

*Originalni članci/
Original articles*

UTICAJ HIDROFOBNOG DOMENA
MICELARNIH AGREGATA ŽUČNIH
KISELINA NA NJIHOV SOLUBILIZACIONI
KAPACITET

INFLUENCE OF BILE ACIDS' HIDROPHOBIC
DOMAIN ON THEIR SOLUBILISATION
CAPACITY

Correspondence to:

Mr ph. Kosta Popović,
21000 Novi Sad,
Beogradski Kej 29,
Tel. 021 527566
E-mail: popovic.kole@gmail.com

Kosta Popović, Mihalj Poša, Ana Sebenji, Dejan Ćirin

Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Katedra za farmaciju,
21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Ključne reči

struktura; žučne kiseline;
solubilizacija; okso grupe;
fenobarbiton

Key words

structure; bile acids; solubilization; oxo
groups; phenobarbitone

Apstrakt

Osobine žučnih kiselina i njihove interakcije sa lekovima u velikoj meri određuje geometrija molekula 5 β -holanske kiseline na čijem skeletu se razlikuje konveksna, β strana, koja je nepolarna, i konkavna, α površina koja je polarna. Žučne kiseline imaju sposobnost samoasocijacije u agregate micela, značajne za formulisanje nanomedikamentata. Cilj rada je ispitivanje hidrofobnosti unutrašnjeg domena micela žučnih kiselina solubilizacijom probnim molekulom fenobarbitona, koji ima tendenciju ulaska u hidrofobnu sredinu. Koncentracija fenobarbitona je određivana visoko efikasnom tečnom hromatografijom prema validiranoj metodi. Efekat solubilizacije opada sa porastom broja supstituisanih OH grupa sa okso grupama. Najefektivnija žučna so u solubilizaciji fenobarbitona je natrijum deoksiholat čiji je steroidni skelet ujedno i najhidrofobniji. Fenilna grupa fenobarbitona inkorporira se u hidrofobni domen micela. Povećanjem broja okso grupa opada hidrofobni domen micela, pa samim tim i sposobnost primanja hidrofobnog gosta.

UVOD

Žučne kiseline su amfifilni molekuli. Spadaju u posebnu grupu amfifilnih jedinjenja jer umesto uobičajene strukture molekula površinski aktivnih materija, u molekulu žučne kiseline ne postoji polarna glava i nepolarni rep, već umesto toga postoji polarna i nepolarna strana molekula. One pored dobro poznatih fizioloških uloga kao što je micelarna solubilizacija lipida u toku varenja i regulacije biosinteze (homeostaze) holesterola učestvuju i u velikom broju metaboličkih puteva kao regulatori (modulatori) nuklearnih receptora; membranskih receptora; jonskih kanala, itd., što u novije vreme daje sve veću primenu analoga žučnih kiselina kao terapeutika u metaboličkim poremećajima (dijabetes tipa 2, gojaznost, hipertenzija itd.) [1-7]. Žučne kiseline su u fiziološkim uslovima jonizovane. Step en vezivanja žučnih kiselina za receptore, jonske kanale, kao i njihova efikasnost u solubilizaciji lipida (hidrofobnih lekova) značajno zavise od odnosa njihove hidrofobne i hidrofilne površine [8-11]. Membranotoksičnost žučnih kiselina određena je njihovom hidrofobnošću [11,12]. Okso derivati žučnih kiselina pokazuju manju toksičnost od njihovih hidroksi analoga [11,13], kao

i promotorno delovanje u transportu nekih lekova kroz lipofilne barijere u organizmu (npr. krvna moždana barijera) [14-21].

Žučne kiseline poseduju skelet ciklopentanoperhidrofenantrena sa 17 atoma ugljenika. Žučne kiseline enzimski proizvedene u jetri čoveka su primarne žučne kiseline (holna i henodeoksiholna kiselina) iz kojih se u crevnoj flori kolona bakterijskom transformacijom dobijaju sekundarne žučne kiseline (deoksiholna kiselina, hiodeoksiholna kiselina i litholna kiselina). Primarne i sekundarne žučne kiseline su hidroksi derivati 5 α -holanske kiseline [1,6,22-24].

Različita istraživanja pokazala su da je konkavna površina (α) steroidnog skeleta žučnih kiselina polarna (hidrofilna), a konveksna površina (β) nepolarna (hidrofobna). Ovo se objašnjava time što su hidroksilne grupe žučnih kiselina najčešće orijentisane prema α strani steroidnog skeleta, a pri tom angularne aksijalne metil grupe sa C₁₀ i C₁₃ imaju β orijentaciju. Prisustvo i hidrofobne i hidrofilne regije u molekulu žučnih kiselina označava se kao amfifilnost. Karboksilna grupa je pri fiziološkim uslovima jonizovana, pa žučne kiseline u biohemijskim sistemima spadaju u jonske amfifile [1,7,12,25]. Kod holne kiseline je najpotpunije

međusobno razdvajanje hidrofobne (β strana) i hidrofilne površine (α strana), što se označava kao biplanarnost.

Primenom konformacione analize kod žučnih kiselina pri oksidaciji steroidnih hidroksi grupa, dolazi se do sledećih stereohemijskih zapažanja: pri oksidaciji bilo koje α aksijalne (a) OH grupe holne kiseline (OH grupe sa C_7 i C_{12} metilenskih grupa steroidnog skeleta) nastaju okso grupe čiji atomi kiseonika imaju α ekvatorijalne (e) položaje. Atomi kiseonika C_7 i C_{12} okso grupa pomeraju se za 60° u odnosu na položaj $\alpha(a)$ -OH grupa (Newman-ova projekciona formula), pa sa srednjom ravni steroidnog sistema prstenova (SSMP- steroid skeleton main plane) zaklapaju ugao od -30° . Oksidacijom α ekvatorijalne (e) OH grupe (C_3 OH grupa) nastaje okso grupa čiji atom kiseonika ima $\beta(e)$ orijentaciju, to jest zaklapa ugao sa SSMP od 30° . Pri supstituciji OH grupa holne kiseline okso grupama nastaju derivati kod kojih je atom kiseonika pomećen ka β strani steroidnog skeleta, što utiče na promenu polarne površine nastalih okso derivata [13,26].

Kod amfifilnih molekula karakteristično je da u vodenim rastvorima formiraju agregate – micelle. Pri sobnim temperaturama razlog nastajanja miceli je entropijski. U toku povećavanja količine amfila u rastvoru sve više molekula vode učestvuje u hidrataciji hidrofobne površine amfilila što je entropijski nepovoljno. Pri nastajanju agregata veliki broj molekula vode se vraća u rastvor dajući pozitivan entropijski doprinos sistemu (formiranju micelle). Koncentracija amfilila pri kojoj počinje formiranje micela se naziva kritična micelarna koncentracija (CMC). Uglavnom u literaturi postoji svatanje da se koncentracija monomera ne menja iznad CMC, dok dodatkom novih molekula amfilila raste koncentracija miceli. Postoje i pogledi prema kome formiranje agregata počinje već ispod CMC, a da CMC odgovara tački ukupne koncentracije amfilila pri kojem se naglo menjaju fizičko hemijski parametri rastvora [1,33-36].

Za određivanje CMC vrednosti žučnih soli postoje mnoge eksperimentalne tehnike koje su dobro opisane u literaturi. Eksperimentalne metode se mogu podeliti u takozvane neinvazivne metode gde se prate direktne osobine micela ili fizičko hemijskih parametara rastvora kao celine, odnosno invazivne metode gde se koristi probni molekul (rhodamin G, azulen, piren itd) čije osobine se menjaju u zavisnosti od njegovog stepena inkorporacije u micelu. Međutim u literaturi vlada mišljenje da invazivne metode remete pravu strukturu micelle, pošto nastaju mešovite micelle. Stoga je CMC mešovitih micela obično niža od prave vrednosti [33,37,38]. Pored toga osobine rastvora kao što su koncentracija elektrolita, pH, temperatura takođe utiču na vrednosti CMC, pa je dosta teško u literaturi upoređivati CMC vrednosti soli žučnih kiselina pošto od literature do literatura menjaju se metode kao i osobine rastvora [33,36].

Između CMC vrednosti soli žučnih kiselina i vrednosti retencionih parametara u hromatografiji (RPHPLC) postoji dobra korelacija, što upućuje na značaj hidrofobnosti (naročito hidrofobnosti β strane steroidnog jezgra.) amfilila pri njihovoj samoasocijaciji [29,30].

CMC raste ako opada hidrofobnost (uglavnom β strane steroidnog skeleta) žučne kiseline, odnosno smanjuje se njihova težnja ka samoasocijaciji. Vrednost CMC raste u sledećem nizu Na soli žučnih kiselina: deoksiholna kiselina

(konfiguracija OH grupa: $3\alpha,12\alpha$) < henodeoksiholna kiselina ($3\alpha,7\alpha$) < holna kiselina ($3\alpha,7\alpha,12\alpha$) < hiodeoksiholna kiselina ($3\alpha,6\alpha$) < hiolna kiselina ($3\alpha,6\alpha,7\alpha$) < ursodeoksiholna kiselina ($3\alpha,7\beta$) < ursolna kiselina (7) ($3\alpha,7\beta,12\alpha$).

Pri supstituciji OH grupa kod holne kiseline okso grupama, kod dobijenih Na soli okso derivata raste vrednost CMC. Sa povećanjem broja okso grupa u kongeneričnoj grupi sa tri O atoma vezanih za steroidni skelet opada biplanarna osobina u pogledu razdvojenosti hidrofobne i hidrofilne strane steroidnog nukleosa. To se dešava zato što se C_7 i C_{12} okso grupe pomeraju ka srednjoj ravni steroidnog skeleta (SSMP), odnosno C_3 okso grupa prelazi na konveksnu stranu steroidnog skelta. Povećanjem broja okso grupa u molekulu opada hidrofobnost β strane dok β strani raste u odnosu na holnu kiselinu, ipak i dalje β strana ostaje hidrofobnija. Slično je i u kongeneričnoj grupi okso derivata deoksiholne i henodeoksiholne kiseline. Kod obe kongenerične grupe okso derivata, pri sobnoj temperaturi, entropija formiranja micelle opada sa povećanjem broja okso grupe u steroidnom jezgru, pošto opada broj nestabilisanih molekula vode (NSWM) u hidratacionom sloju sa β strane steroidnog sistema prstenova [11,27,28,31,32,39,40].

Pri supstituciji OH grupe sa okso grupom rastre količina stabilizovanih molekula vode (SMV) u hidratacionom sloju molekula žučne kiseline, tj. okso derivati žučnih kiselina su manje hidrofobni od njihovih OH analoga. Ovo odstupanje okso derivata žučnih kiselina iz kongenerične grupe okso derivata holne kiseline se može objasniti postojanjem vodoničnih veza između gradivnih jedinica micelle. Kod primarnih micela u fjordu („pukotina“ na površini micelle na mestu „spajanja“ žučnih kiselina preko β strana steroidnog nukleusa) molekul vode (ili 2 do 3 molekula vode) može graditi vodoničnu vezu sa okso grupom jednog i sa okso grupom drugog molekula žučne kiseline, što onda dodatno stabilizuje micelu i to utoliko više ukoliko ima više okso grupa [27,28,40]. Stabilizacija pomoću vodoničnih veza u fjordu moguća je samo ukoliko molekul žučne kiseline ima okso grupu (ili ekvatorijalnu OH grupu), međutim jači dipol keto grupe verovatno učestvuje u pravilnoj orijentaciji molekula vode u fjordu koja je orijentisana ka \hat{a} strani steroidnog jezgra, što onda rezultuje njenu sternu lokalizaciju prema fjordu (pukotini). Ukoliko je za steroidni skelet vezana \hat{a} aksijalna OH grupa, onda iz sternih (prostornih) razloga ne nastaje vodonična veza (OH grupe se ne nalaze u fjordu). Postojanje fjordova i mogućnost građenja vodoničnih veza u njemu ima naročit značaj kod mešovitih miceli okso derivata [40,41]. Što više vodoničnih veza postoji u fjordovima, iako je jezgro micelle hidrofobno (sama micela jeste stabilnija), to je prihvatanje hidrofobnog molekula gosta teže [13,40].

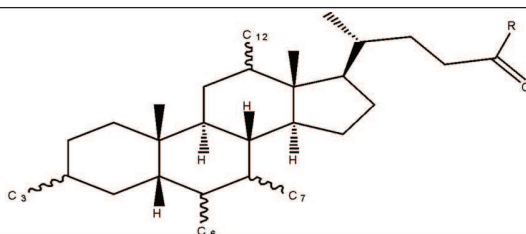
CILJ RADA

Cilj rada je ispitivanje hidrofobnosti unutrašnjeg domena micela žučnih kiselina pomoću solubilizacije probnim molekulom, fenobarbitonom, koji ima tendenciju ulaska u hidrofobnu sredinu zbog slabe rastvorljivosti u vodi i prisustva fenilnog prstena.

MATERIJAL I METODE

Ispitivane žučne kiseline

Deoksiholna kiselina(1); holna kiselina(2); hiolna kiselina(3); 7-okso deoksiholna kiselina(4); 12-okso henodeoksiholna kiselina(5); 12 α -hidroksi-3,7-dioksoholanska kiselina(6); 7,12-dioksolitoholna kiselina(7); 7 α -hidroksi-3,12-dioksoholanska kiselina(8); 3,7,12-trioksoholanska kiselina(9) (dehidroholna kiselina).



Žučne kiseline	supstituenti				
	C ₃	C ₆	C ₇	C ₁₂	R
deoksiholna kiselina (1)	α -OH			α -OH	OH
holna kiselina (2)	α -OH		α -OH	α -OH	OH
hiolna kiselina (3)	α -OH	α -OH	α -OH		OH
7-oksodeoksiholna kiselina (4)	α -OH		=O	α -OH	OH
12-oksohenodeoksiholna kiselina (5)	α -OH		α -OH	=O	OH
12 α -hidroksi-3,7-dioksoholanska kiselina (6)	=O		=O	α -OH	OH
7,12-dioksolitoholna kiselina (7)	α -OH		=O	=O	OH
7 α -hidroksi-3,12-dioksoholanska kiselina (8)	=O		α -OH	=O	OH
3,7,12-trioksoholanska kiselina (dehidroholna kiselina)(9)	=O		=O	=O	OH

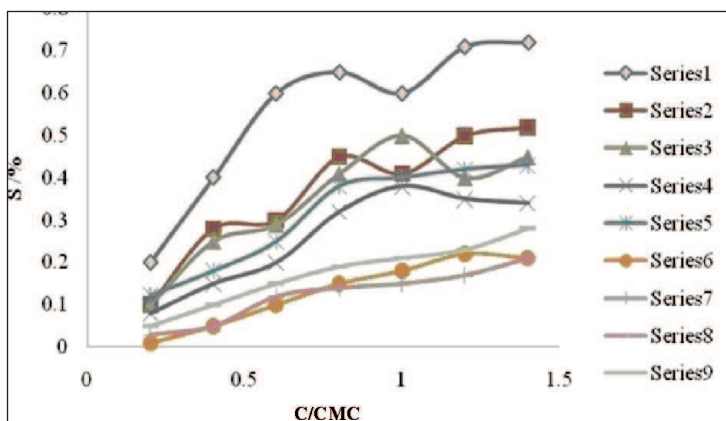
Slika (1). Ispitivane žučne kiseline

Molekul fenobarbitona kao probni molekul

Pored bromida, fenobarbiton spada u najstarije antiepileptičke lekove. Osnovne elemente njegove strukture čine heterociklični prsten sa laktamskim okso grupama i fenilna grupa. Molekul fenobarbitona ima hidrofobna svojstva i u ovom radu se koristi kao probni molekul, čijom se inkorporacijom (tj. solubilizacijom) u micelle žučnih kiselina može odrediti i hidrofobnost njihovog unutrašnjeg domena.

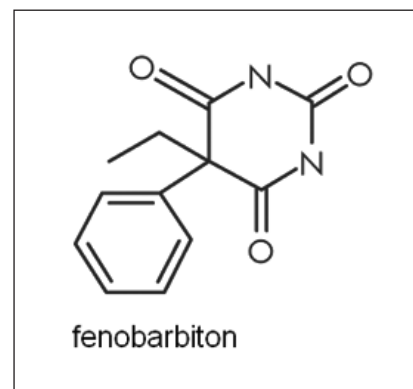
Postupak solubilizacije

Rastvori soli ispitivanih žučnih kiselina pripremani su u koncentracijama 0.2CMC, 0.4 CMC, 0.6 CMC, 0.8 CMC, 1 CMC, 1.2 CMC i 1.4 CMC za svaku pojedinačnu žučnu kiselinu.



Slika (3). Rezultati: solubilizacija probnog molekula (fenobarbiton) sa natrijumovim solima žučnih kiselina

Po 2 mL od svakog rastvora odmereno je u čaše kao i po 12 mg fenobarbitona. Ravnomernim mešanjem uz pomoć magnetne mešalice tokom 4h omogućena je solubilizacija fenobarbitona u micelle odgovarajuće žučne kiseline. Izvršeno je filtriranje rastvora. Koncentracija fenobarbitona je određivana visokoeфикаsnom tečnom hromatografijom prema validiranoj metodi [42]. Podaci su obrađivani u programskom paketu Statistica 7.



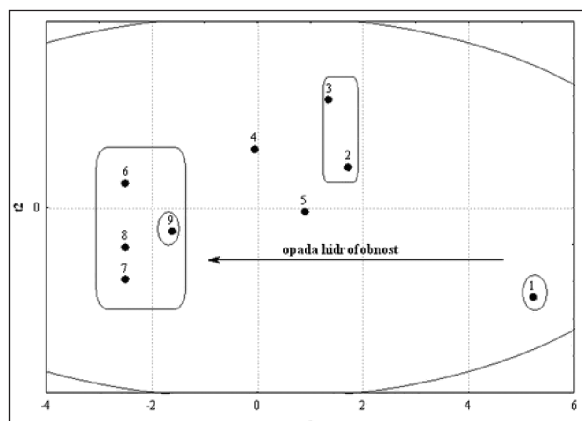
Slika (2). Molekul fenobarbitona

Reverzno fazna visoko efikasna tečna hromatografija (RP HPLC)

Korišćen je Agilentov HPLC sistem, serije 1100 sa degaserom, binarnom pumpom, automatskim injektorom, DAD detektorom i softver sistemom za analizu podataka AgilentChem Station. Analiza je izvršena na C-18 koloni Eclipse Plus C18 (250 mm x 3 mm, 5 um, 250 A°), Zorbax SD. Mobilna faza je bila smeša 0,01M fosfatnog pufera i metanola u odnosu 70: 130 (v/v) održavana na pH 7 sa injekcionim od 10 μ L. Detekcija je vršena na 210 nm.

REZULTATI

Na Slici 3. je predstavljen efekat solubilizacije fenobarbitona (probni molekul) pomoću natrijumovih soli ispitivanih žučnih kiselina (Slika 3.). Na apscisi su predstavljene koncentracije soli žučnih kiselina u odnosu na vrednost njihove kritične micelarne koncentracije a na ordinati procenat izvršene solubilizacije.



Slika (4). Grupisanje žučnih kiselina u ravni glavnih komponenti

Primenom metode glavnih komponenti [43] na matricu solubilizacije fenobarbitona moguće je 7 različitih normalizovanih koncentracija (normalizovanih sa CMC vrednostima) žučnih soli predstaviti u 2D prostoru pomoću vrednosti glavnih komponenti (t , *score*) i pomoću kojeg se može odrediti međusobna sličnost ispitivanih natrijumovih soli žučnih kiselina [44]. (Slika 4.)

DISKUSIJA

Na osnovu dobijenih rezultata može se videti da do solubilizacije probnog molekula dolazi i ispod kritične micelarne koncentracije (CMC) svakog anjona žučne kiseline tj. u submicelarnoj oblasti, što znači da nastaju stabilne mešovite micelle koji onda imaju efekat snižavanja kritične micelarne koncentracije.

Kako molekul fenobarbitona u svojoj strukturi ima fenilnu grupu i heterociklični prsten sa laktamskim okso grupama, u hidrofobni domen micelle moguć je ili ulazak fenilne grupe ili heterocikličnog prstena. Ukoliko bi se u hidrofobni domen micelle inkorporirao heterociklični prsten fenobarbitona, onda bi posredstvom molekula vode došlo do formiranja vodoničnih mostova u fjordovima micelle između laktamskih okso grupa i OH/okso grupa gradivnih jedinica. Hiolna kiselina sa C₆ α ekvatorijalnom grupom pokazivala bi najizraženiji efekat u solubilizaciji posmatranog probnog molekula. Međutim efekat solubilizacije opada sa porastom supstituisanih OH grupa sa okso grupama, a najefektivnija žučna so u solubilizaciji fenobarbitona je natrijum deoksiholat, čiji je steroidni skelet ujedno i najhidrofobniji

između ispitivanih žučnih kiselina. Ovu upućuje na zaključak da se fenilna grupa fenobarbitona inkorporira u hidrofobni domen micelle, to jest da fenobarbiton može da posluži kao indikator hidrofobnosti unutrašnjeg domena micela.

U ravni glavnih komponenti vidi se da žučne kiseline se grupišu po okso grupama u steroidnom jezgru. Naime, supstitucijom OH grupa sa okso grupama položaj kiseonika se pomera ka srednjoj ravni steroidnog jezgra, što onda omogućuje stabilizaciju molekula voda iz hidratacionog sloja i sa β strane steroidnog skeleta, što znači da se smanjuje težnja ka samoasocijaciji anjona žučne kiseline, odnosno smanjuje se hidrofobni domen micelle, pa samim tim i njena sposobnost ka inkorporaciji fenilne grupe probnog molekula.

ZAKLJUČAK

Fenobarbiton se inkorporiše sa fenilnom grupom u hidrofobni domen micelle. Povećanjem broja okso grupa opada hidrofobni domen micelle, pa samim tim i sposobnost ka primanju hidrofobnog gosta.

ZAHVALNICA

Rad je realizovan zahvaljujući sredstvima koja je dodelio Pokrajinski sekretarijat za nauku i tehnološki razvoj u okviru projekta broj 114-451-2113/2011-02.

Abstract

Bile acids' properties and interactions with drugs are determined with the structure of 5 β cholanic acid that possesses convex α surface that is unpolar, and concave β surface that is polar. Bile acids form aggregates known as micelles, important for formulation of nanopreparations. The goal of the paper is to examine the hydrophobicity of the inner domain of bile acid micelle by solubilization of the probe molecule, phenobarbitone, which tends to enter the hydrophobic environment. Concentrations of phenobarbitone were determined using validated high pressure liquid chromatography method. The effect of solubilisation decreases with the increasing in the number of hydroxyl groups being substituted with oxo groups. The most effective bile salt in solubilization of phenobarbitone is sodium deoxycholate, whose steroid form is also the most hydrophobic one. Phenyl groups of the phenobarbitone get incorporated in the hydrophobic domains of micelles. Increase in the number of oxo group decreases the hydrophobic domain of micelles, and thus their ability to host a hydrophobic agent.

LITERATURA

[1] Calabresi, M.; Andreozzi, P.; La Mesa, C. Supra-molecular association and polymorphic behaviour in systems containing bile acid salts. *Molecules*, 2007, 12(8), 1731-1754.

[2] Dopico, M.A.; Walsh, V.J.; Singer, J. Natural bile acids and synthetic analogues modulate large conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BKCa) channel activity in smooth muscle cells. *J. Gen. Physiol.*, 2002, 119, 251-273.

[3] Chiang, J.Y. Bile acid regulation of hepatic physiology III. Bile acids and nuclear receptors. *Am. J. Physiol.*, 2003, 284, G349-G356.

[4] Rao, P.Y.; Stravitz, T.R.; Vlahcevic, R.Z.; Curley, C.E.; Sando, J.J.; Hylemon, B.P. Activation of protein kinase C alpha and delta by bile acids: correlation with bile acids

structure and diacylglycerol formation. *J. Lipid Res.*, 1997, 38, 2446-2454.

[5] Thomas, C.; Pellicciari, R.; Pruzanski, M.; Auwerx, J.; Schoonjans, K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nature Rev. Drug Discov.*, 2008, 7, 678-693.

[6] Mikov, M.; Fawcett, J.P. *Bile Acids*, 1st ed.; Medisheet Publisher: Geneva, 2007.

[7] Hofmann, F.A.; Roda, A. Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: an overview of the problem. *J. Lipid Res.*, 1984, 25, 1477-1489.

[8] Armstrong, J.M.; Carey, C.M. The hydrophobic-hydrophilic balance of bile salts. Inverse correlation between reverse-phase high performance liquid chromatographic mobilities and micellar cholesterol-solubilizing capacities. *J. Lipid Res.*, 1982, 23, 70-80.

[9] Roda, A.; Minutello, A.; Angellotti, M.A.; Fini, A. Bile acid structure-activity relationships: evaluation of bile acids lipophilicity using 1-octanol/water partition coefficient and reverse phase HPLC. *J. Lipid Res.*, 1990, 31, 1433-1443.

[10] Heuman, M.D. Quantitative estimation of the hydrophilic-hydrophobic balance of mixed bile salt solutions. *J. Lipid Res.*, 1989, 30, 719-730.

[11] Poša, M.; Kuhajda, K. Hydrophobicity and haemolytic potential of oxo derivatives of cholic, deoxycholic and chenodeoxycholic acids. *Steroids*, 2010, 75(6), 424-431.

[12] Garidel, P.; Hildebrand, A.; Knauf, K.; Blume, A. Membranolytic activity of bile salts: influence of biological membrane properties and composition. *Molecules*, 2007, 12(10), 2292-2326.

- [13] Poša, M.; Farkaš, Z. Cholesterol solubilization by oxo derivatives of selected bile acids and their osmotic resistance. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 2010, 75(8), 767-784.
- [14] Mikov, M.; Kevrešan, S.; Kuhajda, K.; Jakovljević, V.; Vasović, V. 3 α ,7 α -dihydroxy-12-oxo-5 α -cholanoate as blood-brain barrier permeator. *Pol. J. Pharmacol.*, 2004, 56, 367-371.
- [15] Yang, L.; Zhang, H.; Mikov, M.; Tucker, I.G. Physicochemical and biological characterization of monoketocholic acid, a novel permeability enhancer. *Molecular Pharmaceutics*, 2009, 6(2), 448-456.
- [16] Al-Salami, H.; Butt, G.; Tucker, I.G.; Mikov, M. Influence of the semisynthetic bile acid MKC on the ileal permeation of gliclazide in vitro in healthy and diabetic rats treated with probiotics. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 2008, 30(2), 107-113.
- [17] Poša, M.; Kevrešan, S.; Mikov, M.; Ćirin-Novta, V.; Kuhajda, K. Effect of cholic acid and its keto derivatives on the analgesic action of lidocaine and associated biochemical parameters in rats. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.*, 2007, 32, 109-117.
- [18] Kuhajda, I.; Poša, M.; Jakovljević, V.; Ivetić, V.; Mikov, M. Effect of 12-monoketocholic acid on modulation of the analgesic action of morphine and tramadol. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.*, 2009, 34, 73-78.
- [19] Vasović, V.; Vukmirović, S.; Poša, M.; Mikov, M.; Rašković, A.; Jakovljević, V. Effect of rat pretreatment with aqueous solution of stevioside and bile acids on the action of certain cardioactive drugs. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.*, 2006, 31, 311-314.
- [20] Rašković, A.; Mikov, M.; Škrbić, R.; Jakovljević, V.; Vasović, V.; Poša, M.; Kuhajda, K.; Kevrešan, S.; Tomić, Z.; Siladji, Dj. Effect of stevioside and sodium salt of monoketocholic acid on glycemia in normoglycemic and diabetic rats. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.*, 2008, 33, 17-22.
- [21] Poša, M.; Kuhajda, K. Influence of bile acids on the adsorption of lidocaine and verapamil in an in vitro experiment. *J. Serb. Chem. Soc.*, 2010, 75(4), 433-440.
- [22] Kuhajda, K.; Kandrac, J.; Kevrešan, S.; Mikov, M.; Fawcett, J.P. Structure and origin of bile acids: An overview. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.*, 2006, 31, 135-143.
- [23] Kevrešan, S.; Kuhajda, K.; Kandrac, J.; Fawcett, J.P.; Mikov, M. Biosynthesis of bile acids in mammalian liver. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.*, 2006, 31, 145-156.
- [24] Kuhajda, K.; Kevrešan, S.; Kandrac, J.; Fawcett, J.P.; Mikov, M. Chemical and metabolic transformations of selected bile acids. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.*, 2006, 31, 179-235.
- [25] Camile, W. *The Practice of Medicinal Chemistry*, 2nd ed.; Academic Press: Oxford, 2003.
- [26] Poša, M.; Pilipović, A.; Lalić, M.; Popović J. Hydrophobicity and retention coefficient of selected bile acid oxo derivatives. *Acta Chim. Slov.*, 2010, 57(4), 828-835.
- [27] Poša, M.; Kevrešan, S.; Mikov, M.; Ćirin-Novta, V.; Kuhajda, K. Critical micellar concentrations of keto derivatives of selected bile acids: Thermodynamic functions of micelle formation. *Colloids Surf. Biointerf.*, 2008, 64, 151-161.
- [28] Poša, M.; Pilipović, A.; Lalić, M. The influence of NaCl on hydrophobicity of selected, pharmacologically active bile acids expressed with chromatographic retention index and critical micellar concentration. *Colloids Surf. Biointerf.*, 2010, 81, 336-343.
- [29] Natalini, B.; Sardella, R.; Camaioni, E.; Gioiello, A.; Pellicciari, R. Correlation between CMC and chromatographic index: simple and effective evaluation of the hydrophobic/hydrophilic balance of bile acids. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 388, 1681-1688.
- [30] Natalini, B.; Sardella, R.; Camaioni, E.; Macchiarulo, A.; Gioiello, A.; Carbone, G.; Pellicciari, R. Derived chromatographic indices as effective tools to study the self-aggregation process of bile acids. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2009, 50, 613-621.
- [31] Poša, M. QSPR study of the effect of steroidal hydroxy and oxo substituents on the critical micellar concentrations of bile acids. *Steroids*, 2011, 76(1-2), 85-93.
- [32] Poša, M.; Guzsavány, V.; Csanádi, J. Determination of critical micellar concentration of two monoketo derivatives of cholic acid. *Colloids Surf. Biointerf.*, 2009, 74, 84-90.
- [33] Madenci, D.; Egelhaaf, U.S. Self-assembly in aqueous bile salt solutions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2010, 15, 109-115.
- [34] Mukerjee, P.; Mysels, K.J. Critical micelle concentration of aqueous surfactant systems, NSR-DS, NBS: Washington-DC, 1971.
- [35] Shinoda, K.; Hutchinson, E. Pseudo-phase separation model for thermodynamic calculations on micellar solutions. *J. Phys. Chem.*, 1958, 62, 577-582.
- [36] Small, D.M. In: *The bile acids*; Nair, P.P.; Kritchevsky, D.; Eds.; Plenum Press: New York, 1977; Vol. 1, pp. 249-356.
- [37] Kratochvíl, J.P. Size of bile salts micelles: techniques, problems and results. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 1986, 26, 131-154.
- [38] Bouchemala, K.; Agnelya, F.; Koffib, A.; Djabourov, M.; Ponchela, G. What can isothermal titration microcalorimetry experiments tell us about the self-organization of surfactants into micelles? *J. Mol. Recognit.*, 2010, 23, 335-342.
- [39] Poša, M.; Kevrešan, S.; Mikov, M.; Ćirin-Novta, V.; Sarbu, C.; Kuhajda, K. Determination of critical micellar concentration of cholic acid and its keto derivatives. *Colloids Surf. Biointerf.*, 2007, 59, 179-163.
- [40] Poša, M.; Tepavčević, V. Mixed micelles of 7,12-dioxolithocholic acid and selected hydrophobic bile acids: interaction parameter, partition coefficient of nitrazepam and mixed micelles haemolytic potential. *Colloids Surf. Biointerf.*, 2011, 86, 285-291.
- [41] Ćirin, D.; Poša, M.; Krstonošić, V. Interactions between selected bile salts and Triton X-100 or sodium lauryl ether sulfate. *Chemistry Centar Journal*, 2011, 5:89.
- [42] Reif VD, Kaufmann KL, DeAngelis NJ, et al. Liquid chromatographic assays for barbiturate injections. *J Pharm Sci.* 1986;75: 714-6.
- [43] Poša M. Osnovne metode u hemometriji, Medicinski fakultet, Novi Sad, 2010.
- [44] Poša M. Fizičko-hemijske osobine žučnih kiselina sa osvrtom na oksido-derivat 5 α -holanske kiseline. Medicinski fakultet, Novi Sad, 2011.