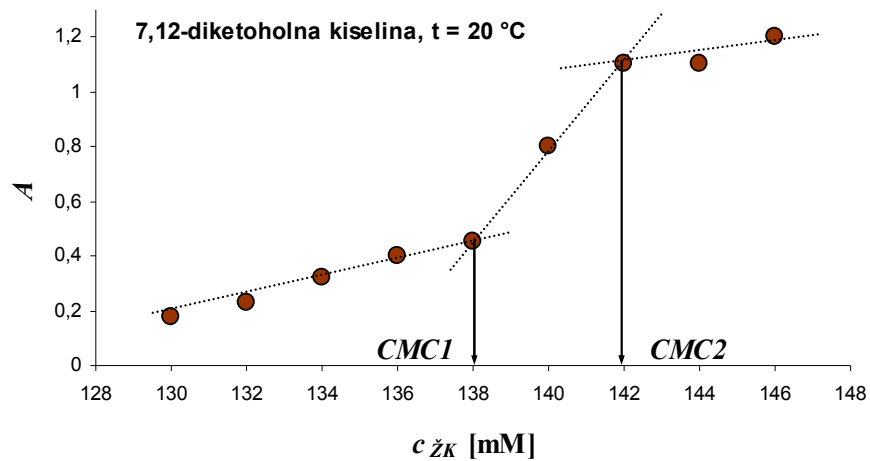
## 12-monoketoholna kiselina



## 3,7-diketoholna kiselina

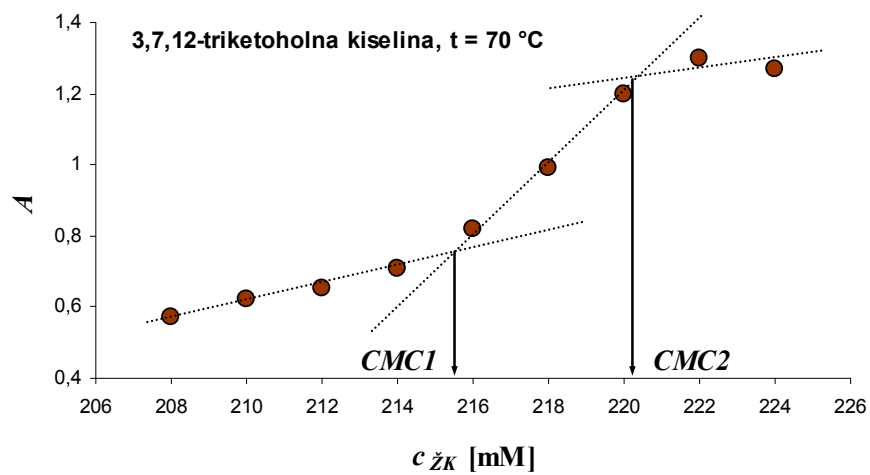
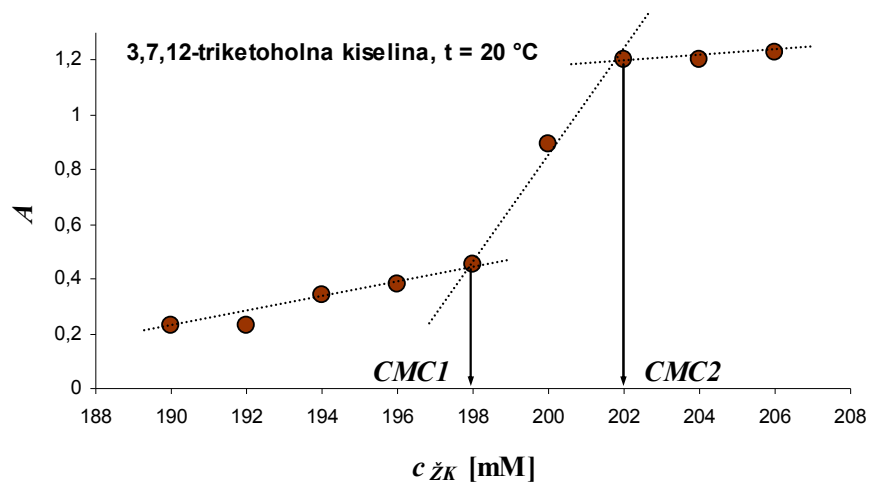


## 7,12-diketoholna kiselina

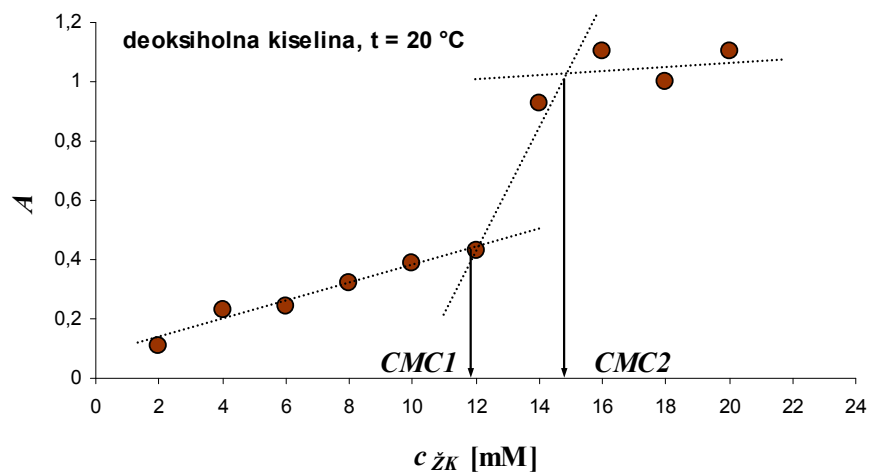
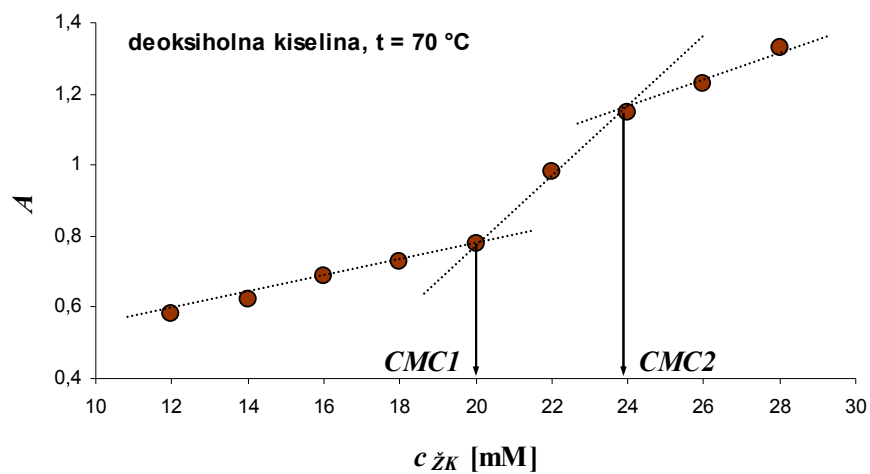




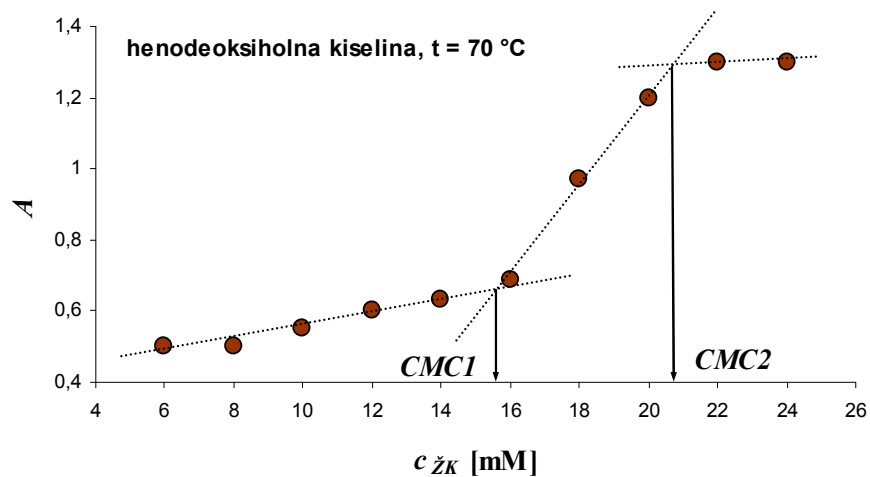
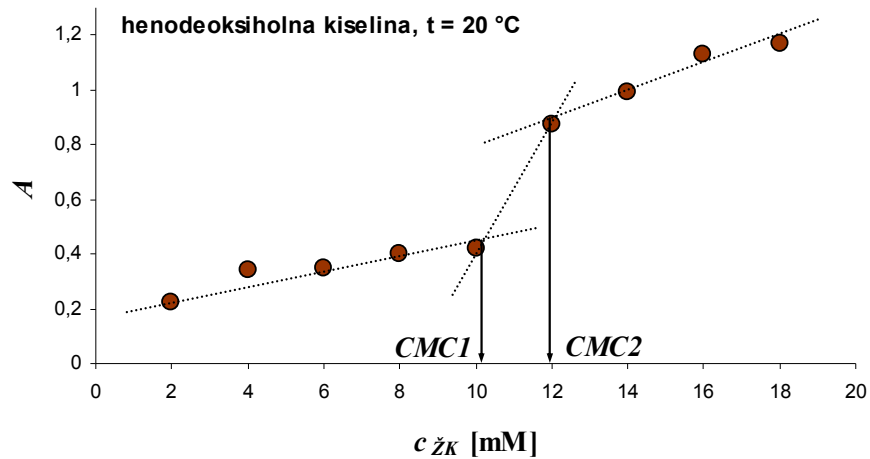
## 3,7,12-triketoholna kiselina



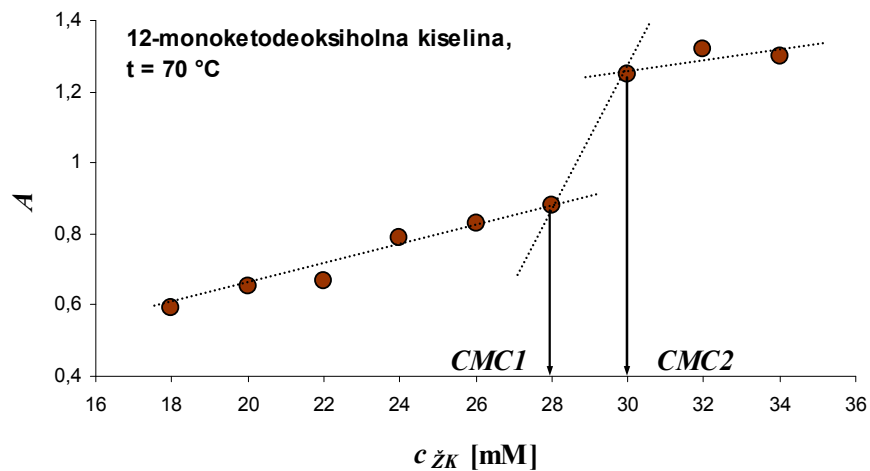
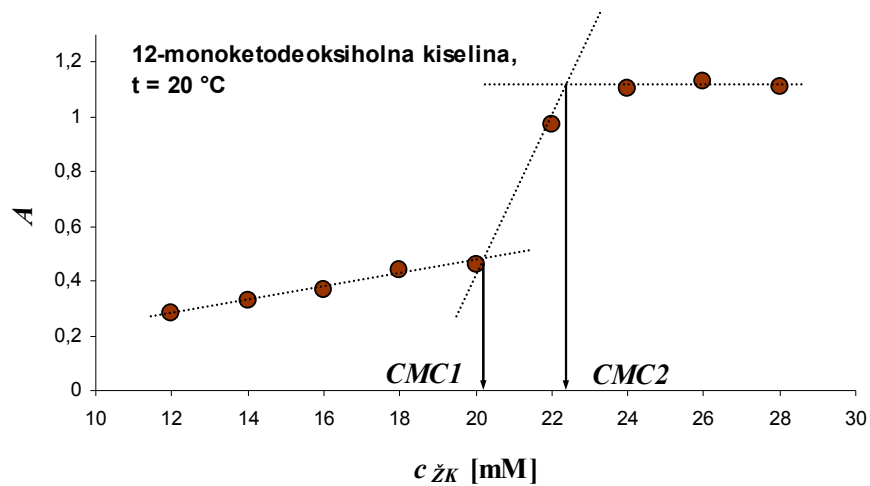
## deoksiholna kiselina



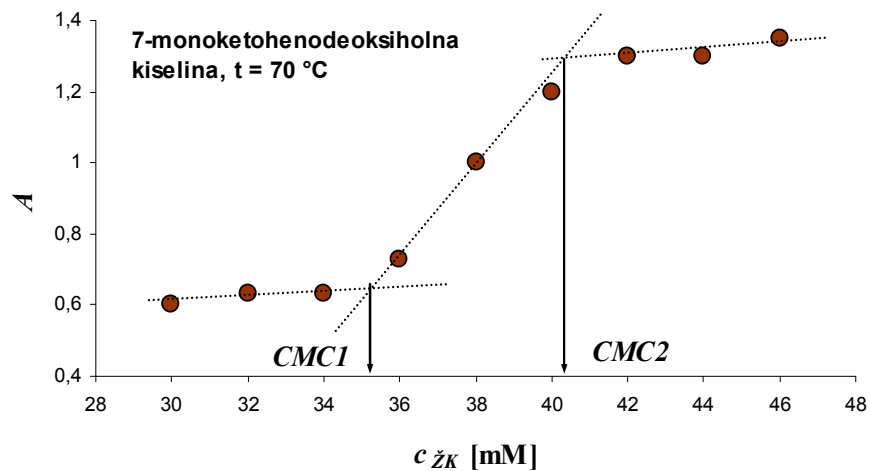
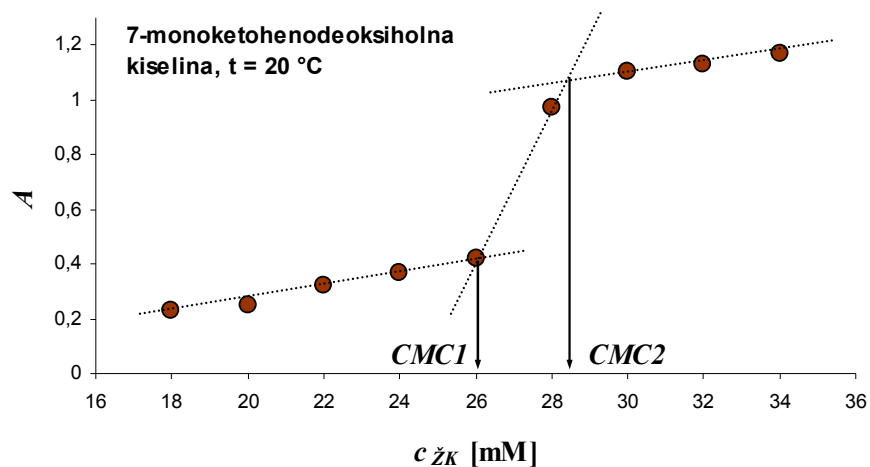
## henodeoksiholna kiselina



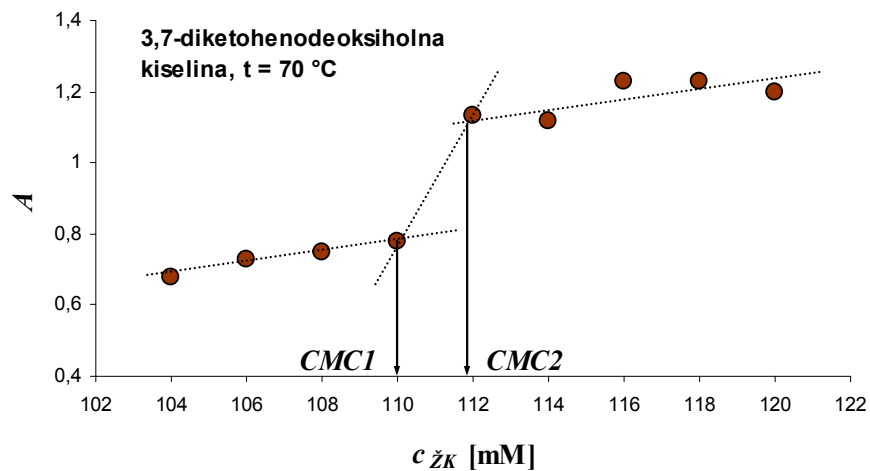
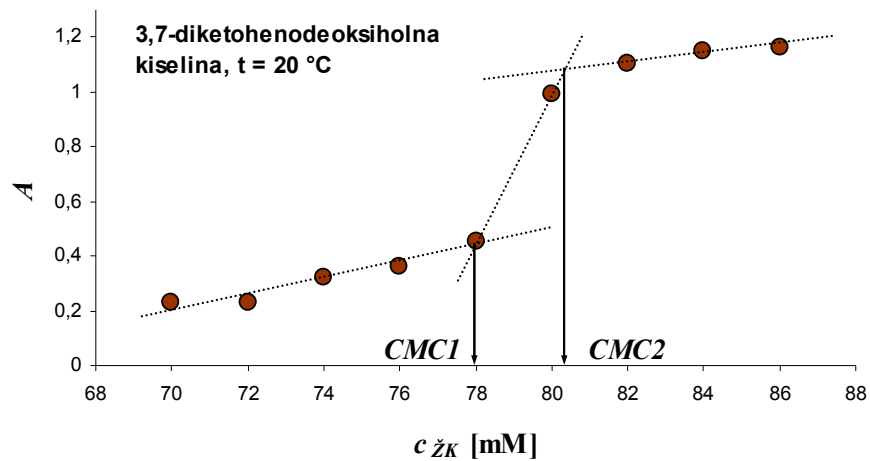
## 12-monoketodeoksiholna kiselina



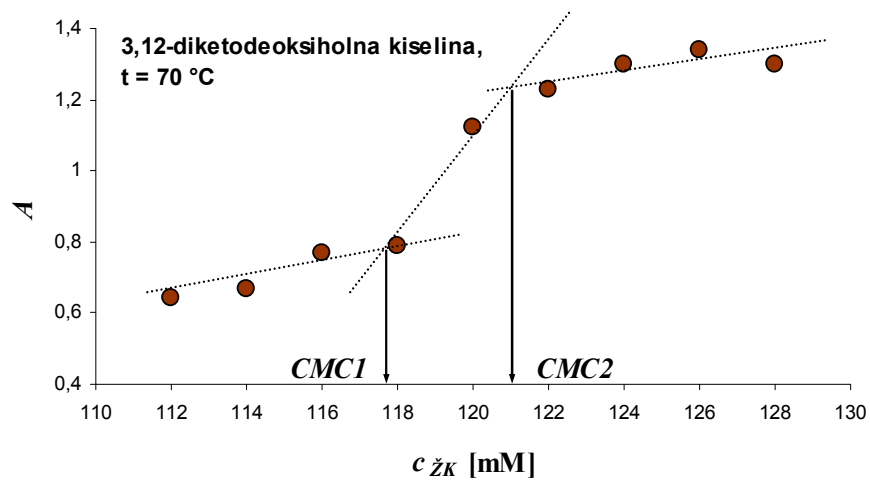
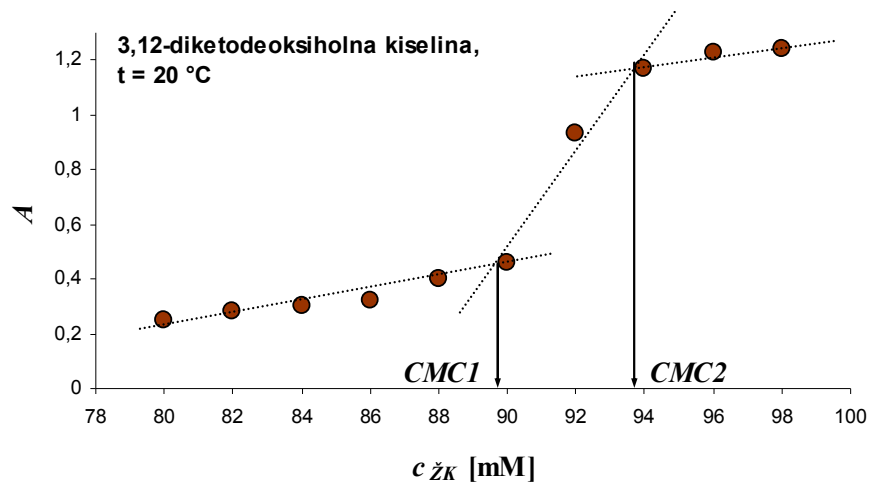
## 7-monoketohenodeoksiholna kiselina



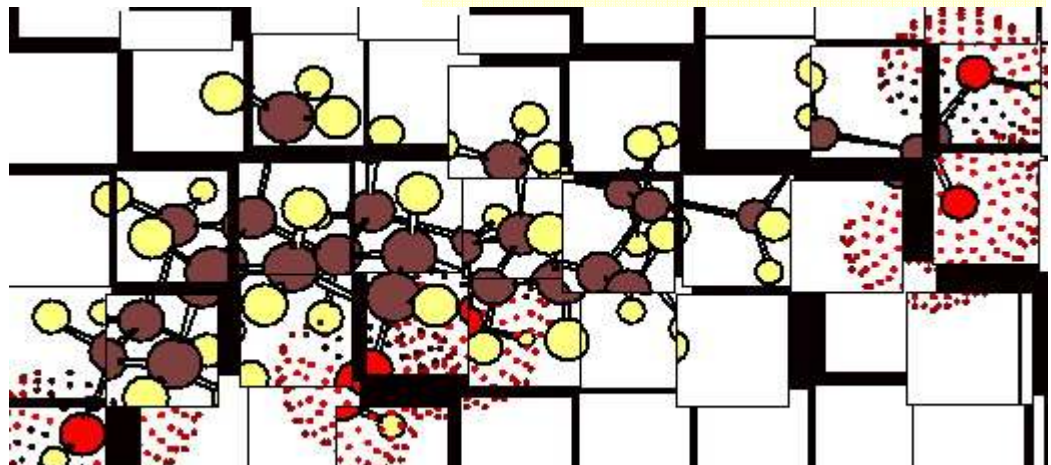
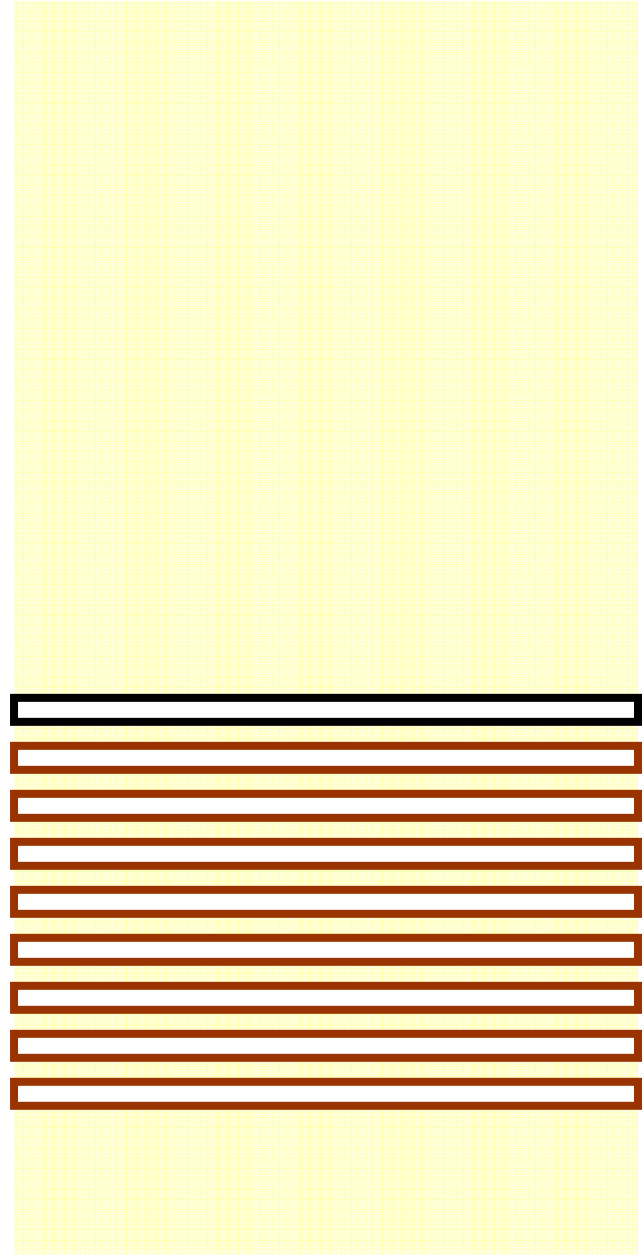
## 3,7-diketohenodeoksiholna kiselina



## 3,12 -diketodeoksiholna kiselina



# 9. Biografija







Mihalj M. Poša je rođen 18. 01. 1978. godine u Subotici. Osnovnu i srednju školu završio je u Subotici. 1997. godine osvojio je drugo mesto na republičkom takmičenju iz hemije, što je omogućilo upis na fakultet bez polaganja prijemnog ispita. Školske 97/98 godine upisao se na Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, smer diplomirani hemičar. Diplomirao je 2002. godine sa prosečnom ocenom 9.60. Naziv diplomskog rada je bio **”Sinteza 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroksi-12-keto-5 $\beta$ -holanske kiseline i ispitivanje njene biološke aktivnosti”**. Dobio je univerzitetsku nagradu za postignuti uspeh u toku studiranja 2002. godine. Iste

godine upisao se na polediplomske studije na smeru Biohemija Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu. Predviđene ispite na poslediplomskim studijama položio je sa prosečnom ocenom 10.00. Godine 2006. je odbranio magistarsku tezu pod naslovom **”Određivanje kritičnih micelarnih koncentracija sintetizovanih okso-derivata holne kiseline i njihov uticaj na delovanje lidokaina i biohemijske parameter kod pacova**. Od 2003. godine radi kao asistent-pripravnik, a od 2008. kao asistent na Zavodu za Farmaciju, Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, gde drži vežbe iz Organske hemije. U periodu od 2002. do 2005. držao je i vežbe iz Farmaceutске hemije, dok u periodu 2004-2007. držao je računске vežbe iz Farmakokinetike.

*Novi Sad, 02.06.2008.*

*Mihalj Poša*

**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
PRIRODNO - MATEMATIČKI FAKULTET  
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

**Redni broj:**  
RBR

**Identifikacioni broj:**  
IBR

**Tip dokumentacije:** Monografska dokumentacija  
TD

**Tip zapisa:** Tekstualni štampani materijal  
TZ

**Vrsta rada:** Doktorska disertacija  
VR

**Autor:** Mihalj Poša  
AU

**Mentor:** Prof. Dr. Ksenija Kuhajda  
MN

**Naslov rada:** Uticaj žučnih kiselina na transportne procese odabranih lekova u *in vitro* eksperimentima  
NR

**Jezik publikacije:** Srpski (latinica)  
JP

**Jezik izvoda:** Srpski/Engleski  
JI

**Zemlja publikovanja:** Republika Srbija  
ZP

**Uže geografsko područje:** Vojvodina  
UGP

**Godina:** 2008  
GO

**Izdavač:** Autorski reprint  
IZ

**Mesto i Adresa:** Subotica, P. Lumumbe 15  
**MA**

**Fizički opis rada: (broj poglavlja/broj strana/broj lit. citata/broj tabela/broj slika/  
/broj priloga)**  
**(9/253/210/52/166/72)**  
**FO**

**Naučna oblast:** Hemija  
**NO**

**Naučna disciplina:** Biohemija  
**ND**

**Ključne reči:** žučne kiseline, kritična micelarna koncentracija, lidokain, verapamil  
**PO**

**UDK:**  
**Čuva se:** Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, Novi Sad  
**ČU**

**Važna napomena:** Nema  
**VN**

**Izvod:** U ovoj disertaciji su ispitivani efekti žučnih kiselina na transportne procese kod kojih se ispoljava efekat građenja molekulskih agregata (micele, mešovite micele, kompleks sa vodoničnim vezama itd). Ispitan je uticaj temperature na kritičnu micelarnu koncentraciju holne, deoksiholne i henodeoksiholne kiseline i njihovih keto derivata, određena je entropija formiranja micela, koja je važan parametar ne samo u samoasocijaciji žučnih kiselina već i u njihovoj interakciji sa hidrofobnim molekulima. Određen je kompleks sa vodoničnim vezama između lidokaina i žučnih kiselina, regresiona jednačina koja povezuje strukturne parametre žučnih kiselina i ravnotežnu konstantu formiranja tog kompleksa. Zatim je ispitivano delovanje žučnih kiselina u hloroformu na kinetiku prelaza lidokaina i verapamila iz vodene faze u hloroform (model za predtretman sa žučnim kiselinama) U ovom radu je određena i solubilizacija lecitina i holesterola sa žučnim kiselinama.

**IZ**

**Datum prihvatanja teme od strane NN veća:** 21.06.2006.  
**DP**

**Datum odbrane:**  
**DO**

**Članovi komisije:**

**KO**

**Predsednik:** Dr / Neda Mimica-Dukić / redovni profesor / PMF-a u Novom Sadu

**Član:** Dr / Ksenija Kuhajda / redovni profesor / PMF-a u Novom Sadu

**Član:** Dr / Vera Ćirin-Novta / redovni profesor / PMF-a u Novom Sadu

**Član:** Dr / Momir Mikov / redovni profesor / Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

**Član:** Dr / Jovan Popović / redovni profesor / Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF SCIENCES & MATHEMATICH  
KEY WORDS DOCUMENTATION**

**Acesion number:**

ANO

**Identification number:**

INO

**Document type:** Monograph type

DT

**Type of record:** Printed text

TR

**Contents code:** PhD disertation

CC

**Author:** Mihalj Poša

AU

**Mentor:** Prof. Dr. Ksenija Kuhajda

MN

**Title:** Influence of bile acids on drug transportation processes *in vitro*

TI

**Language of text:** Serbian

LT

**Language of abstract:** Serbian/English

LA

**Country of publication:** Serbia

CP

**Locality of publication:** Vojvodina

LP

**Publication year:** 2008

PY

**Publisher:** Autor's reprint

PU

**Publ. place:** Subotica, P. Lumumbe 15  
**PP**

**Physical description:**  
**(chapter/pages/literature/tables/pictures/additional lists)**  
**(9/253/210/52/166/72)**  
**PD**

**Scientific field:** Chemistry  
**SF**

**Scientific discipline:** Biochemistry  
**SD**

**Subject/Key words:** bile acids, critical micellar concentration, lidocain, verapamil  
**SKW**

**UC:**  
**Holding data:** Faculty of Natural Sciences, Department of Chemistry, Novi Sad  
**HD**

**Note:** None  
**N**

**Abstract:** In this work, effects of bile acids which form molecular aggregates (micelles, mixed micelles, hydrogen complex etc.) on transportation processes were investigated. Influence of temperature on critical micellar concentration of cholic, deoxycholic and chenodeoxycholic acids and its keto derivatives was examined. Also, micelle formation entropy was determined. This is very important parameter for self-association of bile acids and their interactions with hydrophobic molecules.

Hydrogen complex of lidocain and bile acids was investigated and regression equation which connects structural parameters of bile acids and equilibrium constant of forming this complex was established. After that, effects of bile acids on transfer kinetics of lidocaine and verapamil from aqueous phase to chloroform was investigated. Also, micellar solubilization of lecithin and cholesterol by bile acids was determined.

**AB**

**Accepted by the Scientific Board on:** 21.06.2007.  
**ASB**

**Defended:**  
**DE**

**Thesis defended board:**  
**(degree/name/surname/title/faculty)**  
**DB**

**President:** PhD / Neda Mimica-Dukić / full professor / Faculty of Natural Science, Novi Sad

**Member:** PhD / Ksenija Kuhajda / full professor / Faculty of Natural Science, Novi Sad

**Member:** PhD / Vera Ćirin-Novta / full professor / Faculty of Natural Science, Novi Sad

**Member:** PhD / Momir Mokov / full professor / Medical Faculty, Novi Sad

**Member:** PhD / Jovan Popović / full professor / Medical Faculty, Novi Sad