

UDK 615 (497.11)

ISSN 0004-1963 (Štampano izd.)  
ISSN 2217-8767 (Online)

# ARHIV ZA FARMACIJU

Godina 65

Broj 2

Beograd, 2015.

ČASOPIS SAVEZA  
FARMACEUTSKIH  
UDRUŽENJA SRBIJE

2/2015

**SADRŽAJ – CONTENTS**

**Pregledni radovi – Review articles**

- **Slavica Erić, Marko Kalinić** 89

**Računarski modeli za predviđanje transporta lekova posredovanog P-glikoproteinom**

**Computational models for predicting drug transport mediated by P-glycoprotein**

**Originalni naučni radovi – Original scientific papers**

- **Branko Pavlović, Jovana Milosavljević, Aleksandra Zeljković,  
Jelena Vekić, Jelena Joksić, Miron Sopić, Vesna Spasojević-Kalimanovska,  
Dušan Paripović, Amira Peco-Antić, Gordana Miloševski-Lomić,  
Zorana Jelić-Ivanović** 115

**Rezistin, inflamacija i dislipidemija kod gojazne dece i adolescenata**

**Resistin, inflammation and dyslipidemia in obese children and adolescents**

**Stručni radovi – Professional papers**

- **Gorana Veinović, Zorica Stojić Vukanić, Jelena Antić-Stanković** 129

**Lajmska borelioza: epidemiologija, klinička slika i terapija**

**Lyme borreliosis - epidemiology, clinical manifestations and treatment**

**Prilozi – Contributions**

- **Izveštaj sa međunarodne konferencije  
„Da li smo spremni za biosimilare”, Beograd, Srbija** 147

- **Izveštaj sa 1<sup>st</sup> European Conference on Pharmaceutics – Drug Delivery,  
Rens, Francuska** 152

## Računarski modeli za predviđanje transporta lekova posredovanog P-glikoproteinom

Slavica Erić<sup>1,\*</sup>, Marko Kalinić<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku hemiju,  
Vojvode Stepe 450, 11000 Beograd, Srbija

\* autor za korespondenciju: [seric@pharmacy.bg.ac.rs](mailto:seric@pharmacy.bg.ac.rs)

telefon: +381 11 3951 355, fax: +381 11 3972 840

---

### Kratak sadržaj

P-glikoprotein (Pgp) je transmembranski transporter koji, transportujući strukturno raznovrsne lekove iz unutrašnjosti ćelije u ekstracelularnu sredinu, može uticati na resorpciju, distribuciju i efikasnost većeg broja lekova. Prekomerna ekspresija Pgp-a u ćelijama predstavlja jedan od mehanizama razvoja rezistencije na lekove. Iz ovih razloga, potrebno je u ranoj fazi otkrića leka predvideti da li je potencijalni lek supstrat za Pgp, idealno i pre same sinteze. U tu svrhu, tokom poslednje decenije razvijen je veliki broj računarskih modela koji omogućavaju predviđanje transporta posredstvom Pgp-a samo na osnovu hemijske strukture. U ovom radu prikazan je pregled različitih pristupa koji su korišćeni u razvoju modela, razmotrene su njihove prednosti i nedostaci, kao i faktori koji u najvećoj meri utiču na pouzdanost predviđanja. Polispecifičnost ovog transportera predstavlja značajan izazov za većinu metoda računarske hemije. Ipak, dostignut nivo tačnosti modela koji su prikazani u literaturi ukazuje na činjenicu da oni mogu doprineti racionalizaciji procesa dizajniranja novih lekova. Šira dostupnost eksperimentalnih podataka, kao i kombinovanje različitih pristupa modelovanju transporta, mogu dodatno unaprediti postojeće modele.

**Ključne reči:** P-glikoprotein, računarski modeli, rezistencija, dizajn lekova.

---

## 1. Uvod

P-glikoprotein (Pgp) je transmembranski protein koji funkcionalno predstavlja efluksni transporter sposoban za prenos strukturno raznovrsnih supstrata kroz ćelijsku membranu, iz unutrašnjosti ćelije u ekstracelularnu sredinu. Pgp pripada filogenetski veoma staroj grupi ABC<sup>1</sup> transportera koji posreduju u aktivnom transmembranskom transportu supstrata, uz utrošak energije oslobođene hidrolizom adenozin-trifosfata (ATP) [1]. U humanom genomu identifikovano je 49 gena koji kodiraju ABC transportere [2], ali je najbolje proučen i funkcionalno najznačajniji predstavnik ove grupe P-glikoprotein.

Ključna karakteristika ovog transportera, koja je doprinela njegovom otkriću, karakterizaciji i imenovanju (P od permeabilnost), jeste sposobnost Pgp-a da utiče na prolazak lekova kroz ćelijske membrane [3]. Tokom prethodne četiri decenije istraživanja, utvrđeno je da Pgp transportuje veliki broj klinički važnih lekova i da značajno može uticati na njihovu farmakokinetiku i efikasnost. Visoki nivoi ekspresije Pgp-a u enterocitima, na kanalikularnim površinama hepatocita i kapilarnom endotelu krvno-moždane barijere, sugerisu da je Pgp važna komponenta odbrane tkiva od ksenobiotika. Ova fiziološka funkcija Pgp-a može biti odgovorna za nisku bioraspoloživost lekova, njihovu ograničenu distribuciju u određena tkiva, a može predstavljati i molekularnu osnovu interakcije između lekova [4–7]. Sa aspekta efikasnosti lekova, prekomerna ekspresija Pgp-a u maligno transformisanim ćelijama predstavlja jedan od značajnih mehanizama razvoja rezistencije na antitumorske lekove i formiranja multirezistentnog (engl. *multiple drug resistant*, MDR) fenotipa tumorskih ćelija [8–10].

Prepoznavanje uticaja Pgp-a na farmakokinetiku lekova i njegovog značaja u razvoju rezistencije na antineoplastike ukazalo je na neophodnost razmatranja transporta lekova-kandidata posredstvom Pgp-a već u ranim fazama otkrića i razvoja [11]. Regulatorne agencije u Americi i Evropi zahtevaju karakterizaciju interakcije novih lekova sa nizom membranskih transportera, kao i ispitivanje uticaja afiniteta za transportere na eventualne interakcije između lekova [12]. Podložnost transportu od strane Pgp-a posebno je značajno uzeti u obzir u okviru programa otkrića novih antitumorskih jedinjenja. Danas je dostupan veći broj racionalno dizajniranih, selektivnih inhibitora Pgp-a [13], za koje se očekivalo da će, u kombinovanoj terapiji, doprineti lečenju kancera sa MDR fenotipom kroz povećanje efikasnosti dostupnih antitumorskih lekova koji su supstrati za ovaj transporter. Međutim, u kliničkim ispitivanjima ovi lekovi se za sada nisu pokazali kao uspešni [14,15]. Stoga je, paralelno sa istraživanjem alternativnih pristupa prevazilaženju rezistencije [16], u okviru dizajna

novih antitumorskih lekova potrebno težiti ka minimizaciji rizika da novi lek bude supstrat za Pgp [17].

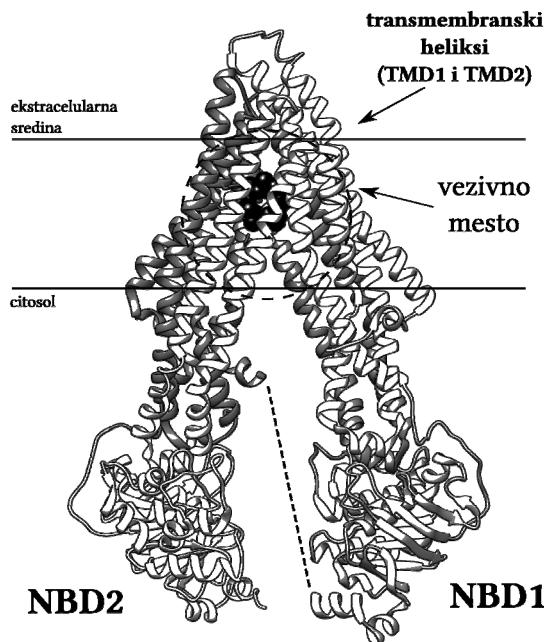
S obzirom da su strukturne modifikacije leka-kandidata u fazi razvoja leka materijalno i vremenski veoma skupe, određivanje mogućnosti interakcije sa Pgp-om treba izvršiti u ranim fazama otkrića potencijalnih kandidata [18]. Iako su razvijeni pristupi koji omogućavaju pouzdanu i brzu *in vitro* karakterizaciju interakcije novosintetisanih jedinjenja sa Pgp-om [19,20], računarski prediktivni modeli imaju tu prednost što ne zahtevaju dostupnost sintetisane supstance. Kao takvi, pouzdani računarski modeli za predviđanje transporta P-glikoproteinom mogu se efikasno integrisati u savremene protokole dizajniranja molekula primenom računarskih metoda [21]. Njihova predviđanja mogu doprineti eliminaciji delova kolekcije virtuelnih struktura i predstavljati osnovu za izbor određenih jedinjenja koja bi prioritetsno bila biološki testirana u cilju evaluacije interakcije sa Pgp-om. Interpretacija uspostavljenih i validiranih modela takođe može pružiti racionalnu osnovu za modifikacije strukture u cilju smanjenja njihovog afiniteta za Pgp. Na taj način, komplementarno sa *in vitro* metodama testiranja, *in silico* modeli imaju značajan potencijal u racionalizaciji procesa otkrića novih lekova kroz brzu selekciju jedinjenja sa optimalnim karakteristikama [22–24].

Ovaj članak predstavlja pregled istraživanja u oblasti razvoja računarskih modela za predviđanje transporta Pgp-om, objavljenih u poslednjih 10 godina. Cilj ovog rada je da istakne najznačajnije faktore koji utiču na pouzdanost razvijenih modela i pruži osrt na prednosti i nedostatke različitih pristupa modelovanju interakcije lekova i Pgp-a. U tom smislu, razmatrani su aspekti primenljivosti modela u racionalnom dizajniranju novih lekova, ograničenja postojećih modela i mogućnosti za dalje unapređenje njihove pouzdanosti.

## 2. Supstratna polispecifičnost Pgp-a kao izazov u uspostavljanju računarskih modela

Humani P-glikoprotein sadrži približno 1.280 aminokiselina, čija je strukturalna organizacija slična svim transporterima ABC familije. Kristalna struktura humanog Pgp-a nije dostupna, ali je 2009. godine rešena kristalna struktura mišjeg Pgp-a [25,26], koja predstavlja prvu strukturu ABC transportera eukariota rezolucije ispod 4 Å. Kako humani i mišji Pgp odlikuje sličnost sekvenci od 87%, ova kristalna struktura pružila je jasan uvid u njegovu strukturalnu organizaciju (Slika 1). Pgp je organizovan u 4 domena: svaki od dva transmembranska domena (TMD) čini 6 transmembranskih heliksa, dok se sa citoplazmatske strane nalaze dva nukleotid-vezujuća domena (engl. *nucleotide-binding domains*, NBD), koja vezuju ATP i igraju ključnu ulogu u prevodenju hemijske energije u pokrete proteina, neophodne za translokaciju supstrata. Supstrati se vezuju u prostranu unutrašnju šupljinu Pgp-a, koju formiraju dva TMD. Vezivna šupljina

locirana je u ravni lipidnog dvosloja i ima zapreminu od približno  $6.000 \text{ \AA}^3$ . U zatvorenoj konformaciji proteina, vezivna šupljina otvorena je ka unutrašnjosti ćelije.



**Slika 1. Struktura mišjeg P-glikoproteina (PDB ID: 4M2T), sa prepostavljenim položajem u ćelijskoj membrani.**

**Figure 1. Structure of murine P-glycoprotein (PDB ID: 4M2T), with its putative localization in the cell membrane.**

Prepostavljeni mehanizam kojim Pgp transportuje supstrate obuhvata nekoliko koraka [27]. U prvom koraku neophodno je da supstrat pređe u unutrašnju stranu lipidnog dvosloja membrane, gde može doći do njegovog prepoznavanja od strane Pgp-a. U sledećem koraku, transporter preuzima supstrat nedovoljno definisanim putem, nakon čega se upostavljuju interakcije supstrata sa aminokiselinama unutrašnje šupljine Pgp-a. Važnu ulogu u prepoznavanju supstrata mogu imati i konstituenti ćelijske membrane, odnosno složene interakcije između lipida membrane, supstrata i transportera [28,29]. Da bi nakon vezivanja supstrata došlo do transporta, neophodno je da svaki NBD veže po jedan molekul ATP-a, što pokreće konformacionu promenu kojom Pgp prelazi iz konformacije otvorene ka unutrašnjosti ćelije u konformaciju u kojoj je unutrašnja šupljina otvorena ka ekstracelularnoj sredini i omogućava disocijaciju supstrata.

Iako Pgp može da transportuje struktorno raznovrsna jedinjenja, važno je naglasiti da interakcija supstrata i transporter-a nije nespecifična, već polispecifična, na šta ukazuju brojne studije u kojima su prikazane varijacije od nekoliko redova veličine u afinitetu različitih supstrata za Pgp [30]. Prostranost unutrašnje šupljine ukazuje na mogućnost postojanja većeg broja vezivnih mesta; postoje eksperimentalni dokazi da Pgp istovremeno može da veže dva različita supstrata [31]. Tačan broj vezivnih mesta na transporteru nije jasno definisan: u različitim studijama sugerisano je postojanje od 2 do 7 različitih vezivnih mesta, koja međusobno stupaju u složene alosterne interakcije [32–35]. Po savremenim tumačenjima, Pgp ne poseduje jasno definisana, prostorno razdvojena vezivna mesta, već jednu prilagodljivu vezivnu regiju sa oblastima za koje pojedini supstrati pokazuju izražen afinitet [36,37]. Novije biohemijske studije, kao i simulacije molekularne dinamike, ukazuju da u supstratnoj polispecifičnosti Pgp-a ključnu ulogu ima i izražena fleksibilnost transporter-a [38].

Analiza fizičko-hemijskih karakteristika poznatih Pgp supstrata ne ukazuje na postojanje jasnog profila tipičnog jedinjenja koje Pgp transportuje. Do danas okarakterisani supstrati su većinom relativno velike organske molekule, aromatičnog karaktera, sa baznim centrima i pozitivnim naelektrisanjem pri fiziološkoj pH. Ipak, u Pgp supstrate ubrajaju se i molekule čije mase variraju od 200 do 1.900 Da, koje imaju amfifilnu prirodu, acikličan karakter, alifatične molekule, kao i jedinjenja sa negativnim naelektrisanjem pri fiziološkoj pH, iako je njihov transport manje efikasan [39].

Skup saznanja o strukturi vezivnog mesta Pgp-a, prepostavljenom mehanizmu transporta i raznovrsnosti supstrata ukazuju na nekoliko ključnih izazova koje je potrebno uzeti u obzir prilikom razvoja modela za predviđanje interakcije sa ovim transporterom. Prvo, transport ne zavisi samo od interakcije jedinjenja sa Pgp-om. Važna komponenta transporta jeste pasivna raspodela supstrata u lipidnom dvosloju: jedinjenja sa visokom pasivnom permeabilnošću mogu da prezasite transportni kapacitet Pgp-a, dok jedinjenja koja se kratko zadržavaju u membrani imaju manju verovatnoću da budu preuzeta od strane transporter-a. Efektivno, to znači da izostanak transporta u *in vitro* testu ne znači nužno da dato jedinjenje ne može da stupa u interakciju sa Pgp-om na molekulskom nivou. Nadalje, za razliku od modeliranja odnosa strukture i aktivnosti jedinjenja koja se vezuju za isto vezivno mesto, Pgp ne poseduje jedno, već veći broj slabo definisanih vezivnih mesta. Konačno, visok stepen fleksibilnosti proteina, prilagodljivost različitim supstratima i alosterne komunikacije između vezivnih mesta uslovjavaju činjenicu da jedna, statična struktura Pgp-a ima ograničenu primenljivost u predviđanju interakcije različitih jedinjenja sa transporterom. U cilju prevazilaženja ovih izazova, korišćeni su različiti pristupi u procesu razvoja modela: uspostavljanje više modela koji se objedinjuju u ansambl, primena nelinearnih regresionih metoda, integrisanje fleksibilnosti proteina u predviđanje interakcije sa supstratima, i drugi pristupi koji će detaljnije biti opisani u odeljcima 4–6.

### **3. Priprema setova podataka u razvoju računarskih modela**

Prvi korak u razvoju računarskih modela za predviđanje transporta Pgp-om jeste prikupljanje podataka o supstratima i nesupstratima ovog transporter-a. Različite metode eksperimentalne karakterizacije transporta, međutim, pružaju različitu prirodu informacije o tačnom vidu interakcije datog jedinjenja i Pgp-a. Testovi koji su najčešće opisani u literaturi mogu se podeliti u [40]: testove transcelularnog transporta, testove akumulacije ili efluksa, testove stimulacije ATP-azne aktivnosti i *in vivo* testove na *knockout* životinjama. Važno je imati u vidu da nijedan od ovih testova ponaosob ne pruža nedvosmislen dokaz aktivnog transporta jedinjenja od strane Pgp-a. Primera radi, u slučaju supstrata visoke pasivne permeabilnosti, test transcelularnog transporta može dati lažno negativan rezultat, posebno pri višim koncentracijama ispitivanog jedinjenja [41,42]. S druge strane, većina supstrata daće pozitivan rezultat testa stimulacije ATP-azne aktivnosti, ali pozitivan rezultat ovog testa daju i pojedini inhibitori Pgp-a [43], dok drugi supstrati u visokim koncentracijama inhibiraju ATP-aznu aktivnost [44]. Zbog toga je za definitivnu karakterizaciju interakcije jedinjenja sa Pgp-om najčešće neophodno upotrebiti više komplementarnih testova [45].

U kontekstu različite pouzdanosti klasifikacije jedinjenja u zavisnosti od tipa eksperimentalnih podataka, nekoliko autora predložilo je kriterijume koji omogućavaju uniformnu procenu nivoa dokaza koje dostupni podaci pružaju [19,40,46]. Usvajanje takvih kriterijuma prilikom prikupljanja eksperimentalnih podataka iz literature posebno je važno usled činjenice da postoji veliki broj primera jedinjenja koja su, primenom različitih testova, klasifikovana i kao supstrati i kao nesupstrati. U našim istraživanjima, usvajanje kriterijuma za procenu pouzdanosti dostupnih podataka omogućilo je formiranje setova visoke konzistentnosti [47]. Kao što je prikazano u Tabeli I, definisanjem hijerarhije pouzdanosti određenih testova moguće je izvršiti klasifikaciju jedinjenja na osnovu najvišeg dostupnog nivoa dokaza; u onim slučajevima kada su dostupni podaci suprotstavljeni, a odlikuje ih isti nivo pouzdanosti, dato jedinjenje se može isključiti iz seta u cilju izbegavanja eventualne greške. Takođe, u našem radu, samo nivo dokaza A i B (Tabela I) smatrani su adekvatnim za klasifikaciju jedinjenja kao supstrata.

**Tabela I** Primer kriterijuma za klasifikaciju pouzdanosti eksperimentalnih podataka o transportu jedinjenja P-glikoproteinom, prilagođen iz reference [47].

**Table I** Example of criteria used in evaluating the reliability of P-glycoprotein transport assay data, adapted from reference [47].

Nivo dokaza	Dostupni eksperimentalni podaci
A (najviši)	<p><i>Konsenzus rezultata:</i></p> <p>(1) <i>in vitro</i> studija transcelularnog transporta sprovedenih na transficiranim ćelijskim linijama i <i>in vivo</i> studija distribucije u transgenim životinjama bez i sa funkcionalnim P-gp; <i>ili</i></p> <p>(2) tri studije: <i>in vitro</i> studije transcelularnog transporta, stimulacije ATP-azne aktivnosti i testa akumulacije sa kalcein-AM probom</p>
B	<p>(1) jedna ili više <i>in vitro</i> studija transcelularnog transporta sprovedena na transficiranim ćelijskim linijama, uz netransfektovane ćelije kao kontrolu; <i>ili</i></p> <p>(2) konsenzus rezultata dve studije iz kategorije C, koje ne daju nivo dokaza A (npr. transport kroz Caco-2 ćelije i studija na transgenim miševima); <i>ili</i></p> <p>(3) konsenzus rezultata dva <i>in vitro</i> testa iz kategorije A-2</p>
C	<p>(1) polarizovan transport kroz ćelijske linije koje prekomerno eksprimiraju P-gp, ali i druge transportere (npr. Caco-2); <i>ili</i></p> <p>(2) stimulacija P-gp ATP-azne aktivnosti; <i>ili</i></p> <p>(3) <i>in vivo</i> studija distribucije u transgenim životinjama bez i sa funkcionalnim P-gp; <i>ili</i></p> <p>(4) studije akumulacije ili efluksa sprovedene korišćenjem membranskih vezikula sa eksprimiranim P-gp; <i>ili</i></p> <p>(5) studije rezistencije na citotoksične efekte na ćelijskim linijama MDR fenotipa.</p>
D (najniži)	Podaci iz preglednih i stručnih radova, gde originalne studije nisu navedene ili dostupne.

Dodatni faktori koje je potrebno uzeti u obzir prilikom formiranja seta podataka jesu hemijska raznovrsnost jedinjenja i relativna zastupljenost supstrata i nesupstrata. Najveći setovi korišćeni za uspostavljanje transportnih modela posredstvom Pgp-a uglavnom sadrže oko 300 jedinjenja [48], što je relativno mali broj koji ne obezbeđuje

potpunu pokrivenost hemijskog prostora od značaja za medicinsku hemiju. Kvalitet eksperimentalnih podataka i veličina seta često su suprotstavljeni faktori prilikom formiranja seta podataka; prvi faktor odlučujuće utiče na pouzdanost, ali je drugi faktor presudan za domen primenjivosti modela. Šire prihvatanje današnjih kriterijuma za potpunu karakterizaciju interakcije sa Pgp-om započelo je tek početkom ovog veka, pa je i literaturna dostupnost kvalitetnih podataka ograničena. U tom smislu, jedan od pristupa može biti i uspostavljanje modela koji su primenjivi u ograničenom delu hemijskog prostora (lokalni modeli) ali koji u okviru svog domena primenjivosti pokazuju značajnu pouzdanost [22].

Konačno, u literaturi su daleko prisutnije publikacije koje opisuju identifikaciju supstrata za Pgp, nego one koje dokumentuju karakterizaciju nesupstrata. Ova činjenica otežava formiranje setova u kojima je broj supstrata i nesupstrata uravnotežen, što je važan aspekt u razvoju klasifikacionih modela, jer setovi u kojima svaka od klase nije približno jednakoj zastupljena mogu dovesti do razvoja modela sa lošim prediktivnim karakteristikama [49].

#### **4. Modeli zasnovani na molekulskim deskriptorima**

Najveći broj u literaturi dostupnih modela za predviđanje transporta Pgp-om pripada grupi binarnih klasifikacionih modela, koji su uspostavljeni primenom molekulskih deskriptora i nelinearnih regresionih metoda. Kao što je prikazano u Tabeli II, ne postoji velika odstupanja u prosečnoj tačnosti predviđanja različitih modela, koja je u proseku 80-85%. Iako su pojedini autori pokazali da se različitim kombinacijama deskriptora i regresionih metoda uspostavljaju modeli značajno različitih performansi [50], retrospektivna analiza literaturnih modela ukazuje na to da se većinom prikazanih metodologija može postići slična tačnost predviđanja. Izuzetak jesu linearni modeli, koji se u slučaju klasifikacije Pgp supstrata veoma retko koriste.

**Tabela II** Pregled odabralih modela za predviđanje transporta P-glikoproteinom, uspostavljenih korišćenjem molekulskih deskriptora i različitim regresionim metodama.

**Table II** Overview of selected models for predicting transport by P-glycoprotein, based on the use of molecular descriptors and various regression methods.

Autori	Veličina seta <sup>a</sup>	Deskriptori finalnog modela	Regresioni metod <sup>b</sup>	Performanse na setu za testiranje <sup>c</sup>	Ref.
Xue et al. (2004)	116 S 85 NS	22 elektrotopološka deskriptora	SVM k-NN ANN DT	Se = 81,2% Sp = 79,2% Acc = 79,4%	[51]
de Cerqueira Lima et al. (2006)	108 S 87 NS	173 deskriptora atomskih parova	SVM k-NN DT binarni QSAR	Se = 78% Sp = 84% Acc = 81%	[52]
Cabrera et al. (2006)	113 S 90 NS	6 deskriptora topoloških podstruktura	MLR	Se = 82,73% Sp = 77,77% Acc = 80,5%	[53]
Huang et al. (2007)	113 S 90 NS	7 molekulskih deskriptora	PS-SVM MLR	Se = 100% Sp = 86% Acc = 93%	[54]
Demel et al. (2010)	343 S 1534 NS	11 molekulskih deskriptora	RuleFit model	Se = 81% Sp = 98%	[55]
Wang et al. (2011)	206 S 126 NS	23 molekulska deskriptora	SVM	Se = 96% Sp = 73% Acc = 88%	[56]
Broccatelli (2012)	110 S 77 NS	3 molekulska deskriptora	GA-RF k-NN SVM NB	Se = 80% Sp = 86% Acc = 84%	[57]
Levatić et al. (2013)	448 S 486 NS	183 2D deskriptora	SVM	Acc = 86%	[58]
Li et al. (2014)	423 S 399 NS	13 fizičko-hemijskih, 43 topološka deskriptora i ECFC_10 molekulski otisak prsta	NB	Se = 89,9% Sp = 74,7% Acc = 83,5%	[59]
Erić et al. (2014)	159 S 151 NS	24 molekulska deskriptora	ANN ansambl SVM ansambl	Se = 82% Sp = 82% Acc = 82%	[47]

**a** Korišćene skraćenice: S – supstrati, NS – nesupstrati;

**b** Ukoliko je u radu poređeno nekoliko regresionih metoda, podvučena je metoda koja je dala najbolje rezultate. Korišćene skraćenice: SVM – *support vector machines*, k-NN – metod najbližih suseda, ANN – veštačke neuronske mreže, DT – drva odluke, MLR – multipla linearna regresija; PS – algoritam jata čestica (engl. *particle swarm*), GA – genetski algoritam, RF – *random forest*, NB – naivni Bejesov klasifikator; **c** Statistički parametri predviđanja modela: Se – senzitivnost, Sp – specifičnost, Acc – tačnost.

Najuočljivije razlike između novijih i starijih modela jesu setovi korišćeni u njihovom razvoju. U tom kontekstu, primetan je trend u novijim publikacijama da se poseban akcenat stavlja na veličinu i raznovrsnost seta za uspostavljanje modela, kao i na konzistentnost eksperimentalnih podataka. U nekoliko skorijih publikacija opisani su setovi značajne veličine i raznovrsnosti. Demel i saradnici [55] iskoristili su podatke o citotoksičnosti eksperimentalnih jedinjenja jedne farmaceutske kompanije na ćelijskoj liniji koja prekomerno eksprimira Pgp, za kreiranje seta od 1877 jedinjenja. Levatić i saradnici [58] opisali su sličan pristup, korišćenjem podataka o citotoksičnosti na 60 različitim ćelijskim linija (NCI60) koje uniformno prikuplja američki Nacionalni institut za kancer, u okviru svog Programa razvoja lekova [60]. Obe grupe autora su prepostavile da u slučaju Pgp supstrata postoji inverzan odnos između osetljivosti ćelija na citotoksične efekte jedinjenja i nivoa ekspresije Pgp-a u datoj ćelijskoj liniji. Važan aspekt ovih setova jeste činjenica da pokazuju minimalno preklapanje sa postojećim setovima podataka i time doprinose istraživanju afiniteta jedinjenja za Pgp u okviru novog hemijskog prostora. Ipak, na konzistentnost seta uspostavljenog korišćenjem isključivo podataka o citotoksičnosti, u velikoj meri utiču pasivna permeabilnost jedinjenja, kao i potencijalno zanemareni drugi mehanizmi rezistencije na citotoksične efekte. Li i saradnici [59] primenili su drugi pristup, prikupljanjem podataka iz 517 publikacija za 822 jedinjenja; za razliku od kriterijuma pouzdanosti koje smo prethodno opisali u odeljku 3, koji podrazumeva i isključivanje jedinjenja sa suprotstavljenim podacima, autori su koristili konsenzus klasifikaciju, svrstavajući dato jedinjenje u klasu prema najvećem broju rezultata, nezavisno od njihove pouzdanosti.

Pored seta podataka koji je značajan faktor za preciznost predviđanja, složenost i interpretabilnost finalnih modela važne su karakteristike po kojima se dostupni modeli razlikuju. Uključivanjem većeg broja deskriptora u model moguće je, do određene granice, poboljšati njegove prediktivne karakteristike, ali korišćenje modela sa velikim brojem deskriptora otežava identifikaciju najznačajnijih strukturnih karakteristika, čija bi modifikacija mogla da doprinese smanjenju afiniteta jedinjenja za Pgp. Postoji nekoliko pristupa kojima se može poboljšati interpretabilnost modela razvijenih nelinearnim metodama. U našim ranijim istraživanjima pokazano je da implementacije inovativnih algoritama omogućavaju uvid u relativnu značajnost i prirodu uticaja odabranih molekulskih deskriptora na fenomen koji se modeluje [61]. Ovaj i slični

pristupi [62,63] značajno povećavaju primenljivost modela, jer pružaju medicinskom hemičaru smernice o najefektivnijim putevima modifikacije strukture.

Pregled deskriptora koji su korišćeni u dostupnim računarskim modelima za predviđanje transporta Pgp-om ukazuje na složenost odnosa između strukture supstrata i njihovog afiniteta za Pgp. Primetno je da su u većini modela značajni deskriptori veličine, lipofilnosti i oblika molekule. Primera radi, od 7 molekulskih deskriptora u modelu Huang-a i saradnika [54], 4 opisuju upravo ove karakteristike: molekularnu težinu (MW), izračunati particioni koeficijent oktanol-voda (ClogP), broj prstenova u strukturi (NR) i ukupnu polarnu površinu jedinjenja (TPSA). Drugu važnu grupu deskriptora koji su značajni u dostupnim modelima čine deskriptori koji opisuju brojnost i raspored donora i akceptora vodoničnih veza, kao i njihovu jačinu. Od preko 10 modela u radu Broccattelli-ja [57], u većini su najznačajniji bili DRDRDO i DRACDO deskriptori, koji opisuju dimenzije najvećeg trougla koji definišu dve hidrofobne farmakoforne tačke i jedan donor vodonične veze, odnosno jedna hidrofobna tačka, jedan donor i jedan akceptor vodonične veze. Ove činjenice ukazuju da model za predviđanje interakcije sa Pgp-om istovremeno mora da sadrži deskriptore koji opisuju sposobnost molekule da se preraspodeli i ostane u lipidnom dvosloju, kao i deskriptore koji opisuju postojanje i raspored delova strukture koji mogu da stupe u specifične interakcije sa vezivnim mestima na transporteru.

Kao alternativu računarskim modelima sa većim brojem molekulskih deskriptora, nekoliko autora predložilo je jednostavna pravila, koja omogućavaju identifikaciju jedinjenja koja imaju visoku verovatnoću da budu supstrati za Pgp. Predložena pravila zbirno su prikazana u Tabeli III. Jasna prednost ovog pristupa je u činjenici da, nalik na slična empirijska pravila kao što je „pravilo petice“ Lipinskog [64], ovakva pravila je lako inkorporirati u proces otkrića novih lekova. Ipak, većina objavljenih pravila nije validirana na eksternim podacima, a njihova jednostavnost za posledicu ima i nižu tačnost predviđanja. Primera radi, Li i saradnici primenili su pravila Didziapetrisa na njihov set podataka i ustanovili da je ovim pravilima moguće identifikovati samo 145 od 423 supstrata za Pgp [59]. Iako je njihova jednostavnost značajna prednost, korišćenje isključivo ovog pristupa u predviđanju interakcije sa Pgp-om nosi sa sobom rizik od brojnih lažno negativnih rezultata.

**Tabela III** Pregled predloženih pravila za jednostavnu identifikaciju potencijalnih supstrata P-gp.**Table III** Overview of simple rule-based models for identifying potential P-gp substrates.

Autori	Pravilo	Performanse	Ref.
Didziapetris et al. (2003)	P-gp supstrati: (a) suma broj atoma azota i kiseonika $\geq 8$ (b) molekulska masa $> 400$ (c) pKa najkiselije grupe $> 4$  P-gp nesupstrati: 1. suma broj atoma azota i kiseonika $\leq 4$ 2. molekulska masa $< 400$ 3. pKa najbaznije grupe $< 8$	?	[46]
Gombar et al. (2004)	P-gp supstrati: <ul style="list-style-type: none"> <li>• vrednost molekulskog elektrontopološkog stanja: MolES <math>&gt; 110</math></li> </ul> P-gp nesupstrati: <ul style="list-style-type: none"> <li>• MolES <math>&lt; 48</math></li> </ul>	Acc = 86,2%	[65]
Gleeson (2008)	P-gp supstrati: <ul style="list-style-type: none"> <li>• molekulska masa <math>&gt; 400</math></li> <li>• izračunati logP <math>&gt; 4</math></li> <li>• bazno ili neutralno jedinjenje</li> </ul>	?	[66]
Levatić et al. (2013)	P-gp supstrati: <ul style="list-style-type: none"> <li>• broj atoma <math>&gt; 35</math></li> <li>• specifična zapremina <math>&lt; 7,3 \text{ \AA}^3/\text{atomu}</math></li> </ul>	Acc = 74,3%	[58]

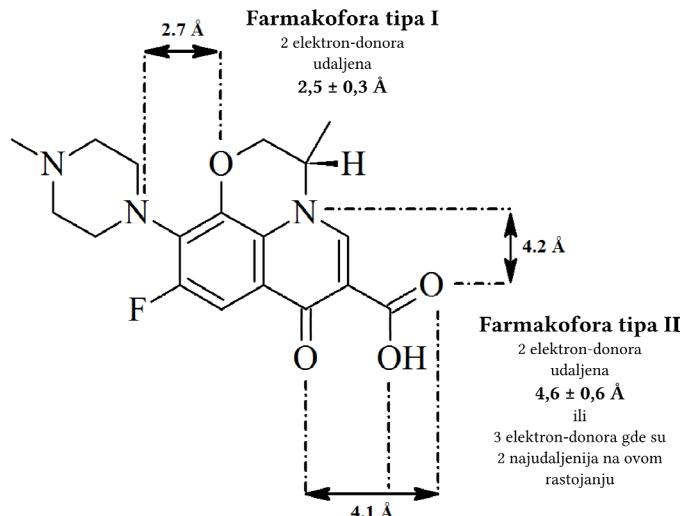
## 5. Modeli zasnovani na farmakofornim hipotezama

Molekulska struktura jedinjenja može se predstaviti kao niz apstraktnih tačaka, sa definisanim rasporedom u prostoru, koje karakteriše mogućnost specifičnog učešća u intermolekulskim interakcijama. Taj skup tačaka najčešće čine hidrofobni i aromatični centri, donori i akceptori vodoničnih veza, i centri pozitivnog i negativnog nanelektrisanja. Zajedno sa njihovim rasporedom u prostoru, ovaj skup tačaka predstavlja farmakoforni prikaz molekule. Superponiranjem niza farmakofora, izvedenih iz bioaktivnih konformacija aktivnih molekula, moguće je formulisati farmakofornu hipotezu o najvećem zajedničkom skupu strukturalnih elemenata i njihovom prostornom odnosu, koji je neophodan za upostavljanje interakcije sa datim cilnjim mestom dejstva [67].

Upostavljanje farmakofornog modela supstrata za Pgp znatno otežava više faktora. Kao što je opisano u odeljku 2, Pgp nema jasno definisano vezivno mesto za sve supstrate koje transportuje, tako da je validnost upostavljanja jednog farmakofornog modela diskutabilna. Za najveći broj Pgp supstrata nije poznata

bioaktivna konformacija, niti su šire dostupni podaci o kompeticiji u vezivanju sa drugim jedinjenjima koji bi ukazali na vezivanje za istu regiju vezivne šupljine Pgp-a. Nadalje, formulisanje farmakofoorne hipoteze zahteva superponiranje (preklapanje) farmakofora većeg broja aktivnih jedinjenja. Uspešnost ovog koraka u razvoju modela zahteva visok stepen hemijske sličnosti razmatranih struktura, tako da rezultujuće modele najčešće odlikuje primenjivost u ograničenom delu hemijskog prostora. Konačno, činjenica da dato jedinjenje zadovoljava farmakofoornu hipotezu ne znači nužno i da će efikasno biti transportovano posredstvom Pgp-a; farmakofojni modeli zanemaruju uticaj permeabilnosti jedinjenja na transport i isključivo odslikavaju mogućnost interakcije sa vezivnim mestima Pgp-a.

Najraniji opšti farmakoformi model supstrata P-glikoproteina predložila je Anna Seelig 1998. godine [68]. Model je uspostavljen analizom trodimenzionalnih struktura 75 supstrata, 18 induktora i 7 nesupstrata Pgp-a. Prema ovom modelu, ilustrovanom na Slici 2, najveću verovatnoću da budu supstrati za Pgp imaju jedinjenja koja sadrže jednu „farmakoforu jedinicu“ tipa I ili jednu jedinicu tipa II, pri čemu verovatnoća raste sa jačinom i brojnošću donora elektrona koji čine farmakoforu. Iako je ovaj model razvijen korišćenjem relativno malog broja struktura, naš rad na razvoju modela za transport Pgp-om ukazao je da trodimenzionalni deskriptori izvedeni iz predloženih farmakofora mogu značajno unaprediti predviđanja globalnih modela [47].



**Slika 2. Ilustracija farmakofora P-gp supstrata, predloženih u referenci [68]. Kao primer supstrata ilustrovan je levofloksacin.**

**Figure 2. A schematic representation of the pharmacophoric patterns of P-gp substrates, proposed in [68]. Levofloxacin is shown as an example substrate.**

Većina drugih farmakofornih modela u literaturi predložena je za specifična, prepostavljena vezivna mesta Pgp-a [69–71]. Do sada predloženi globalno primenjivi farmakoforni modeli zasnivaju se na pristupu korišćenja skupa (ansambla) velikog broja pojedinačnih farmakofora. Penzotti i saradnici [72] analizirali su set od 76 supstrata i 68 nesupstrata, mapirajući za svako jedinjenje više farmakofora od po 2 do 4 farmakoforne tačke. Statističkom analizom autori su identifikovali 100 najinformativnijih farmakofora, pri čemu je preko polovine činila kombinacija jednog donora i jednog akceptora vodonične veze, sa jednim ili dva hidrofobna centra. Supstratima su smatrane one strukture koje se podudaraju sa najmanje 20 od 100 farmakofora ansambla, pri čemu je ovaj vid klasifikacije ispravno predvideo transport 63% jedinjenja iz seta za testiranje.

Li i saradnici [73] su sličnim pristupom razvili drvo odluke (engl. *decision tree*), bazirajući svako grananje u ovom modelu na podudarnosti sa jednom od 9 farmakofora. Set koji je korišćen za uspostavljanje modela sastojao se od 91 supstrata i 72 nesupstrata. Ovakvim integrisanjem više farmakofornih modela, postignuta je ukupna tačnost predviđanja od 87,6% na eksternom setu za testiranje, koji je sadržao 97 jedinjenja.

Opisani su i pristupi koji podrazumevaju kombinovanje fizičko-hemijskih sa farmakofornim deskriptorima koji se ne zasnivaju na preklapanju struktura, već na kvantifikaciji rasprostranjenosti oblasti koje odgovaraju određenom tipu farmakoforne tačke [74].

Domen primenjivosti i tačnost predviđanja većine objavljenih farmakofornih modela značajno je niži od modela zasnovanih na molekulskim deskriptorima. Farmakoforne hipoteze predložene u okviru ovih modela karakterišu značajne razlike, čije postojanje sprečava formulisanje globalno validne farmakofore i još jednom upućuje na polispecifičnost Pgp-a [22,75]. Upravo ova karakteristika Pgp-a ograničava mogućnost primene farmakofornog modeliranja, što je jedan od verovatnih uzroka relativno slabe zastupljenosti ove grupe modela u novijoj literaturi.

## 6. Modeli zasnovani na strukturi Pgp-a

U periodu do 2009. godine, interesovanje za strukturu P-glikoproteina u atomskoj rezoluciji dovelo je do razvoja većeg broja molekulskih modela zasnovanih na sličnosti sekvenci između humanog Pgp-a i bakterijskih ABC transportera, čije su kristalne strukture bile dostupne [76–79]. Usled relativno niske identičnosti sekvenci, međutim, ovi modeli nisu mogli biti pouzdano primenjeni u predviđanju interakcije malih organskih molekula i Pgp-a [80]. Značajan pomak u ovom smislu omogućilo je rešavanje kristalne strukture mišjeg Pgp-a, u apo obliku i kompleksu sa dva

stereoizomera makrocikličnog inhibitora QZ59S [25]<sup>2</sup>. Iako su objavljene strukture relativno niske rezolucije (3,80—4,40 Å), visok stepen sličnosti sekvenci humanog i mišjeg Pgp-a omogućio je razvoj preciznijih modela zasnovanih na homologiji, što je uticalo na povećano interesovanje za primenu metoda molekulskog dokinga u proučavanju interakcije Pgp-a i njegovih supstrata [81].

Dostupnost ovih struktura i modela doprinelo je racionalizaciji strukturne osnove različitih eksperimentalnih zapažanja. Više autora primenilo je molekulski doking u predviđanju strukture kompleksa Pgp-a i jedinjenja koja se za transporter vezuju [82–87]. Dobra ilustracija ovog pristupa jeste kombinovana studija mutageneze i molekulskog dokinga koju su predstavili Chufan i saradnici [88]. Na osnovu položaja QZ59S-SSS u kristalnoj strukturi Pgp-a, molekulskog dokinga tarikvidara, valinomicina i ciklosporina A, kao i uzimanjem u obzir dostupnih eksperimentalnih podataka, autori su odabrali nekoliko aminokiselina u strukturi Pgp-a koje su podvrgli mutagenezi. Na osnovu vezivanja izabranih struktura za mutirane forme, autori su pokazali da gubitak afiniteta za prvobitno mesto vezivanja ne dovodi do izostanka vezivanja izabranih jedinjenja za Pgp, već da se ona u mutiranim formama transportera vezuju za sekundarna mesta. Time je potvrđena hipoteza o postojanju više potencijalnih vezivnih mesta na transporteru. Autori su takođe zaključili da, iako dokingom nije moguće tačno predvideti mesto vezivanja supstrata, različiti mogući položaji liganda u vezivnoj šupljini, dobijeni dokingom, mogu biti korisni u daljim studijama.

Više autora opisalo je primenu simulacija molekulske dinamike (MD) u izučavanju interakcije supstrata i modulatora sa P-glikoproteinom. Ferreira i saradnici [89] rafinisali su model humanog Pgp-a, zasnovanog na strukturi mišjeg, primenom relativno dugih simulacija MD (100 ns). Autori su ustanovili da je modeliranje nedostajućeg segmenta između NBD1 i TMD2, kao i adekvatno simuliranje lipidnog okruženja transportera od velikog značaja za izučavanje dinamike Pgp-a. Poredenjem dinamike supstrata i modulatora u kompleksu sa transporterom, autori su zaključili da u proseku modulatori ostvaruju brojnije interakcije sa vezivnim mestima od supstrata. U drugoj studiji, Prajapati i saradnici [90] su, analizirajući rezultate MD simulacija i proračuna slobodne energije, utvrdili da hidrofobne interakcije daju značajno veći doprinos energiji vezivanja u poređenju sa elektrostatskim, kao i da rigidne molekule pokazuju manju sklonost prilagođavanju šupljinama transportera, što ih čini lošijim supstratima za Pgp.

Iako simulacije MD pružaju jedinstven uvid u interakcije sa Pgp-om na atomskom nivou i u vremenskoj rezoluciji femtosekunde, njihova računarska zahtevnost čini ih nepraktičnim za rutinska predviđanja u dizajnu novih lekova. Molekulski doking je

---

2  
[26].

Prvobitno objavljene strukture iz 2009. godine korigovane su od strane autora 2014. godine

računarski značajno pristupačniji, pa je više autora istraživalo mogućnost predviđanja transporta Pgp-om pomoću ove metode. Dolghih i saradnici [91] izvršili su doking 126 jedinjenja u strukturu mišjeg Pgp-a i poredili rezultate dobijene pristupom u kome je protein bio rigidan sa pristupom gde su bočni lanci aminokiselina vezivnog mesta tretirani kao fleksibilni. Autori su ustanovili da je fleksibilnost od ključnog značaja za uspeh predviđanja kao i da se ovom metodom dobija kvalitativno slaganje između stepena transporta jedinjenja i energije vezivanja izračunate dokingom. Autori su takođe zaključili da su fizičko-hemiske karakteristike supstrata od većeg značaja za energiju vezivanja od interakcije sa specifičnim aminokiselinama. Do sličnih zaključaka u pogledu važnosti fleksibilnog dokinga došli su i drugi autori [92].

Ferreira i saradnici upotrebili su prethodno opisani rafinisani model Pgp-a u doking studiji, u okviru koje su proučavali razlike u predviđenom načinu i energiji vezivanja supstrata, nesupstrata i modulatora Pgp-a [93]. Koristeći AutoDock Vina softver, autori su predložili kriterijum po kome jedinjenja čija je doking energija veća od -7 kcal/mol najverovatnije predstavljaju nesupstrate Pgp-a. Poredeći položaje supstrata i modulatora Pgp-a, dobijene dokingom, autori su zaključili da se supstrati većinom lokalizuju u oblasti H- i R- vezivnih mesta [32], dok modulatori pokazuju veći afinitet ka dubljoj lokalizaciji u predelu preseka dva transmembranska domena. U sličnoj studiji, Zeino i saradnici [94] uporedili su rezultate dokinga 22 supstrata, 26 modulatora i 15 nesupstrata na modelu humanog i na kristalnoj strukturi mišjeg Pgp-a. Autori su pokazali da postoje statistički značajne razlike u energijama vezivanja supstrata, nesupstrata i modulatora, ali samo ukoliko se koristi model humanog Pgp-a.

Relativno mali broj jedinjenja koja su korišćena u doking studijama, nedostatak opsežnije validacije, niža tačnost predviđanja kao i veći računarski zahtevi čine modele zasnovane na strukturi Pgp-a manje pouzdanim i primenjivim od modela koji su zasnovani na molekulskim deskriptorima. Usled ove činjenice, dostupnost kristalne strukture mišjeg Pgp-a nije značajno doprinela uspešnosti računarskih predviđanja transporta P-glikoproteinom [48,81]. Ipak, metode bazirane na strukturi Pgp-a komplementarne su sa predviđanjima modela zasnovanim na molekulskim deskriptorima. Primer koji ilustruje ovu činjenicu je internet server za predviđanje interakcije sa Pgp-om, koji su razvili Bikadi i saradnici [95]. U predloženoj metodi koriste se vrednosti molekulskih deskriptora i prethodno uspostavljen SVM model da bi se predvideo transport priloženog jedinjenja, a zatim generiše moguća struktura kompleksa sa Pgp-om, primenom molekulskog dokinga.

Mešoviti pristupi u okviru kojih je moguće kombinovati predviđanja različitih metoda do danas nisu široko primenjivani u predviđanju transporta P-glikoproteinom. Ovakvi pristupi integrisanja različitih predviđanja pokazali su uspešnost u drugim poljima računarske hemije, kao što su virtualni skrining [96] i inverzni virtualni skrining [97], tako da je moguće da njihova primena u slučaju transporta Pgp-om doprinese

pouzdanosti postojećih modela. Bez obzira na nižu pouzdanost predviđanja, upotreba strukture Pgp-a može da pruži dodatan uvid u mehanizam transporta i interakcije datog jedinjenja i transporteru. Takav uvid može pružiti racionalnu strukturu osnovu za modifikaciju strukture u cilju smanjenja njenog afiniteta za Pgp [98].

## 7. Zaključak

Pravovremeno predviđanje transporta posredovanog P-glikoproteinom ima veliki značaj u racionalnom otkriću novih lekova. Tačnost predviđanja literaturnih modela zasnovanih na raznovrsnim molekulskim deskriptorima dostigla je stepen koji omogućava relativno pouzdanu identifikaciju jedinjenja koja imaju veliku verovatnoću da predstavljaju supstrate za Pgp. Uspešnost razvoja novih modela u najvećoj meri zavisi od prikupljanja uniformnih eksperimentalnih podataka i dovoljne hemijske raznovrsnosti kreiranog seta, što može da obezbedi primenjivost modela u odgovarajućem delu hemijskog prostora. Farmakoforni modeli i novije studije koje koriste strukturu P-glikoproteina nemaju uporedivu tačnost predviđanja, ali omogućavaju ostvarivanje uvida u molekularnu osnovu interakcije supstrata sa vezivnim mestima na transporteru.

Analiza uspostavljenih modela sugerije da uspešnost predviđanja transporta P-glikoproteinom zavisi od adekvatnog modelovanja sposobnosti molekule da pređe u lipidni dvosloj i postojanja karakterističnih strukturalnih elemenata koji omogućavaju interakciju sa vezivnom šupljinom transporteru. Čini se izvesnim da fizičko-hemijske karakteristike, pre nego postojanje specifične farmakofore, suštinski utiču na mogućnost transporta. To u velikoj meri otežava racionalno dizajniranje strukture koja neće biti supstrat P-glikoproteina, pa je predloženo da povećanje pasivne permeabilnosti za sada predstavlja najefikasniji način smanjenja podložnosti leka uticaju P-glikoproteina [99]. Ipak, razvoj metoda koje bi omogućile pouzdano predviđanje mesta za koje se supstrati vezuju za Pgp moglo bi da doprinese racionalnoj modifikaciji hemijskih struktura.

Unapređenje pouzdanosti postojećih modela biće moguće sa povećanom dostupnošću eksperimentalnih podataka visokog kvaliteta. Integriranje *in silico* i *in vitro* metoda u objedinjene protokole omogućilo bi stalno unapređenje predviđanja računarskih modela, a istovremeno bi ograničilo broj neophodnih *in vitro* testova kroz prioritetno testiranje onih jedinjenja za koje se računarskim modelima predvidi da su najverovatniji (ne)supstrati [100]. Takođe, kombinovanje predviđanja različitih metoda ima potencijal da unapredi računarsku karakterizaciju interakcije sa Pgp-om i doprinese sticanju boljeg uvida u strukturalnu osnovu transporta.

## Zahvalnica

Autori se zahvaljuju Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije na finansijskoj podršci projekta 172009.

## Literatura

1. Rees DC, Johnson E, Lewinson O. ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:218–27. doi:10.1038/nrm2646.
2. Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert DW. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics* 2008;3:281. doi:10.1186/1479-7364-3-3-281.
3. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* 1976;455:152–62. doi:10.1016/0005-2736(76)90160-7.
4. Zhou S-F. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica* 2008;38:802–32. doi:10.1080/00498250701867889.
5. Lin DJH, Yamazaki M. Role of P-Glycoprotein in Pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 2012;42:59–98. doi:10.2165/00003088-200342010-00003.
6. Chan LMS, Lowes S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* 2004;21:25–51. doi:10.1016/j.ejps.2003.07.003.
7. Thompson TN. The Clinical Significance of Drug Transporters in Drug Disposition and Drug Interactions. In: Bonate PL, Howard DR, editors. *Pharmacokinetic Drug Dev.*, Springer US; 2011, p. 285–313.
8. Baguley BC. Multiple Drug Resistance Mechanisms in Cancer. *Mol Biotechnol* 2010;46:308–16. doi:10.1007/s12033-010-9321-2.
9. Dean M. ABC Transporters, Drug Resistance, and Cancer Stem Cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2009;14:3–9. doi:10.1007/s10911-009-9109-9.
10. Eckford PDW, Sharom FJ. ABC Efflux Pump-Based Resistance to Chemotherapy Drugs. *Chem Rev* 2009;109:2989–3011. doi:10.1021/cr9000226.
11. Giacomini KM, Huang S-M, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KLR, Chu X, et al. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:215–36. doi:10.1038/nrd3028.
12. Maeda K, Sugiyama Y. Transporter biology in drug approval: Regulatory aspects. *Mol Aspects Med* 2013;34:711–8. doi:10.1016/j.mam.2012.10.012.

13. Erić S, Ilić K. Inhibitori P-glikoproteina kao modulatori rezistencije na antikancerogene lekove. Arh Farm 2010;60:271–84.
14. Coley HM. Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: Clinical Studies of P-Glycoprotein Inhibitors. In: Zhou J, editor. Multi-Drug Resist. Cancer, Totowa, NJ: Humana Press; 2010, p. 341–58.
15. Yu M, Ocana A, Tannock IF. Reversal of ATP-binding cassette drug transporter activity to modulate chemoresistance: why has it failed to provide clinical benefit? *Cancer Metastasis Rev* 2012;32:211–27. doi:10.1007/s10555-012-9402-8.
16. Callaghan R, Luk F, Bebawy M. Inhibition of the Multidrug Resistance P-Glycoprotein: Time for a Change of Strategy? *Drug Metab Dispos* 2014;42:623–31. doi:10.1124/dmd.113.056176.
17. Saraswathy M, Gong S. Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer. *Biotechnol Adv* 2013;31:1397–407. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.06.004.
18. Mizuno N, Niwa T, Yotsumoto Y, Sugiyama Y. Impact of Drug Transporter Studies on Drug Discovery and Development. *Pharmacol Rev* 2003;55:425–61. doi:10.1124/pr.55.3.1.
19. Polli JW, Wring SA, Humphreys JE, Huang L, Morgan JB, Webster LO, et al. Rational Use of in Vitro P-glycoprotein Assays in Drug Discovery. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299:620–8.
20. Chang C, Bahadduri PM, Polli JE, Swaan PW, Ekins S. Rapid Identification of P-glycoprotein Substrates and Inhibitors. *Drug Metab Dispos* 2006;34:1976–84. doi:10.1124/dmd.106.012351.
21. Shimada J, Ekins S, Elkin C, Shakhnovich EI, Wery J-P. Integrating computer-based de novo drug design and multidimensional filtering for desirable drugs. *Targets* 2002;1:196–205. doi:10.1016/S1477-3627(02)02274-2.
22. Ecker GF, Stockner T, Chiba P. Computational models for prediction of interactions with ABC-transporters. *Drug Discov Today* 2008;13:311–7. doi:10.1016/j.drudis.2007.12.012.
23. Pinto M, Digles D, Ecker GF. Computational models for predicting the interaction with ABC transporters. *Drug Discov Today Technol* 2014;12:e69–77. doi:10.1016/j.ddtec.2014.03.007.
24. Ekins S. Predicting undesirable drug interactions with promiscuous proteins in silico. *Drug Discov Today* 2004;9:276–85. doi:10.1016/S1359-6446(03)03008-3.
25. Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, et al. Structure of P-Glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. *Science* 2009;323:1718–22. doi:10.1126/science.1168750.
26. Li J, Jaimes KF, Aller SG. Refined structures of mouse P-glycoprotein. *Protein Sci* 2014;23:34–46. doi:10.1002/pro.2387.
27. Hennessy M, Spiers JP. A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter. *Pharmacol Res* 2007;55:1–15. doi:10.1016/j.phrs.2006.10.007.
28. Orlowski S, Martin S, Escargueil A. P-glycoprotein and “lipid rafts”: some ambiguous mutual relationships (floating on them, building them or meeting them by chance?). *Cell Mol Life Sci CMLS* 2006;63:1038–59. doi:10.1007/s00018-005-5554-9.

29. Aänismaa P, Gatlik-Landwojtowicz E, Seelig A. P-glycoprotein senses its substrates and the lateral membrane packing density: consequences for the catalytic cycle. *Biochemistry (Mosc)* 2008;47:10197–207. doi:10.1021/bi800209h.
30. Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 2007;9:105–27. doi:10.2217/14622416.9.1.105.
31. Lugo MR, Sharom FJ. Interaction of LDS-751 and Rhodamine 123 with P-Glycoprotein: Evidence for Simultaneous Binding of Both Drugs†. *Biochemistry (Mosc)* 2005;44:14020–9. doi:10.1021/bi0511179.
32. Shapiro AB, Ling V. Positively Cooperative Sites for Drug Transport by P-Glycoprotein with Distinct Drug Specificities. *Eur J Biochem* 1997;250:130–7. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.00130.x.
33. Shapiro AB, Fox K, Lam P, Ling V. Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. *Eur J Biochem* 1999;259:841–50. doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00098.x.
34. Martin C, Berridge G, Higgins CF, Mistry P, Charlton P, Callaghan R. Communication between Multiple Drug Binding Sites on P-glycoprotein. *Mol Pharmacol* 2000;58:624–32. doi:10.1124/mol.58.3.624.
35. Safa AR. Identification and Characterization of the Binding Sites of P-Glycoprotein for Multidrug Resistance-Related Drugs and Modulators. *Curr Med Chem -Anti-Cancer Agents* 2004;4:1–17. doi:10.2174/1568011043482142.
36. Ernst R, Kueppers P, Stindt J, Kuchler K, Schmitt L. Multidrug efflux pumps: Substrate selection in ATP-binding cassette multidrug efflux pumps – first come, first served? *FEBS J* 2010;277:540–9. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07485.x.
37. Wong K, Ma J, Rothnie A, Biggin PC, Kerr ID. Towards understanding promiscuity in multidrug efflux pumps. *Trends Biochem Sci* 2014;39:8–16. doi:10.1016/j.tibs.2013.11.002.
38. Chufan EE, Sim H-M, Ambudkar SV. Molecular Basis of the Polyspecificity of P-Glycoprotein (ABCB1): Recent Biochemical and Structural Studies. In: Ishikawa JDS and T, editor. *Adv. Cancer Res.*, vol. 125, Academic Press; 2015, p. 71–96.
39. Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:3–29. doi:10.1016/S0169-409X(02)00169-2.
40. Zhang Y, Bachmeier C, Miller DW. In vitro and in vivo models for assessing drug efflux transporter activity. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:31–51. doi:10.1016/S0169-409X(02)00170-9.
41. Varma MVS, Sateesh K, Panchagnula R. Functional Role of P-Glycoprotein in Limiting Intestinal Absorption of Drugs: Contribution of Passive Permeability to P-Glycoprotein Mediated Efflux Transport. *Mol Pharm* 2005;2:12–21. doi:10.1021/mp0499196.
42. Balimane PV, Han Y-H, Chong S. Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction. *AAPS J* 2006;8:E1–13. doi:10.1208/aapsj080101.

43. Litman T, Zeuthen T, Skovsgaard T, Stein WD. Competitive, non-competitive and cooperative interactions between substrates of P-glycoprotein as measured by its ATPase activity. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* 1997;1361:169–76. doi:10.1016/S0925-4439(97)00027-6.
44. Adachi Y, Suzuki H, Sugiyama Y. Comparative Studies on in Vitro Methods for Evaluating in Vivo Function of MDR1 P-Glycoprotein. *Pharm Res* 2001;18:1660–8. doi:10.1023/A:1013358126640.
45. Schwab D, Fischer H, Tabatabaei A, Poli S, Huwyler J. Comparison of in Vitro P-Glycoprotein Screening Assays: Recommendations for Their Use in Drug Discovery. *J Med Chem* 2003;46:1716–25. doi:10.1021/jm021012t.
46. Didziapetris R, Japertas P, Avdeef A, Petrauskas A. Classification Analysis of P-Glycoprotein Substrate Specificity. *J Drug Target* 2003;11:391–406. doi:10.1080/10611860310001648248.
47. Erić S, Kalinić M, Ilić K, Zloh M. Computational classification models for predicting the interaction of drugs with P-glycoprotein and breast cancer resistance protein. *SAR QSAR Environ Res* 2014;25:939–66. doi:10.1080/1062936X.2014.976265.
48. Chen L, Li Y, Yu H, Zhang L, Hou T. Computational models for predicting substrates or inhibitors of P-glycoprotein. *Drug Discov Today* 2012;17:343–51. doi:10.1016/j.drudis.2011.11.003.
49. He H, Garcia EA. Learning from Imbalanced Data. *IEEE Trans Knowl Data Eng* 2009;21:1263–84. doi:10.1109/TKDE.2008.239.
50. Schwaha R, Ecker GF. Similarity Based Descriptors – Useful for Classification of Substrates of the Human Multidrug Transporter P-Glycoprotein? *QSAR Comb Sci* 2009;28:834–9. doi:10.1002/qsar.200960051.
51. Xue Y, Yap CW, Sun LZ, Cao ZW, Wang JF, Chen YZ. Prediction of P-Glycoprotein Substrates by a Support Vector Machine Approach. *J Chem Inf Comput Sci* 2004;44:1497–505. doi:10.1021/ci049971e.
52. De Cerqueira Lima P, Golbraikh A, Oloff S, Xiao Y, Tropsha A. Combinatorial QSAR Modeling of P-Glycoprotein Substrates. *J Chem Inf Model* 2006;46:1245–54. doi:10.1021/ci0504317.
53. Cabrera MA, González I, Fernández C, Navarro C, Bermejo M. A topological substructural approach for the prediction of P-glycoprotein substrates. *J Pharm Sci* 2006;95:589–606. doi:10.1002/jps.20449.
54. Huang J, Ma G, Muhammad I, Cheng Y. Identifying P-Glycoprotein Substrates Using a Support Vector Machine Optimized by a Particle Swarm. *J Chem Inf Model* 2007;47:1638–47. doi:10.1021/ci700083n.
55. Demel MA, Kraemer O, Ettmayer P, Haaksma E, Ecker GF. Ensemble Rule-Based Classification of Substrates of the Human ABC-Transporter ABCB1 Using Simple Physicochemical Descriptors. *Mol Inform* 2010;29:233–42. doi:10.1002/minf.200900079.
56. Wang Z, Chen Y, Liang H, Bender A, Glen RC, Yan A. P-glycoprotein Substrate Models Using Support Vector Machines Based on a Comprehensive Data set. *J Chem Inf Model* 2011;51:1447–56. doi:10.1021/ci2001583.

57. Broccatelli F. QSAR Models for P-Glycoprotein Transport Based on a Highly Consistent Data Set. *J Chem Inf Model* 2012;52:2462–70. doi:10.1021/ci3002809.
58. Levatić J, Čurak J, Kralj M, Šmuc T, Osmak M, Supek F. Accurate Models for P-gp Drug Recognition Induced from a Cancer Cell Line Cytotoxicity Screen. *J Med Chem* 2013;56:5691–708. doi:10.1021/jm400328s.
59. Li D, Chen L, Li Y, Tian S, Sun H, Hou T. ADMET Evaluation in Drug Discovery. 13. Development of in Silico Prediction Models for P-Glycoprotein Substrates. *Mol Pharm* 2014;11:716–26. doi:10.1021/mp400450m.
60. Shoemaker RH. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer* 2006;6:813–23. doi:10.1038/nrc1951.
61. Erić S, Kalinić M, Popović A, Zloh M, Kuzmanovski I. Prediction of aqueous solubility of drug-like molecules using a novel algorithm for automatic adjustment of relative importance of descriptors implemented in counter-propagation artificial neural networks. *Int J Pharm* 2012;437:232–41. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.08.022.
62. Guha R, Jurs PC. Interpreting Computational Neural Network QSAR Models: A Measure of Descriptor Importance. *J Chem Inf Model* 2005;45:800–6. doi:10.1021/ci050022a.
63. Fraczkiewicz R, Zhuang D, Zhang J, Miller D, Woltosz W. Busting the Black Box Myth: Designing Out Unwanted ADMET Properties with Machine Learning Approaches. *CICSJ Bull* 2009;27:96–96. doi:10.11546/cicsj.27.96.
64. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;46:3–26.
65. Gombar VK, Polli JW, Humphreys JE, Wring SA, Serabjit-Singh CS. Predicting P-glycoprotein substrates by a quantitative structure–activity relationship model. *J Pharm Sci* 2004;93:957–68. doi:10.1002/jps.20035.
66. Gleeson MP. Generation of a Set of Simple, Interpretable ADMET Rules of Thumb. *J Med Chem* 2008;51:817–34. doi:10.1021/jm701122q.
67. Wermuth CG, Ganellin CR, Lindberg P, Mitscher LA. Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure Appl Chem* 1998;70:1129–43.
68. Seelig A. A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *Eur J Biochem* 1998;251:252–61. doi:10.1046/j.1432-1327.1998.2510252.x.
69. Pajeva IK, Wiese M. Pharmacophore Model of Drugs Involved in P-Glycoprotein Multidrug Resistance: Explanation of Structural Variety (Hypothesis). *J Med Chem* 2002;45:5671–86. doi:10.1021/jm020941h.
70. Garrigues A, Loiseau N, Delaforge M, Ferté J, Garrigos M, André F, et al. Characterization of Two Pharmacophores on the Multidrug Transporter P-Glycoprotein. *Mol Pharmacol* 2002;62:1288–98. doi:10.1124/mol.62.6.1288.
71. Resistance P-Glycoprotein. *J Med Chem* 2004;47:2523–33. doi:10.1021/jm031009p.

72. Penzotti JE, Lamb ML, Evensen E, Grootenhuis PDJ. A Computational Ensemble Pharmacophore Model for Identifying Substrates of P-Glycoprotein. *J Med Chem* 2002;45:1737–40. doi:10.1021/jm0255062.
73. Li W-X, Li L, Eksterowicz J, Ling XB, Cardozo M. Significance Analysis and Multiple Pharmacophore Models for Differentiating P-Glycoprotein Substrates. *J Chem Inf Model* 2007;47:2429–38. doi:10.1021/ci700284p.
74. Cianchetta G, Singleton RW, Zhang M, Wildgoose M, Giesing D, Fravolini A, et al. A Pharmacophore Hypothesis for P-Glycoprotein Substrate Recognition Using GRIND-Based 3D-QSAR. *J Med Chem* 2005;48:2927–35. doi:10.1021/jm0491851.
75. Ha SN, Hochman J, Sheridan RP. Mini Review on Molecular Modeling of P-Glycoprotein (Pgp). *Curr Top Med Chem* 2007;7:1525–9. doi:10.2174/156802607782194806.
76. O’Mara ML, Tielemans DP. P-glycoprotein models of the apo and ATP-bound states based on homology with Sav1866 and MalK. *FEBS Lett* 2007;581:4217–22. doi:10.1016/j.febslet.2007.07.069.
77. Globisch C, Pajeva IK, Wiese M. Identification of Putative Binding Sites of P-glycoprotein Based on its Homology Model. *ChemMedChem* 2008;3:280–95. doi:10.1002/cmdc.200700249.
78. Becker J-P, Depret G, Bambeke FV, Tulkens PM, Prévost M. Molecular models of human P-glycoprotein in two different catalytic states. *BMC Struct Biol* 2009;9:3. doi:10.1186/1472-6807-9-3.
79. Stockner T, de Vries SJ, Bonvin AMJJ, Ecker GF, Chiba P. Data-driven homology modelling of P-glycoprotein in the ATP-bound state indicates flexibility of the transmembrane domains. *FEBS J* 2009;276:964–72. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06832.x.
80. Kerr ID, Jones PM, George AM. Multidrug efflux pumps: The structures of prokaryotic ATP-binding cassette transporter efflux pumps and implications for our understanding of eukaryotic P-glycoproteins and homologues. *FEBS J* 2010;277:550–63. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07486.x.
81. Klepsch F, Ecker GF. Impact of the Recent Mouse P-Glycoprotein Structure for Structure-Based Ligand Design. *Mol Inform* 2010;29:276–86. doi:10.1002/minf.201000017.
82. Pajeva IK, Globisch C, Wiese M. Comparison of the inward- and outward-open homology models and ligand binding of human P-glycoprotein. *FEBS J* 2009;276:7016–26. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07415.x.
83. Pajeva IK, Globisch C, Wiese M. Combined Pharmacophore Modeling, Docking, and 3D QSAR Studies of ABCB1 and ABCC1 Transporter Inhibitors. *ChemMedChem* 2009;4:1883–96. doi:10.1002/cmdc.200900282.
84. Klepsch F, Chiba P, Ecker GF. Exhaustive Sampling of Docking Poses Reveals Binding Hypotheses for Propafenone Type Inhibitors of P-Glycoprotein. *PLoS Comput Biol* 2011;7:e1002036. doi:10.1371/journal.pcbi.1002036.
85. Jabeen I, Wetwitayaklung P, Klepsch F, Parveen Z, Chiba P, Ecker GF. Probing the stereoselectivity of P-glycoprotein—synthesis, biological activity and ligand docking studies of a

- set of enantiopure benzopyrano[3,4-b][1,4]oxazines. *Chem Commun* 2011;47:2586–8. doi:10.1039/C0CC03075A.
86. Abraham I, Jain S, Wu C-P, Khanfar MA, Kuang Y, Dai C-L, et al. Marine sponge-derived sipholane triterpenoids reverse P-glycoprotein (ABCB1)-mediated multidrug resistance in cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2010;80:1497–506. doi:10.1016/j.bcp.2010.08.001.
  87. Ding P-R, Tiwari AK, Ohnuma S, Lee JWKK, An X, Dai C-L, et al. The Phosphodiesterase-5 Inhibitor Vardenafil Is a Potent Inhibitor of ABCB1/P-Glycoprotein Transporter. *PLoS ONE* 2011;6:e19329. doi:10.1371/journal.pone.0019329.
  88. Chufan EE, Kapoor K, Sim H-M, Singh S, Talele TT, Durell SR, et al. Multiple Transport-Active Binding Sites Are Available for a Single Substrate on Human P-Glycoprotein (ABCB1). *PLoS ONE* 2013;8:e82463. doi:10.1371/journal.pone.0082463.
  89. Ferreira RJ, Ferreira M-JU, dos Santos DJVA. Insights on P-Glycoprotein’s Efflux Mechanism Obtained by Molecular Dynamics Simulations. *J Chem Theory Comput* 2012;8:1853–64. doi:10.1021/ct300083m.
  90. Prajapati R, Singh U, Patil A, Khomane KS, Bagul P, Bansal AK, et al. In silico model for P-glycoprotein substrate prediction: insights from molecular dynamics and in vitro studies. *J Comput Aided Mol Des* 2013;27:347–63. doi:10.1007/s10822-013-9650-x.
  91. Dolghih E, Bryant C, Renslo AR, Jacobson MP. Predicting Binding to P-Glycoprotein by Flexible Receptor Docking. *PLoS Comput Biol* 2011;7:e1002083. doi:10.1371/journal.pcbi.1002083.
  92. Palestro PH, Gavernet L, Estiu GL, Bruno Blanch LE. Docking Applied to the Prediction of the Affinity of Compounds to P-Glycoprotein. *BioMed Res Int* 2014;2014:e358425. doi:10.1155/2014/358425.
  93. Ferreira RJ, Ferreira M-JU, dos Santos DJVA. Molecular Docking Characterizes Substrate-Binding Sites and Efflux Modulation Mechanisms within P-Glycoprotein. *J Chem Inf Model* 2013;53:1747–60. doi:10.1021/ci400195v.
  94. Zeino M, Saeed MEM, Kadioglu O, Efferth T. The ability of molecular docking to unravel the controversy and challenges related to P-glycoprotein—a well-known, yet poorly understood drug transporter. *Invest New Drugs* 2014;32:618–25. doi:10.1007/s10637-014-0098-1.
  95. Bikadi Z, Hazai I, Malik D, Jemnitz K, Veres Z, Hari P, et al. Predicting P-Glycoprotein-Mediated Drug Transport Based On Support Vector Machine and Three-Dimensional Crystal Structure of P-glycoprotein. *PLoS ONE* 2011;6:e25815. doi:10.1371/journal.pone.0025815.
  96. Swann SL, Brown SP, Muchmore SW, Patel H, Merta P, Locklear J, et al. A Unified, Probabilistic Framework for Structure- and Ligand-Based Virtual Screening. *J Med Chem* 2011;54:1223–32. doi:10.1021/jm1013677.
  97. Li G-B, Yang L-L, Xu Y, Wang W-J, Li L-L, Yang S-Y. A combined molecular docking-based and pharmacophore-based target prediction strategy with a probabilistic fusion method for target ranking. *J Mol Graph Model* 2013;44:278–85. doi:10.1016/j.jmgm.2013.07.005.

98. Moroy G, Martiny VY, Vayer P, Villoutreix BO, Miteva MA. Toward in silico structure-based ADMET prediction in drug discovery. *Drug Discov Today* 2012;17:44–55. doi:10.1016/j.drudis.2011.10.023.
99. Raub TJ. P-Glycoprotein Recognition of Substrates and Circumvention through Rational Drug Design. *Mol Pharm* 2006;3:3–25. doi:10.1021/mp0500871.
100. Bahaduri PM, Polli JE, Swaan PW, Ekins S. Targeting Drug Transporters – Combining In Silico and In Vitro Approaches to Predict In Vivo. In: Yan Q, editor. *Membr. Transp. Drug Discov. Dev.*, Humana Press; 2010.

# **Computational models for predicting drug transport mediated by P-glycoprotein**

**Slavica Erić<sup>1,\*</sup>, Marko Kalinić<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Vojvode Stepe 450, 11000 Belgrade, Serbia

\* corresponding author: [seric@pharmacy.bg.ac.rs](mailto:seric@pharmacy.bg.ac.rs)

phone: +381 11 3951 355, fax: +381 11 3972 840

---

## **Summary**

P-glycoprotein (Pgp) is a transmembrane transporter which can, by transporting structurally diverse compounds, influence the absorption, distribution and efficacy of a number of drugs. Pgp overexpression in cells is a major contributing factor to the development of drug resistance. For these reasons, potential for compound efflux by Pgp should be assessed early on in the drug discovery process, preferably even prior to compound synthesis. To meet this demand, numerous computational models have been developed during the past decade, capable of predicting Pgp-mediated transport based solely on chemical structures. This paper summarizes the various approaches that have been used for model development, discusses their advantages and disadvantages and focuses on key factors that influence model reliability. The promiscuous nature of the transport can be seen as a major challenge for most computational chemistry methods. Nevertheless, the attained level of accuracy of literature models suggests that they can be useful in the drug discovery setting. Greater availability of experimental data and integration of predictions made by different modeling methods has the potential to further improve the reliability of computational predictions.

**Keywords:** P-glycoprotein, computational models, drug resistance, drug design.

---

## **Rezistin, inflamacija i dislipidemija kod gojazne dece i adolescenata**

**Branko Pavlović<sup>1</sup>, Jovana Milosavljević<sup>1</sup>, Aleksandra Zeljković<sup>1\*</sup>,**  
**Jelena Vekić<sup>1</sup>, Jelena Joksić<sup>1</sup>, Miron Sopić<sup>1</sup>,**  
**Vesna Spasojević-Kalimanovska<sup>1</sup>, Dušan Paripović<sup>2</sup>,**  
**Amira Peco-Antić<sup>2,3</sup>, Gordana Miloševski-Lomić<sup>2</sup>,**  
**Zorana Jelić-Ivanović<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za medicinsku biohemiju,  
Vojvode Stepe 450, P. Box 146; 11000 Belgrade, Srbija

<sup>2</sup> Služba za nefrologiju, Univerzitetska dečija klinika Tiršova, Beograd, Srbija

<sup>3</sup> Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet, Srbija

### **\*Ime i adresa autora za prepisku**

Aleksandra Zeljković, tel: (+381 11) 3951-284

E-mail: [aleksandra.zeljkovic@pharmacy.bg.ac.rs](mailto:aleksandra.zeljkovic@pharmacy.bg.ac.rs)

---

### **Kratak sadržaj**

**Uvod:** Gajaznost u dečjem uzrastu se povezuje sa razvojem kardiovaskularnih bolesti i tipa 2 dijabetes melitus u kasnijem dobu. Smatra se da je rezistin, adipokin kojeg u humanom organizumu luče monociti i tkivne makrofage, povezan sa ovim poremećajima.

**Cilj:** Ispitati povezanost koncentracije rezistina kod gojazne dece i adolescenata sa antropometrijskim parametrima gojaznosti, lipidnim statusom, inflamatornim markerima i parametrima insulinske rezistencije.

**Materijal i metode:** U istraživanju je učestvovalo 66 ispitanika (40 dečaka, 26 devojčica) kojima su izvršena antropometrijska merenja i laboratorijska ispitivanja (koncentracije glukoze, ukupnog holesterola, holesterola u česticama lipoproteina visoke gustine (eng. high-density

lipoprotein, HDL) i niske gustine (eng. low-density lipoprotein, LDL), triglicerida, mokraćne kiseline, visokoosetljivog C-reaktivnog proteina (high-sensitivity C-reactive protein; hsCRP) i glikoziliranog hemoglobina (HbA1c)). Insulinska rezistencija je procenjena na osnovu modela za izračunavanje indeksa insulinske rezistencije (eng. homeostasis model assessment of insulin resistance; HOMA-IR).

**Rezultati:** Kod 63,3% ispitanika utvrdili smo prisutnu dislipidemiju, a dobijene vrednosti hsCRP i mokraćne kiseline ukazuju na prisustvo inflamacije. Utvrdili smo korelaciju između koncentracije rezistina i odnosa obima struka i kukova ( $r=0,294$ ,  $p<0,05$ ) i između koncentracije rezistina i HOMA-IR ( $r=0,293$ ,  $p<0,05$ ). Ustanovili smo povezanost koncentracije mokraćne kiseline i parametara gojaznosti. Upoređivanjem parametara između polova, značajna razlika postoji u telesnoj visini ( $p<0,01$ ), odnosu obima struka i kukova ( $p<0,001$ ), mokraćnoj kiselini ( $p<0,01$ ) i HOMA-IR ( $p<0,01$ ).

**Zaključak:** Naši rezultati ukazuju na povezanost gojaznosti, inflamacije i dislipidemije kod dece i adolescenata. Rezistin bi u budućnosti mogao biti značajan za procenu kardiometaboličkog rizika u ovoj populaciji.

**Ključne reči:** dečja gojaznost; rezistin; inflamacija; dislipidemija.

---

## Uvod

Prevalenca gojaznosti u savremenom svetu se dramatično povećava dostižući epidemiske razmere (1). Podaci koji naročito zabrinjavaju odnose se na povećanje broja gojazne dece i adolescenata (2), budući da se gojaznost u dečjem uzrastu povezuje sa visokim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti i tipa 2 dijabetes melitusa u odrasлом добу (3). Utvrđeno je da prekomerna akumulacija adipoznog tkiva dovodi do niza lokalnih i sistemskih efekata, među koje se svrstavaju povećanje nivoa proinflamatornih citokina, promene u koncentraciji adipokina, povišen nivo oksidativnog stresa, kao i niz endokrinih poremećaja, od kojih je najvažniji razvoj insulinske rezistencije (4).

Jedan od učesnika u pomenutim procesima koji je danas predmet intenzivnog istraživanja je rezistin. Ovaj protein, molekulske mase 12,5 kDa, spada u grupu cisteinom bogatih - rezistinu sličnih proteina i ubraja se tzv. „FIZZ” (Found in inflammatory zones) proteine (5), a u svojoj strukturi ima 114 aminokiselina (6). Kod glodara je ustanovljeno da rezistin primarno sekretuju adipociti, te da je povezan sa razvojem insulinske rezistencije (7). Kod ljudi ga u najvećoj meri stvaraju cirkulišući monociti i tkivne makrofage, a u manjoj meri adipozno tkivo, dok je pronađen i u aterosklerotskim lezijama, kostnoj srži, placenti, ćelijama pankreasnih ostrvaca i plućima (8).

Nekoliko istraživanja je ukazalo na povezanost između rezistina i aterogeneze; sa jedne strane posredstvom stimulacije monocita i promocijom vaskularne inflamacije (7), a sa druge strane preko smanjene ekspresije receptora za lipoproteine niske gustine (eng. low-density lipoprotein, LDL) i povećanja koncentracije LDL- holesterola (9). Smanjena ekspresija LDL-receptora uzrokuje smanjen klirens ovih lipoproteinskih čestica, njihovo produženo zadržavanje u cirkulaciji, te duži period izloženosti potencijalnim štetnim efektima slobodnih kiseoničnih radikala. Oksidativna modifikacija LDL čestica doprinosi povećanju njihovog proaterogenog potencijala, pre svega zbog toga što ovako izmenjene čestice imaju veliki afinitet prema receptorima hvatačima na makrofagama, što je prvi korak u nastanku ateroskleroze (10). Ova istraživanja daju osnovu za pretpostavku da rezistin predstavlja jedan od integrišućih faktora koji povezuju gojaznost, inflamaciju, insulinsku rezistenciju i razvoj kardiometaboličkih komplikacija. Rezistin je tema mnogih istraživanja koja pokušavaju da odgovoru njegovu konačnu ulogu u razvoju kardiometaboličkih komplikacija kod gojaznih osoba, a rasvetljavanje njegove uloge može biti naročito važno za populaciju gojazne dece.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitivanje povezanosti serumske koncentracije rezistina sa antropometrijskim parametrima gojaznosti, lipidnim statusom,

inflamatornim markerima kao i parametrima insulinske rezistencije kod gojazne dece i adolescenata.

## **Materijal i metode**

### *Ispitanici*

U istraživanju je učestvovalo ukupno 66 gojazne dece i adolescenata uzrasta od 10 do 18 godina, telesne težine između 49,5 i 145 kg. Od 66 ispitanika 46 su činili dečaci, a 20 devojčice. Uzorci su dobijeni sa Univerzitetske dečje klinike „Tiršova“. Na početku istraživanja izvršena su antropometrijska merenja (visina, težina, obim struka i kukova, odnos struk/kuk (S/K) i indeks telesne mase (eng. body-mass index, BMI)). BMI je izračunat kao odnos visine i kvadrata telesne težine. Gajaznost je potvrđena na osnovu BMI, koji je bio veći od 95-tog percentila za starosnu dob (11). Dislipidemija je definisana na osnovu preporučenih vrednosti za lipidne parametre u dečjem uzrastu (12). Studija je planirana i sprovedena u skladu sa etičkim principima Helsinške deklaracije, a na osnovu odobrenja Etičkog komiteta Univerzitetske dečje klinike. Roditelji i učesnici u studiji dali su pismenu saglasnost za učešće u istraživanju.

### *Laboratorijska određivanja*

Uzorci krvi potrebni za laboratorijske analize dobijeni su nakon noćnog gladovanja. Nakon izdvajanja serum-a i EDTA plazme, uzorci su zamrznuti i čuvani na temperaturi od -80° C, a odleđeni neposredno pre izvođenja analiza. Koncentracije glukoze, ukupnog holesterola, holesterola u česticama lipoproteina visoke gustine (eng. high-density lipoprotein, HDL), LDL-holesterola, triglicerida i mokraćne kiseline određene su standardnim laboratorijskim postupcima (Randox Laboratories, Armdore, Crumlin, UK). Koncentracije visokoosetljivog C-reaktivnog proteina (eng. high-sensitivity C-reactive protein; hsCRP) i glikoziliranog hemoglobina (HbA1c) određene su imunoturbidimetrijski (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Insulinska rezistencija procenjena je na osnovu modela za izračunavanje indeksa insulinske rezistencije (eng. homeostasis model assessment of insulin resistance; HOMA-IR). HOMA-IR je izračunat kao proizvod koncentracije glukoze (mmol/L) i koncentracije insulina (mIU/L) podeljen sa 22,5. Koncentracija rezistina određena je ELISA tehnikom (ELISA, R&D systems, Wiesbaden, Germany).

### *Statistička analiza*

Kontinuirani podaci su prikazani kao aritmetičke srednje vrednosti i standardne devijacije za normalno distribuirane varijable, te kao geometrijske srednje vrednosti i intervali pouzdanosti za varijable koje su pratile log-normalnu raspodelu. Kategorički podaci prikazani su kao absolutne frekvence. Razlike između kontinuiranih

promenljivih analizirane su Student-ovim t-testom. Za ispitivanje korelacije između različitih parametara korišćena je Pearsonova korelaciona analiza.

## Rezultati

Osnovne demografske i kliničke karakteristike ispitanika prikazane su u Tabeli I. Kao što se može uočiti na osnovu percentila BMI, svi ispitanici pripadali su kategoriji gojaznih. I ostali antropometrijski parametri upućivali su na profil koji odgovara abdominalnoj gojaznosti. Uporedivanjem koncentracija rutinskih parametara lipidnog statusa sa preporučenim vrednostima u pedijatrijskoj populaciji, utvrdili smo da je kod 63,6% ispitanika prisutna dislipidemija. Takođe, dobijene vrednosti hsCRP i mokraćne kiseline ukazuju na prisustvo inflamacije niskog stepena.

**Tabela I** Osnovne demografske i kliničke karakteristike ispitanika

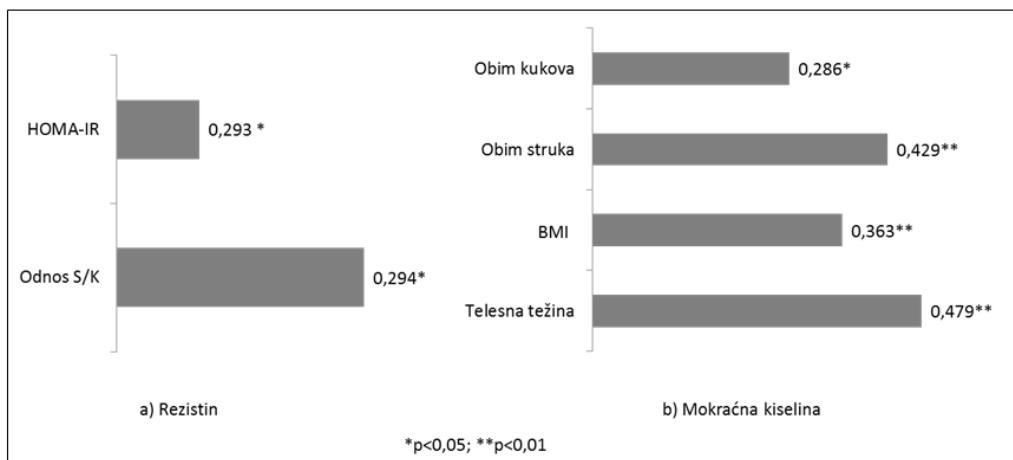
**Table I** Basic demographic and clinical characteristics of study participants

	Ispitanici
Uzrast (godine)	14,23 ± 2,09
Pol (m/ž)	46/20
Telesna visina (cm)	169,29 ± 12,02
Telesna težina (kg)	86,98 ± 18,03
Percentili za indeks telesne mase	97,0 ± 2,05
BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	30,03 ± 3,39
Obim struka (cm)	96,75 ± 8,57
Obim kukova (cm)	102,42 ± 10,37
Odnos S/K	0,95 ± 0,07
Ukupan holesterol (mmol/L)	4,32 ± 1,04
HDL-holesterol (mmol/L)	1,06 ± 0,27
LDL-holesterol (mmol/L)	2,72 ± 1,06
Trigliceridi (mmol/L)*	1,01 (0,91 – 1,13)
Glukoza (mmol/L)	4,75 ± 0,63
Hemoglobin A1c (%)	5,36 ± 0,29
HOMA-IR	3,88 ± 2,11
Rezistin (ng/mL)*	13,58 (12,18 – 15,14)
hsCRP (mg/L)*	2,69 (2,24 – 3,22)
Mokraćna kiselina ( $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	342,71 ± 78,39

Podaci su prikazani kao  $X_{sr} \pm S_d$ , ili kao apsolutne frekvence.

\* Podaci su prikazani kao geometrijske sredine i intervali pouzdanosti i log transformisani pre analize.

U nastavku istraživanja izvršili smo proveru postojanja značajnih korelacija između markera gojaznosti, inflamacije, insulinske rezistencije i dislipidemije u pedijatrijskom uzrastu. Dobijene korelacije su prikazane na Slici 1. Evaluacijom parametara gojaznosti utvrdili smo korelaciju između odnosa S/K i koncentracije rezistina, dok nije pronađena korelacija rezistina sa BMI. Takođe, ustanovili smo povezanost koncentracije rezistina sa HOMA-IR (Slika 1a). Evaluacijom markera inflamacije ustanovili smo korelaciju mokraćne kiseline sa parametrima gojaznosti (telesnom težinom, BMI, obimom struka i obimom kukova), ali ne i sa koncentracijom rezistina (Slika 1b). Tokom analize rezultata nismo ustanovili povezanost rezistina sa parametrima lipidnog statusa.



**Slika 1. Značajne korelacije rezistina i mokraćne kiseline sa parametrima gojaznosti i insulinske rezistencije**

**Figure 1. Significant correlations of resistin and uric acid with markers of obesity and insulin resistance**

Dalje istraživanje nastavili smo uporednom analizom svih ispitivanih parametara kod devojčica i dečaka. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli II. Statistički značajna razlika među polovima postoji u telesnoj visini ( $p<0,01$ ), odnosu S/K ( $p<0,001$ ), mokraćnoj kiselini ( $p<0,01$ ), kao i u HOMA-IR ( $p<0,01$ ). Nismo našli statistički značajne razlike u koncentracijama glukoze, lipidnih parametara, kao i rezistina.

**Tabela II** Razlike u antropometrijskim i kliničkim karakteristikama ispitanika podeljenih po polu**Table II** Differences in anthropometric and clinical characteristics of study participants according to gender

	<b>Devojčice</b>	<b>Dečaci</b>	<b>P</b>
Uzrast (godine)	13,78 ± 1,80	14,42 ± 2,19	0,256
Telesna visina (cm)	163,51 ± 9,15	171,80 ± 12,32	< 0,01
Telesna težina (kg)	82,28 ± 14,07	89,03 ± 19,29	0,164
Percentili za indeks telesne mase	97,30 ± 1,52	96,87 ± 2,24	0,436
Odnos obima struka i kukova	0,91 ± 0,07	0,96 ± 0,06	< 0,001
Holesterol (mmol/L)	4,31 ± 0,65	4,32 ± 1,18	0,958
HDL (mmol/L)	1,07 ± 0,30	1,05 ± 0,26	0,824
LDL (mmol/L)	2,57 ± 0,63	2,78 ± 1,20	0,455
Trigliceridi (mmol/L)*	1,01 (0,84 – 1,20)	1,05 (0,93 – 1,19)	0,305
Glukoza (mmol/L)	4,85 ± 0,57	4,71 ± 0,66	0,403
Hemoglobin A1c (%)	5,38 ± 0,29	5,36 ± 0,29	0,777
HOMA-IR	4,99 ± 2,91	3,39 ± 1,42	< 0,01
Rezistin (ng/mL)*	14.91 (11,70 – 18,99)	13.01 (11.60 - 14.65)	0,282
CRP (mg/L)*	3,03 (2,24 – 4,08)	2,41 (1,94 - 2,98)	0,378
Mokraćna kiselina (μmol/L)	304.70 ± 67.47	359.24 ± 77.67	< 0,01

Podaci su prikazani kao  $X_{sr} \pm S_d$ , ili kao absolutne frekvence.

\* Podaci su prikazani kao geometrijske sredine i intervali pouzdanosti i log transformisani pre analize.

Na kraju, uporedili smo koncentracije rezistina kod učesnika u studiji u zavisnosti od toga da li su bili klasifikovani u grupu sa ili bez prisustva dislipidemije. Kao što je već pomenuto, kod 42 ispitanika bili su zadovoljeni kriterijumi za definisanje dislipidemije. Koncentracija rezistina bila je viša kod pacijenata sa dislipidemijom, iako nije postignuta statistički značajna razlika ( $15,60$  vs  $13,67$  ng/mL,  $p=0,193$ ). Sličan trend, ali ponovo bez statističke značajnosti uočen je i kod mokraće kiseline i HOMA-IR (podaci nisu prikazani).

## Diskusija

Rezultati našeg istraživanja ukazuju na čvrstu povezanost inflamacije, dislipidemije i gojaznosti u pedijatrijskom uzrastu. Razumevanje nivoa ove povezanosti od velikog je značaja za dalje medicinsko praćenje gojazne dece i preduzimanje potrebnih preventivnih mera i koraka.

Prethodna istraživanja pokazala su da je proinflamatorni citokin rezistin faktor rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti u odrasloj populaciji (6), a slični rezultati dobijeni su nedavno i kod dece (13). Kao što je prethodno navedeno, rezistin se dovodi u vezu sa svim elementima metaboličkog sindroma. Jedan od ovih činilaca je centralni tip gojaznosti čiju su vezu sa koncentracijom rezistina pokazali Li i saradnici (8). U našem istraživanju smo ovo i potvrdili, s obzirom da je nađena značajna korelacija između koncentracije rezistina i odnosa S/K. Odnos S/K smatra se boljim indikatorom centralne gojaznosti od BMI. Činjenica da nismo našli korelaciju između BMI i rezistina potvrđuje pretpostavku da je upravo centralna gojaznost ona koja doprinosi nastanku proinflamatornog stanja (14). Dalje smo pokušali da dovedemo u vezu nivoe serumskog rezistina sa insulinskog rezistencijom, tj. vrednostima HOMA-IR i HbA1c. U ranijim istraživanjima pokazano je da ne postoji direktna korelacija rezistina sa vrednostima HOMA-IR (3). Međutim, naši rezultati sugeriraju postojanje povezanosti između ova dva markera kardiometaboličkih poremećaja, što je potrebno proveriti u budućim većim istraživanjima.

Kako je prethodno navedeno, rezistin dovodi do smanjenja broja LDL receptora i porasta koncentracije LDL-h. Međutim, u našem istraživanju nismo našli značajnu korelaciju između rezistina i bilo kog parametra lipidnog statusa, uključujući i LDL-h. Ovo bi se moglo objasniti uzrastom naših ispitanika, te sposobnošću mladog organizma da dobro kompenzuje patološke promene, što dovodi do sporog i odloženog razvoja dislipidemije. Ipak, nakon što smo podelili ispitanike prema eventualnom prisusutvu dislipidemije, uočen je trend ka višim koncentracijama ovog markera kod ispitanika sa dislipidemijom, iako bez statističke značajnosti. Izostanak statistički značajnih razlika mogao bi se ponovo objasniti specifičnostima uzrasta naših ispitanika, ali takođe i relativno malim uzorkom za analizu, tako da bi se povezanost rezistina i lipidnog statusa u pedijatrijskoj populaciji svakako trebala dodatno ispitati u većoj studiji.

Naši ispitanici imali su povišene vrednosti inflamatornih markera (Tabela I), što ukazuje na pretpostavku da je kod gojazne dece prisutan određen stepen vaskularne inflamacije i aterogeneze. Činjenica da su markeri gojaznosti pozitivno korelirali sa koncentracijama mokraćne kiseline (Slika 1b), potvrđuje od ranije poznatu povezanost inflamacije i gojaznosti, ali i ponovo naglašava mogućnost njihovog sadejstva u razvoju ateroskleroze u ranom životnom dobu.

U nastavku istraživanja fokusirali smo se na eventualne razlike u nivoima ispitivanih markera gojaznosti i kardiometaboličkog rizika kod dečaka i devojčica. Kada su u pitanju serumski lipidni parametri, nismo našli razlike između gojaznih dečaka i devojčica (Tabela II). Iako su hormonalne razlike između polova važna determinanta lipidnog statusa, naši rezultati sugerisu da kod gojazne dece ovog uzrasta njihov efekat nije još uvek dovoljno izražen. Mnoge studije su pokazale da kod odraslih osoba serumska koncentracija rezistina zavisi i od pola, tako da žene imaju tendenciju ka višim koncentracijama rezistina (8). Istraživanja vršena u pedijatrijskoj populaciji pokazala su više vrednosti rezistina kod devojčica (8), ali naši rezultati ukazuju na to da nema značajne razlike u koncentracijama ovog parametra u zavisnosti od pola, barem kada su gojazna deca u pitanju (Tabela II). Potencijalni razlog može biti i relativno mala veličina uzorka u našem istraživanju, što je moglo da utiče na statističku značajnost, naročito ako se ima u vidu da je i u našoj grupi uočen trend ka višim koncentracijama rezistina kod devojčica (Tabela II).

S druge strane, rezultati naše studije pokazuju značajno veću sklonost dečaka ka razvoju centralnog tipa gojaznosti (Tabela II). Ove rezultate treba razmatrati sa zadrškom, s obzirom da devojčice prolaze prirodne promene specifične za pubertet koje obuhvataju povećanje obima kukova i smanjenje odnosa S/K. U studiji Ninić i sar. (15), izvedenoj na zdravim ispitanicima pedijatrijskog uzrasta, pokazano je da u toku rasta dolazi do proporcionalno većeg porasta obima kukova u odnosu na struk. U skladu sa tim, uočene više vrednosti odnosa S/K kod muškog pola u našoj grupi ne bi trebalo prihvati kao definitivnu potvrdu veće prevalence abdominalne gojaznosti kod dečaka, pogotovo ako se uzme u obzir da nismo našli razlike u lipidnim parametrima između polova (Tabela II).

Dok se razlike u telesnoj visini i odnosu S/K mogu objasniti prirodnim fiziološkim promenama tokom puberteta, devojčice pokazuju veće vrednosti HOMA-IR, a dečaci statistički značajno veće vrednosti mokraćne kiseline (Tabela II). Interesantno je pomenuti da su i prethodna istraživanja ustanovila više koncentracije mokraćne kiseline kod dečaka u pubertalnom uzrastu, što je objašnjeno uticajem estrogena na ekskreciju mokraćne kiseline (16). Imajući u vidu da su naši ispitanici bili u pubertalnom uzrastu, dobijeni rezutati uklapaju se u objašnjenje koje su ponudili Kubota i saradnici (16). S druge strane, prethodna istraživanja pokazala su da uzrast značajno utiče na insulinsku rezistenciju, te da deca u pubertetu normalno prolaze kroz

fazu prolazne insulinske rezistencije, koja ne može biti u potpunosti objašnjena povećanjem BMI i adipoznog tkiva (17). Imajući u vidu ove rezultate, čini se da HOMA-IR nije adekvatan parametar za praćenje kardiometaboličkog rizika kod dece u pubertetu. Međutim, Lee i saradnici su u velikoj populacionoj studiji pokazali da gojazna deca imaju značajno više vrednosti HOMA-IR, kao i da je gojaznost najvažnija pojedinačna determinanta insulinske rezistencije (18). Takođe, ova studija (18) je ukazala na više nivoje insulinske rezistencije kod devojčica u odnosu na dečake, što je rezultat sličan našem. U ovom kontekstu značajno je pomenuti i uočeni trend ka višim koncentracijama rezistina kod devojčica (Tabela II), što može poslužiti kao indirektni dokaz za povezanost rezistina, gojaznosti i insulinske rezistencije, te njihov zajednički doprinos povećanju ukupnog kardiometaboličkog rizika u ovoj grupi.

## Zaključak

Ukupno uzevši, naši rezultati ukazuju na snažnu povezanost gojaznosti, pre svega centralnog tipa, inflamacije i dislipidemije kod dece i adolescenata. Rezistin, kao parametar koji integriše više različitih metaboličkih uticaja, mogao bi u budućnosti biti značajan klinički marker za procenu kardiometaboličkog rizika, ako bi se istraživanja u ovom smjeru nastavila. Praćenje faktora rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti kod mladih osoba je od velikog značaja jer, kao što mnoga istraživanja ukazuju, mlađe gojazne osobe poseduju uvećan rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti i insulinske rezistencije.

## Zahvalnica

Ovo istraživanje finansirano je sredstvima projekata br. 175035 i 175079 koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja.

## Literatura

1. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva, World Health Organization, 2011.
2. Lobstein T, Jackson-Leach R. Estimated burden of paediatric obesity and co-morbidities in Europe. Part 2. Numbers of children with indicators of obesity-related disease. *Int J Pediatr Obes* 2006; 1:33-41.
3. Reilly JJ, Kelly J. Long-term impact of overweight and obesity in childhood and adolescence on morbidity and premature mortality in adulthood: systematic review. *Int J Obes* 2011; 35: 891-8.
4. McCrindle BW. Cardiovascular Consequences of Childhood Obesity. *Can J Cardiol* 2015; 31: 124-30.
5. Aquilante CL, Kosmiski LA, Knutsen SD, Zineh I. Relationship between plasma resistin concentrations, inflammatory chemokines, and components of the metabolic syndrome in adults. *Metabolism* 2008; 57: 494–501.
6. Menzaghi C, Bacci S, Salvemini L, Mendonca C, Palladino G, Fontana A, et al. Serum Resistin, Cardiovascular Disease and All-Cause Mortality in Patients with Type 2 Diabetes. *PLoS ONE* 2013; 8: e64729.
7. Lee S, Lee HC, Kwon YW, Lee SE, Cho Y, Kim J, et al. Adenylyl Cyclase-Associated Protein 1 Is a Receptor for Human Resistin and Mediates Inflammatory Actions of Human Monocytes. *Cell Metab* 2014; 19: 484–97.
8. Li M, Fisette A, Zhao XY, Deng JY, Mi J, Cianflone K. Serum resistin correlates with central obesity but weakly with insulin resistance in Chinese children and adolescents. *International Journal of Obesity* 2009; 33: 424–39.
9. Melone M, Wilsie L, Palyha O, Strack A, Rashid S. Discovery of a new role of human resistin in hepatocyte low-density lipoprotein receptor suppression mediated in part by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J Am Coll Cardiol* 2012; 59: 1697–705.
10. Rizzo M, Berneis K, Zeljkovic A, Vekic J. Should we routinely measure low-density and high-density lipoprotein subclasses? *Clin Lab* 2009; 55: 421-9.
11. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ* 2000; 320: 1240–3.
12. Expert Panel on Integrated Guidelines for Cardiovascular Health and Risk Reduction in Children and Adolescents; National Heart, Lung, and Blood Institute. Expert panel on integrated guidelines for cardiovascular health and risk reduction in children and adolescents: summary report. *Pediatrics* 2011; 128: S213-56.
13. Al-Biltagi MA, Tolba OA, Mawla W, Abd El Hamed A, Ghazy M. Resistin and right ventricular function in children with recently diagnosed type-1 diabetes mellitus: a case control study. *J. Pediatr Endocrinol Metab* 2015; 28: 299-308.
14. Schmidt FM, Weschenfelder J, Sander C, Minkwitz J, Thormann J, Chittka T, et al. Inflammatory cytokines in general and central obesity and modulating effects of physical activity. *PLoS One* 2015; 10: e0121971.

15. Ninic A, Spasojevic-Kalimanovska V, Bogavac-Stanojevic N, Kotur-Stevuljevic J, Kornic-Ristovski D, Stefanovic et al. Associations between anthropometric parameters and serum lipids in preadolescent and adolescent girls and boys. *Clinical Lipidology* 2015; 10: 119-28.
16. Kubota M, Nagai A, Tang L, Tokuda M. Investigation on hyperuricemia in children with obesity or various pediatric disorders. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2011; 30: 1051-9.
17. Moran A, Jacobs DR Jr, Steinberger J, Hong CP, Prineas R, Luepker R, et al. Insulin resistance during puberty: results from clamp studies in 357 children. *Diabetes* 1999; 48: 2039-44.
18. Lee JM, Okumura MJ, Davis MM, Herman WH, Gurney JG. Prevalence and determinants of insulin resistance among U.S. adolescents: a population-based study. *Diabetes Care* 2006; 29: 2427-32.

# **Resistin, inflammation and dyslipidemia in obese children and adolescents**

**Branko Pavlović<sup>1</sup>, Jovana Milosavljević<sup>1</sup>, Aleksandra Zeljković<sup>1\*</sup>,**  
**Jelena Vekić<sup>1</sup>, Jelena Joksić<sup>1</sup>, Miron Sopić<sup>1</sup>,**  
**Vesna Spasojević-Kalimanovska<sup>1</sup>, Dušan Paripović<sup>2</sup>,**  
**Amira Peco-Antić<sup>2,3</sup>, Gordana Miloševski-Lomić<sup>2</sup>,**  
**Zorana Jelić-Ivanović<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Medical Biochemistry,  
Vojvode Stepe 450, P. Box 146; 11000 Belgrade, Serbia

<sup>2</sup> Nephrology Department, University Children's Hospital, Belgrade, Serbia

<sup>3</sup> University of Belgrade, School of Medicine, Belgrade, Serbia

\* Address for Correspondence:

Phone: (+381 11) 3951-284; Fax: (+381 11) 39-72-840 or (+381 11) 39-74-349

E-mail: aleksandra.zeljkovic@pharmacy.bg.ac.rs

---

## **Summary**

**Introduction:** Childhood obesity is related to cardiovascular diseases and diabetes mellitus type 2 in later life. Resistin, an adipokine primarily secreted by monocytes and tissue macrophages in humans, is considered to be associated with these conditions.

**The Aim:** To examine the correlations between resistin concentration and anthropometric parameters, lipid status, inflammatory markers and parameters of insulin resistance in obese children and adolescents.

**Material and Methods:** The study included 66 patients (40 boys, 26 girls), which underwent anthropometric measuring and laboratory testing (glucose level, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-cholesterol), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-cholesterol), triglycerides, uric acid, high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) and glycosylated hemoglobin (HbA1c). Insulin resistance was estimated with HOMA-IR (homeostasis model assessment of insulin resistance).

**Results:** We determined that 63.3% of our patients had dyslipidemia, while hsCRP and uric acid levels suggested an ongoing inflammation. We established that there was a correlation between resistin concentration and waist to hip ratio (WHR) ( $r=0.294$ ,  $p<0.05$ ), as well as between resistin concentration and HOMA-IR ( $r=0.293$ ,  $p<0.05$ ). Also, uric acid levels correlated with obesity parameters. While comparing parameters by gender we found a significant difference in height ( $p<0.01$ ), WHR ( $p<0.001$ ), uric acid levels ( $p<0.01$ ) and HOMA-IR ( $p<0.01$ ).

**Conclusion:** Our results show a link between obesity, inflammation and dyslipidemia in children and adolescents. In the future, resistin could become a significant clinical marker for evaluation of cardiometabolic risk.

**Keywords:** childhood obesity; resistin; inflammation; dyslipidemia.

---

## Lajmska borelioza: epidemiologija, klinička slika i terapija

Gorana Veinović, Zorica Stojić Vukanić, Jelena Antić Stanković\*

Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za mikrobiologiju i imunologiju, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

\* Autor za korespondenciju: Jelena Antić Stanković  
jelena@pharmacy.bg.ac.rs

---

### Kratak sadržaj

Lajmska borelioza je multisistemska bolest koju karakteriše širok spektar kliničkih manifestacija.

U Evropi je primarno prouzrokovana vrstama *B. afzelii*, *B. garinii* i *B. burgdorferi* sensu stricto, ali *Borrelia spielmanii*, *Borrelia valaisiana*, *Borrelia lusitaniae* and *Borrelia bissettii* se takođe navode kao retki ili potencijalni uzročnici oboljenja kod ljudi. U Severnoj Americi, kao jedini humani patogen, dokazana je vrsta *B. burgdorferi* sensu stricto. Najčešća klinička manifestacija lajmske borelioze je kožna lezija, *erythema migrans*, koja može da prođe spontano, bez terapije antibioticima. Međutim, patogen se može širiti do drugih delova kože i organa i tako prouzrokovati teže manifestacije kako na koži, tako i na nervnom sistemu, zglobovima i/ili srcu, pri čemu je terapija antibioticima neophodna. Najčešće korišćeni antibiotici u terapiji lajmske borelioze su: amoksicilin, ceftriakson, cefuroksim, doksiciklin i azitromicin.

**Ključne reči:** Lajmska borelioza, epidemiologija, klinička slika, terapija

---

Lajmska borelioza je prouzrokovana pokretljivom, spiralnom bakterijom iz kompleksa *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sensu lato-u širokom smislu), koju na ljude prenose krpelji kompleksa *Ixodes* (1,2).

## 1.Antigenske karakteristike uzročnika lajmske borelioze

Borelije su tanke, pokretljive, spiralne bakterije koje poseduju 7-10 endoflagela smeštenih u periplazmatskom prostoru koji se nalazi između spoljašnje i citoplazmatske membrane. Dužina ćelija se kreće od 5 do 30  $\mu\text{m}$ , širina od 0,2 do 0,5  $\mu\text{m}$  a broj spiralnih navoja varira od 3 do 10 (1-3). Spoljašnja membrana borelija je veoma fluidna i sadrži transmembranske i spoljašnje površinske proteine (engl. Outer surface protein, Osp) koji su po hemijskoj prirodi lipoproteini. Poznato je 6 Osp proteina: OspA, OspB, OspC, OspD, OspE i OspF (3). OspA je prisutan kod većine izolata *B. burgdorferi* sensu lato. Do ekspresija gena *ospA* dolazi u crevu krpelja, a vrlo retko pri infekciji domaćina (4). Protein OspA poseduje adhezivne osobine čime je omogućeno vezivanje za epitelne ćelije creva (5). Dok krpelj egzistira na domaćinu i hrani se, dolazi do porasta temperature u crevu krpelja na 37 °C, što za posledicu ima smanjenje ekspresije gena *ospA* što omogućava borelijama odvajanje od epitelnih ćelija creva i prelazak u pljuvačne žlezde (4,6). Pojava antitela usmerenih protiv OspA, dešava se u kasnijoj fazi bolesti (7). OspB je često izražen pri hroničnoj infekciji kod ljudi i vrlo retko ga ispoljavaju borelije prisutne u krpeljima. Ovaj protein takođe poseduje adhezivne osobine kao i protein OspA. Do pojave imunog odgovora protiv OspB dolazi u kasnim fazama bolesti (8). OspC igra važnu ulogu u prelasku borelija iz creva krpelja u pljuvačne žlezde i dalje u prelasku u domaćina (9). U toku hranjenja krpelja dolazi do povećane ekspresije proteina OspC, dok se ekspresija OspA smanjuje. Ekspresija OspC je u korelaciji sa infektivnošću borelija (10) a kod čoveka dovodi do snažanog imunskog odgovora (6).

Infekcija borelijama dovodi do specifičnog imunskog odgovora. Borelije poseduju mnoge antigene koji stimulišu imunski sistem, a produkcija specifičnih antitela nastaje sporo. Flagelin je osnovni protein borelijskih flagela, snažan je antigen i odgovoran je za nastajanje prvih antitela u toku infekcije. Pošto su neki delovi flagelina slične ili identične strukture kao i kod drugih bakterija koje poseduju flagele (treponema, enterobakterije, bacili), ta antigenska sličnost može biti uzrok lažno negativnih reakcija prilikom izvođenja seroloških testova (11).

Za nastanak imunskog odgovora nije dovoljno samo prisustvo antiga, potrebno je i da antigeni budu prisutni u dovoljnoj količini i na raspolaganju imuno-kompetentnim ćelijama. Za lajmsku boreliozu karakterističan je relativno mali broj borelija u tkivima i „prikrivanje“ na mestima koja nisu najbolje dostupna imuno kompetentnim ćelijama. Na taj način borelija sama „prikrije“ svoje antigene (npr. površinu prekrije sa sluzi ili antigene okrene unutar ćelije) tako da su prva antitela koja

se javljaju kod bolesnika, usmerena samo prema jednom ili dva borelijska antigena. Zato je za nastanak specifičnih antitela potrebno čekati više nedelja (za nastanak antitela IgM klase) ili meseci (za nastanak antitela IgG klase). Kada se imunski sistem jednom stimuliše borelijskim antigenima, stvaranje antitela postaje dinamičan proces a njihova količina u telesnim tečnostima se povećava (12).

## 2. Epidemiologija

Lajmska borelioza je najčešća bolest koju prenose krpelji na severnoj hemisferi (1). Bolest se javlja u celoj Evropi, u Severnoj Americi (od meksičke granice na jugu do južne kanadske provincije na severu), u delovima severne Afrike (Magreb) i severnoj Aziji (ruski Sibir i Daleki istok, Sahalin, Japan, Kina i Koreja). U Severnoj Americi lajmska borelioza do sada nije zabeležena samo u nekoliko saveznih država (Aljaska, Arizona, Montana, Nebraska, Novi Meksiko i Vajoming). Postojanje lajmske borelioze na južnoj hemisferi (Srednja i Južna Amerika, subsaharska Afrika, južna Azija, Australija) do danas nije pouzdano potvrđeno (13).

Incidenca lajmske borelioze povezana je sa rasprostranjeniču glavnih vektora krpelja. U Evropi je glavni vektor *I. ricinus*, u SAD *I. scapularis*, a u Aziji *I. persulcatus* (13, 14). Vrste borelija i geografska rasprostranjenost krpelja prikazani su u Tabeli I.

**Tabela I** Vrste borelija i geografska rasprostranjenost krpelja (1, 14,15)**Table I** Borrelia species and geographical distribution of ticks (1, 14, 15)

Vrsta borelija	Krpelj (glavni vektor)	Lokacija
<i>B. afzelii</i> *	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>	Evropa, Azija
<b><i>B. bavariensis</i>*</b>	<i>I. ricinus</i>	Evropa
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto*	<b>I. ricinus</b> , <b>I. scapularis</b> , <b>I. pacificus</b>	Evropa, SAD
<i>B. garinii</i> *	<i>I. ricinus</i> , <i>Ixodes persulcatus</i>	Evropa, Azija
<b><i>B. spielmanii</i>*</b>	<b>I. ricinus</b>	Evropa
<i>B. Americana</i>	<b>I. pacificus</b> , <b>I. minor</b>	SAD
<i>B. andersonii</i>	<b>I. dentatus</b>	Istočni deo SAD
<i>B. bissettii</i>	<i>I. spinipalpis</i> , <i>I. pacificus</i>	Zapadni deo SAD
<i>B. californiensis</i>	<b>I. pacificus</b> , <b>I. jellisonii</b> , <b>I. spinipalpis</b>	SAD
<i>B. carolinensis</i>	<b>I. minor</b>	SAD
<i>B. finlandensis</i>	<i>I. ricinus</i>	Evropa
<i>B. kurtenbachii</i>	<b>I. scapularis</b>	Evropa, SAD
<i>B. lusitaniae</i>	<i>I. ricinus</i>	Evropa (uglavnom Portugal)
<i>B. japonica</i>	<i>I. ovatus</i>	Japan
<i>B. sinica</i>	<i>I. persulcatus</i>	Kina
<i>B. tanukii</i>	<i>I. tanukii</i>	Japan
<i>B. turdi</i>	<i>I. turdus</i>	Japan
<i>B. valaisiana</i>	<i>I. ricinus</i>	Centralna Evropa, Irska, Velika Britanija i Azija
<i>B. yangzte</i>	<b>Haemaphysalis longicornis</b> , <b>I. granulatus</b>	Kina

\*poznati patogeni

U većini slučajeva najčešća klinička slika (*erythema migrans*) se javlja između juna i avgusta. Sezonska distribucija ekstrakutanih manifestacija je manje izražena usled varijabilnog vremenskog perioda od infekcije do pojave oboljenja, koji je obično duži nego za *erythema migrans* (16). Kliničke manifestacije su iste kod dece i kod odraslih, osim meningopoliradikuloneuritisa i *acrodermatitis chronica atrophicans* koji se ne javljaju kod dece (kod dece se češće javlja multipli *erythema migrans*); učestalost različitih kliničkih manifestacija je više varijabilna kod dece različitih starosnih grupa nego kod odraslih (17-19).

Na osnovu dostupnih nacionalnih podataka, procenjeno je da prosečan godišnji broj obolelih od lajmske borelioze u Evropi iznosi oko 85 000, dok se u SAD taj broj kreće od 15 000 do 20 000 (20,21). U Evropi je zabeležen porast učestalosti bolesti od zapada ka istoku, sa najvećem učestalošću u zemljama centralne Evrope (npr. Slovenija 155 slučajeva na 100 000 stanovnika) i najmanjom učestalošću u Velikoj Britaniji (0,7/100 000) i Irskoj (0,6/100 000). Smatra se da je realna učestalost ove bolesti mnogo veća. U nekim zemljama Evrope zabeleženo je smanjenje učestalosti bolesti: od juga ka severu (Skandinavija), i od severa prema jugu (Italija, Španija i Grčka) (21). Lajmska borelioza se registruje i u svim okruzima Republike Srbije. U toku 2013. godine prijavljeno je ukupno 942 slučaja lajmske borelioze (incidencija 13,08/100.00), što je za oko 2% manji broj registrovanih nego u 2012. godini. Najviša incidencija zabeležena je u Kolubarskom (76,25/100.000) a najniža u Jablaničkom okrugu (0,46/100.000) (22). Prijavljanje obolelih od lajmske borelioze obavezno je u samo nekoliko evropskih zemalja, pa je njenu učestalost u Evropi moguće proceniti samo približno (23).

U SAD incidencija se povećala na približno 30 000 slučajeva na 100 000 stanovnika u toku 2009. godine (32).

### 3. Klinička slika lajmske borelioze

Lajmska borelioza se manifestuje različitim kliničkim znacima i simptomima. Tok bolesti se može podeliti u tri kliničke faze: rana infekcija se manifestuje kao kožna lezija (*erythema migrans*) koja se javlja na mestu uboda krpelja (faza 1), sledi rana diseminovana infekcija u toku koje mogu biti zahvaćeni nervni sistem, koža, zglobovi i/ili srce (faza 2) i kasna zahvaćenost nervnog sistema, zglobova i kože koja se javlja u toku nekoliko meseci ili godina (faza 3) (1,2). Poređenje lajmske borelioze u Severnoj Americi i Evropi prikazano je u Tabeli II.

**Tabela II** Poređenje lajmske borelioze u Severnoj Americi i Evropi (1,2)**Table II** Comparison of Lyme borreliosis in North America and Europe (1, 2)

<b>Varijabla</b>		<b>Severna Amerika</b>	<b>Evropa</b>
<b>Koža</b>	<b>Akutna faza</b>	<i>Erythema migrans</i> se brže širi, kraće traje, inflamacija je intenzivnija; veća mogućnost hematogene diseminacije	<i>Erythema migrans</i> se sporije širi, duže traje, inflamacija je manje izražena; manja mogućnost hematogene diseminacije
	<b>Hronična faza</b>	ACA* se retko javlja	ACA
<b>Nervni sistem</b>	<b>Akutna faza</b>	Meningitis, teška glavobolja, blaga ukočenost vrata, manje istaknut radikuloneuritis	Radikularni bol i pleocitoza; manje istaknuta glavobolja i ukočenost vrata
	<b>Hronična faza</b>	<i>Blaga senzorna polineuropatijska bez ACA</i> <i>Blaga encefalopatija, kognitivni poremećaji, slaba intratekalna producija</i>	<i>Blaga senzorna polineuropatija u delovima zahvaćenim ACA</i> <i>Teški encefalomijelitis, spasticitet, kognitivni poremećaji, značajna intratekalna producija antitela antitela</i>
<b>Srce</b>	<b>Akutna faza</b>	AV* blok i miokarditis	AV blok i miokarditis
	<b>Hronična faza</b>	Nema podataka	Dilatirana kardiomiopatija
<b>Artritis</b>	<b>Akutna faza</b>	Oligoartritis se često javlja, intezivnija inflamacija zglobova	Oligoartritis se retko javlja, manje intezivna inflamacija zglobova
	<b>Hronična faza</b>	Oko 10% pacijenata sa artritisom je rezistentno na terapiju	Perzistentni artritis se retko javlja
<b>Asimptomatska infekcija</b>		Javlja se u oko 10% pacijenata	Javlja se u više od 10% pacijenata
<b>Pojava antitela</b>		Antitela usmerena na mnoge proteine	Antitela usmerena na nekoliko proteina

ACA= acrodermatitis chronica atrophicans; AV=atrioventrikularni

Od različitih objektivnih kliničkih prezentacija lajmske borelioze u Evropi, *erythema migrans* je najčešća (16,24). U ranijim studijama koje su sprovedene na pacijentima iz Evrope (25) pokazano je, da je 89% pacijenata imalo *erythema migrans*, 5% je imalo artritis, 3% je imalo rane neurološke manifestacije, 2% je imalo borelijski limfocitom, 1% je imalo *acrodermatitis chronica atrophicans*, a manje od 1% je imalo srčane manifestacije. Istraživanje pokazuje da nije bilo pacijenata sa znacima kasne neurolške borelioze. Slični podaci o učestalosti kliničkih manifestacija su pokazani i u studijama koje se sprovedene u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) (26-28) s tim da nisu zabeleženi pacijenti koji su imali borelijski limfocitom i *acrodermatitis chronica atrophicans*.

Infekcija *B. afzelii* je, uglavnom, povezana sa kožnim manifestacijama kao što su *erythema migrans* i *acrodermatitis chronica atrophicans*, dok je nalaz *B. garinii* u pozitivnoj korelaciji sa manifestacijama na nervnom sistemu (lajmska neuroborelioza). Klinička slika lajmskog artritisa je češća kada je uzročnik infekcije *B. burgdorferi* sensu stricto (1,2,29,30).

## Manifestacije na koži

*Erythema migrans* je karakteristična kožna promena koja se odnosi na rani, lokalizovani oblik lajmske borelioze (1,2). U Evropi se kao uzročnici oboljenja kod ljudi navode *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, i *B. spielmanii*, retko *B. bissettii* i *B. lusitaniae*, a najčešće izolovana vrsta je *B. afzelii* (24,29,31-35). Promena na koži kod lajmske borelioze javlja se posle nekoliko dana/nedelja na mestu uboda krpelja, a počinje kao mala crvena makula ili papula, koja se postepeno širi spolja i bledi u sredini. Nelečene lezije mogu da se prošire i da perzistiraju više nedelja ili meseci i da dostignu veličinu od nekoliko do 100 cm (1,16).

Od propratnih simptoma mogu da se javе: blag svrab, pečenje i bol na mestu uboda, umor, malaksalost, glavobolja, bolovi u mišićima i zglobovima (36).

Ukoliko iz početnog eritema dode do hematogene diseminacije borelija, može da nastane multipli *erythema migrans*. Ponekad, kliničku sliku rane lokalizovane infekcije, predstavlja borelijski limfocitom. Javlja se nekoliko nedelja nakon infekcije i može da perzistira više meseci. To je solitarna, crvenkasto-plava nodula, veličine do nekoliko centimetara, koja nastaje usled guste infiltracije limfocita u koži i potkožinom tkivu i najčešće se javlja na ušnoj školjci i bradavici (1,2,16).

Klinička slika kasnog oblika lajmske borelioze je *acrodermatitis chronica atrophicans*. Javlja se posle nekoliko meseci ili godina nakon primarne infekcije i za razliku od *erythema migrans* i borelijskog limfocitoma, ne može proći spontano (1,16).

To je dugotrajna, obično progresivna manifestacija lajmske borelioze, koja se u početku karakteriše crvenim ili crvenkasto-modrim promenama i otokom kože, obično

na ekstenzornim površinama ekstremiteta, a kasnije dolazi do atrofije kože i potkožnog tkiva, a moguća je i pojava fibroznih čvorova u koži (23).

### Lajmska neuroborelioza

Lajmska neuroborelioza je bolest centralnog i/ili perifernog nervnog sistema prouzrokovana *B. burgdorferi* sensu lato, i može biti rana ili kasna (17).

U Severnoj Americi sve manifestacije lajmske borelioze, uključujući i lajmsku neuroboreliozu prouzrokuje *B. burgdorferi* sensu stricto, dok u Evropi lajmsku neuroboreliozu najčešće prouzrokuje *B. garinii*, ređe *B. afzelii*, i retko *B. burgdorferi* sensu stricto (17,18,33,37).

Pacijenti sa kliničkom slikom borelijskog meningitisa obično imaju blage simptome a limfocitna pleocitoza je prisutna u cerebrospinalnoj tečnosti (CST) bolesnika (1,17).

U toku rane lajmske neuroborelioze mogu biti zahvaćeni motorni nervi, što za posledicu ima pareze koje su obično asimetrične. Najčešće su zahvaćeni facijalni nervi - nastaje unilateralna ili bilateralna periferna facijalna paraliza. Kod pacijenata je prisutna limfocitna pleocitoza, čak i onda kada nema kliničkih simptoma meningitisa (1,17,38,39).

Periferna neuropatija, kao posebna klinička manifestacija lajmske neuroborelioze javlja se veoma retko, mnogo češće se sreće kod pacijenata sa acrodermatitis chronica atrophicans.

Drugi redi oblici rane lajmske neuroborelioze su encefalitis i mijelitis, a veoma retko se sreće cerebralni vaskulitis (23).

### Lajmski karditis

Najčešća manifestacija infekcije na srcu su atrioventrikularni poremećaji sprovodenja (AV blokovi različitog stepena) (3,40). Kod pacijenata koji su primili antibiotsku terapiju (pa čak i kod onih koji nisu) simptomi vezani za srčane poremećaje i elektrokardiogramske abnormalnosti obično prolaze nakon 3-6 nedelja (3,40).

### Lajmski artritis

Lajmski artritis predstavlja povremenu inflamaciju jednog ili više zglobova. Nastaje kao rezultat diseminacije borelija i javlja se češće kod pacijenata u SAD i kod 70% pacijenata sa nelečenom manifestacijom *erytema migrans*. Zahvaćenost zglobova je obično asimetrična. Početak artritisa je akutan a prvenstveno su zahvaćeni koleno, lakat i skočni zglob, a ponekad i rame i kuk. Zglobovi su bolni a inflamacija traje od

nekoliko dana do nekoliko nedelja, a ponekad i do nekoliko meseci. Tok bolesti je veoma varijabilan, obično rekurentan i može trajati i po nekoliko godina (1,2,17).

## Oftalmološke manifestacije kod lajmske borelioze

Podaci o infekciji očiju su ograničeni. Infekcija očiju se javlja veoma retko i često je povezana sa drugim manifestacijama lajmske borelioze, kao što su *eritema migrans*, lajmska neuroboreloza i lajmski artritis, ali takođe može biti i posebna manifestacija bolesti. Infekcija očiju se primarno manifestuje kao keratitis, konjuktivitis i retinalni vaskultis ili sekundarno kao rezultat ekstraokularnih manifestacija lajmske borelioze kao što je pareza kranijalnih nerava (III, IV, VI I VII kranijalni nervi). Ukoliko dođe do pogrešne dijagnoze i infekcija traje duži vremenski period može rezultirati potpunim gubitkom vida (17).

## 4. Mikrobiološka dijagnoza lajmske borelioze

Mikrobiološka dijagnoza lajmske borelioze je potrebna za sve kliničke manifestacije bolesti, osim za kožnu leziju (*erythema migrans*), koja je karakteristična i najčešća klinička manifestacija rane lajmske borelioze (3,17). Postoje direktnе i indirektnе metode za dokazivanje lajmske borelioze.

### Direktno dokazivanje *B. burgdorferi* sensu lato

Za direktno dokazivanje uzročnika lajmske borelioze, primenjuju se dva različita pristupa: izolacija borelija i dokazivanje DNK borelija (12).

#### Izolacija borelija

Borelije se mogu izolovati iz različitog kliničkog materijala kao što su koža, krv, CST, sinovijalna tečnost itd. u toku rane, kao i hronične faze lajmske borelioze (12).

Izolacija borelija je najuspešnija sa kože bolesnika u ranoj fazi lajmske borelioze (kod bolesnika sa kliničkom slikom *erythema migrans*). U Evropi, prosečna uspešnost izolacije borelija iz *erythema migrans* je  $\geq 40\%$  (12,41,42), u SAD je veća od 50%, dok je prosečna uspešnost izolacije borelija u Evropi iz acrodermatitis chronica atrophicans  $\geq 22\%$  (12).

Izolacija borelija iz krvi nelečenih pacijenata u Evropi je manja od 5%. U većeni studija, u postupku izolacije borelija korišćen je mali uzorak krvi odnosno plazme volumena  $\leq 1 \text{ mL}$ . Uspešnost izolacije iz krvi je niska usled retke diseminacije borelija ili usled nedovoljne količine uzete krvi (12). *B. afzelii* je najčešće izolovana vrsta iz primarne kožne promene *erythema migrans* u Evropi ali je njena hematogena diseminacija retka (12,43).

Uspešnost izolacije borelija iz krvi (iz volumena plazme  $\geq$  9 mL) bolesnika u SAD je veća od 40%. Prosečana uspešnost izolacije borelija iz cerebrospinalne tečnosti (CST) bolesnika sa neuroboreliozom iznosi 10%. (12).

## **Identifikacija DNK borelija**

DNK borelija se dokazuje pomoću reakcije lančane polimerizacije (engl. polymerase chain reaction, PCR). U odnosu na kultivaciju, koja traje više od 9 nedelja, PCR je mnogo brža metoda koja daje rezultate u toku samo nekoliko dana, ali njen nedostatak je što nije standardizovana (12).

Pomoću PCR metode mogu se analizirati uzorci biopsije kože bolesnika, krv, CST i sinovijalna tečnost bolesnika s različitim kliničkim slikama borelijske infekcije.

U Evropi, osetljivost PCR metode za detekciju DNK *B. burgdorferi* sensu lato u uzorku kože kreće se u rasponu 36-88% za *erythema migrans*, i u rasponu 54-100% za *acrodermatitis chronica atrophicans*, dok je u SAD taj raspon 59-67% za *erythema migrans*. Osetljivost PCR metode za detekciju DNK *B. burgdorferi* sensu lato u uzorku krvi i CST pacijenata sa lajmskom boreliozom je daleko niža, i u slučaju uzorka krvi iznosi 10% a 23% za uzorak CST (12).

## **Indirektno dokazivanje *B. burgdorferi* sensu lato**

Indirektne metode za dokazivanje borelijske infekcije obuhvataju serološke testove pomoću kojih se dokazuju antitela specifična za borelije u serumu, likvoru ili sinovijalnoj tečnosti.

IgM i IgG antitela mogu se odrediti testovima indirektne imunofluorescencije (IFT), enzimskim imunotestovima (ELISA), imunoblot testom (Western blot), ili testovima hemaglutinacije. Nedostaci seroloških testova su da nisu standardizovani, kao i razlike u specifičnosti i osetljivosti pojedinih testova (12).

## **5. Terapija lajmske borelioze**

Kod većine pacijenata terapija lajmske borelioze je uspešna uz primenu preporučenih antibiotika (16,44-46). U lečenju lajmske borelioze se koriste antibiotici koji su se prethodno pokazali efikasnim protiv borelija u *in vitro* studijama. Mnoga *in vitro* istraživanja su pokazala da su borelije koje uzrokuju lajmsku boreliozu osetljive na širok spektar antimikrobnih agenasa uključujući amoksicilin, azitromicin, ceftriakson, cefuroksim, doksiciklin, penicilin G, itd. (47-52). *In vitro* testiranje osetljivosti *B. burgdorferi* sensu lato na antibiotike uvek je bilo ograničeno usled: malog broja izolata na raspolaganju u pojedinim studijama, retkog izvođenja testa na sojevima neposredno izolovanih od pacijenata koji su rezistentni na terapiju i/ili zbog toga što sama

metodologija nije standardizovana. Neke *in vitro* studije navode postojanje razlike između pojedinih vrsta borelija u osetljivosti na antibiotike (49,50,52,53) kao i postojanje različitog efekta antibiotika na različite sojeve unutar iste vrste (54), dok neke druge studije negiraju postojanje razlika između vrsta (55).

Iako u većini slučajeva *erythema migrans* spontano nestaje, oralna antibiotska terapija se preporučuje kako bi se sprečila diseminacija i razvoj kasnijih komplikacija (Tabela 3). Doksiciklin, amoksicilin, fenoksimetilpenicilin i cefuroksim acetil su visoko efikasni antibiotici i koriste se kao prva linija lekova u terapiji različitih kliničkih manifestacija lajmske borelioze. Makrolidi, kao što je azitromicin, manje su efikasni nego oralni antibiotici prve linije i primenjuju se kao druga linija lekova u terapiji lajmske borelioze (16,45). Parenteralna antibiotska terapija je preporučena za lečenje kasne lajmske neuroborelioze. Antibiotik izbora je ceftriakson jer prolazi krvnomoždanu barijeru i ima dugo poluvreme eliminacije, usled čega je moguća njegova primena jednom dnevno. Alternativni izbor za parenteralnu terapiju su cefotaksim i intravenski penicilin (16).

Uprkos antibiotskoj terapiji, kod nekih pacijenata se razvija hronična infekcija usled sposobnosti borelija da perzistiraju u latentnom stanju, a perzistencija borelija može se potvrditi njihovom izolacijom iz kliničkog materijala nakon antibiotske terapije (56), dok je kod nekih drugih pacijenata terapija uspešna tek nakon ponovljenog ili produženog davanja antibiotika (2,16).

Primena antibiotika je korisna u svim fazama lajmske borelioze i za sve kliničke manifestacije iako je najefikasnija u toku rane faze bolesti. Najefektivniji antibiotik i optimalna doza, kao i najoptimalnije trajanje terapije još uvek nisu precizno utvrđeni za mnoge kliničke manifestacije bolesti (46). Preporučena terapija za sve faze lajmske borelioze (rana lokalizovana, rana diseminovana i kasna faza lajmske borelioze) prikazana je u Tabeli 3.

**Tabela III** Preporučena terapija kod pacijenata sa lajmskom borelioza (16)**Table III** Recommended treatment for patients with Lyme borreliosis (16)

	Aplikacija	Trajanje	Komentar
<b>Rana lokalizovana i rana diseminovana lajmska borelioza</b>	Erythema migrans	Oralna†‡	14 dana 10-dnevna terapija sa doksiciklinom je efikasna u SAD ali ne i sa drugim antibioticima.
	Meningitis/radikulopatija	Parenteralna§/doksiciklin‡	Evropske studije pokazuju da je oralna terapija doksiciklinom efikasna kao i parenteralna.
	Zahvaćenost kranijalnih nerava	Oralna†‡	Ograničeni dokazi o efikasnosti oralnih antibiotika u terapiji kranijalne neuropatije.
	Srčana oboljenja	Oralna†‡/parenteralna§	Ograničeni dokazi o terapiji.
	Borelijski limfocitom	Oralna†‡	Malo je dostupnih informacija o terapiji. Koristi se isti pristup kao i u terapiji erythema migrans. Nije zabeležen u Severnoj Americi.
<b>Kasna lajmska borelioza</b>	Artritis bez neuroloških oboljenja	Oralna	28 dana Kod pacijenata se istovremeno primenjuju i NSAIL.
	Rekurentni artritis posle jedne doze oralne terapije	Oralna/parenteralna§	28 dana oralno ili 14-28 dana parenteralno Parenteralna terapija kada pacijenti ne reaguju na oralnu.
	Antibiotik-refraktorni artritis	Simptomatska terapija¶	Po potrebi Antibiotik-refraktorni lajmski artritis je definisan kao perzistentni sinovitis najmanje 2 meseca nakon završetka intravenske terapije sa ceftriaksonom
	Oboljenje centralnog/perifernog nervnog sistema	Parenteralna§	14-28 dana Nema studija koje porede 14-dnevnu i 28-dnevnu terapiju.
	Acrodermatitis chronica atrophicans	Oralna	21-28 dana Nema studija koje porede 21-dnevnu i 28-dnevnu terapiju. Retko se javlja u Severnoj Americi.

†Preferirana oralna terapija: doksiciklin (odrasli-100 mg dva puta dnevno; deca  $\geq$  8 godina starosti -4 mg/kg na dan podeljeno u dve doze dnevno [maksimalna doza=100 mg dva puta dnevno]); amoksicilin (odrasli-500 mg tri puta dnevno; deca-50 mg/kg na dan podeljeno u tri doze dnevno [maksimalna doza=500 mg tri puta dnevno]); fenoksimetilpenicilin (odrasli-500-1000 mg tri puta dnevno; deca-100 mg/kg na dan podeljeno u tri doze dnevno [maksimalna doza =1000 mg tri puta dnevno]); cefuroksim aksetil (odrasli-500 mg dva puta dnevno; deca-30 mg/kg na dan podeljeno u dve doze dnevno [maksimalna doza 500 mg dva puta dnevno]). Alternativna oralna terapija (za pacijente kod kojih se ne mogu primeniti doksiciklin, amoksicilin, fenoksimetilpenicilin, i cefuroksim acetil); azitromicin (odrasli-500 mg jednom dnevno; deca-10 mg/kg na dan [maksimalna doza =500 mg dnevno])-lek ima dugo

poluvreme eliminacije iz organizma usled čega terapija traje kraće. ¶Primena doksiciklina je kontraindikovana kod dece mlađe od 8 godina, u trudnoći i tokom dojenja. §Preferirana parenteralna terapija: ceftriaxon (odrasli-2 g intravenski jednom dnevno; deca-50-70 mg/kg na dan intravenski [maksimalna doza=2 g intravenski na dan]). Alternativa parenteralna terapija kod pacijenata sa normalnom renalnom funkcijom: cefotaksim (odrasli 2g svakih 8 sati intravenski); deca-150-200 mg/kg dnevno podeljeno u tri-četiri doze na dan intravenski [maksimalna doza=6 g na dan]); penicillin G (odrasli-18-24 miliona jedinica intravenski na dan podeljeno u šest dnevnih doza; deca-250 000-400 000 U/kg na dan podeljeno u šest dnevnih doza intravenski [maksimalna doza=18-24 miliona jedinica na dan]). ¶Simptomatska terapija podrazumeva primenu nesteroidnih antiinflamatornih lekova.

## 6. Prevencija lajmske borelioze

Najbolja mera prevencije lajmske borelioze je sprečavanje uboda krpelja. Kako bi se eventualno sprečio ubod krpelja potrebno je tokom boravka u prirodi izbegavati područja sa visokom travom i opalim lišćem. Takođe je potrebno nositi odeću svetlijih boja ukoliko dođe do kontakta sa krpeljom da se lakše primeti i odeću koja prekriva što veću površinu tela kako bi se izbegao kontakt, a nakon boravka u prirodi treba detaljno pregledati telo i odeću. Takođe su dostupni i repelenti čije dejstvo traje i do nekoliko sati. Ukoliko dođe do uboda krpelja, potrebno je upotrebiti dezinfikovanu pincetu kojom će se krpelj lako obuhvatiti neposredno uz površinu kože, bez stiskanja njegovog tela i laganim povlačenjem, izvući ga. Prilikom uklanjanja krpelja ne treba premazivati alkoholom i uljem, gnječiti ili izlagati plamenu. U prva 3 do 30 dana, preporučuje se posmatranje kože na mestu uboda krpelja. Crvenilo koje se pojavi tokom prvog dana na mestu uboda krpelja i traje nekoliko sati do nekoliko dana, posledica je toksične ili alergijske reakcije i nije znak rane borelijske infekcije.

## Zaključak

Izolacija kao i kultivacija borelija iz kliničkog materijala je dugotrajna, zahtevna i skupa metoda. Ovaj postupak se ipak smatra „zlatnim standardom“ za potvrđivanje infekcije uzrokovane borelijama, naročito u toku prvih nedelja, kada su serološki testovi neosetljivi.

U Republici Srbiji borelije se ne izoluju ih humanog materijala. Nemogućnost ovog vida mikrobiološke potvrde borelijske infekcije smatra se jednim nedostatkom. S druge strane, lajmska borelozoa je multisistemska bolest, nelečena može prouzrokovati brojne komplikacije, usled čega je neophodno poraditi na edukaciji stanovništva o prevenciji uboda krpelja, njegovog pravilnog odstranjivanja i posledicama koje borelije mogu da prouzrokuju ukoliko dođe do njihove diseminacije u organizmu. Prijavljivanje obolelih od lajmske boreloze je teško pratiti jer je ono obavezno u samo nekoliko zemalja Evrope. Ukoliko dođe do infekcije borelijama, neophodno je pravilno postaviti dijagnozu i odgovarajuću terapiju. Problem sa terapijom je i dalje aktuelan kako kod nas

tako i u svetu. Odgovarajući spektar antibiotika na koje su borelije osetljive je utvrđen *in vitro*, ali i dalje nije potpuno razjašnjeno da li različite vrste borelija pokazuju istu osetljivost na antibiotike i da li su različiti sojevi unutar istih vrsta različito osetljivi. Takođe se javlja i problem perzistentne borelijske infekcije i pitanje kako tretirati rezistentne sojeve? Pošto su borelije biološki raznolike bakterije, pre davanja antibiotika pacijentu, korisno bi bilo uraditi antibiogram test kako bi se s preciznošću utvrdila osetljivost posebnog soja na odgovarajući antibiotik. S druge strane, problem je što sama metodologija *in vitro* ispitivanja borelija na antibiotike nije standardizovana, pa je neophodno staviti akcenat pre svega na standardizaciju ovog postupka.

## Literatura

1. Stanek G, Strle F. Lyme borreliosis. Lancet. 2003;362:1639-1647.
2. Steere AC. Lyme disease. N Engl J Med. 2001;345:115-125.
3. Gray JS, Kahl O, Lane RS, Stanek G. Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control. CABI Publishing, New York; 2002. 368 p.
4. Pal U, de Silva AM, Montgomery RR, Fish D, Anguita J, Anderson JF, Lobet Y, Fikrig E. Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A. J Clin Invest. 2000;106:561-569.
5. Fingerle V, Laux H, Munderloh UG, Schulte-Spechtel U, Wilske B. Differential expression of outer surface proteins A and C by individual *Borrelia burgdorferi* in different genospecies. Med Microbiol Immunol. 2000;189:59-66.
6. Pal U, Fikrig E. Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in vector and vertebrate host. Microbes Infect. 2003;5:659-666.
7. Wilske B, Busch U, Fingerle V, Jauris-Heipke S, Preac-Mursic V, Rössler D, Will G. Immunological and molecular variability of OspA and OspC. Implications for *Borrelia* vaccine development. Infection. 1996;24:208-212.
8. Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, Steere AC. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. J Infect Dis. 1993;167:392-400.
9. Fingerle V, Hauser U, Liegl G, Petko B, Preac-Mursic V, Wilske B. Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. J Clin Microbiol. 1995;33:1867-1869.
10. Masuzawa T, Kurita T, Kawabata H, Yanagihara Y. Relationship between infectivity and OspC expression in Lyme disease *Borrelia*. FEMS Microbiol Lett. 1994;123:319-324.
11. Robinson JM, Pilot-Matias TJ, Pratt SD, Patel CB, Bevirt TS, Hunt JC. Analysis of the humoral response to the flagelin protein of *Borrelia burgdorferi*: cloning of regions capable of differentiating Lyme disease from syphilis. J Clin Microbiol. 1993;31:629-635.

12. Aguero-Rosenfeld M.E., Wang G., Schwartz I., Wormser G.P: Diagnosis of lyme borreliosis. Clin Microbiol Rev 2005, 18: 484-509.
13. Hubálek Z. Epidemiology of lyme borreliosis. Curr Probl Dermatol. 2009;37:31-50.
14. Steere AC, Coburn J, Glickstein L. The emergence of Lyme disease. J Clin Invest. 2004;113:1093-1101.
15. Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Oliver JH Jr. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. Ticks Tick Borne Dis. 2011;2:123-128.
16. Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F. Lyme borreliosis. Lancet. 2012;379:461-473.
17. Strle F, Stanek G. Clinical manifestations and diagnosis of Lyme borreliosis. Curr Probl Dermatol. 2009;37:51-110.
18. Ryffel K, Péter O, Rutti B, Suard A, Dayer E. Scored antibody reactivity determined by immunoblotting shows an association between clinical manifestations and presence of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, and *B. valaisiana* in humans. J Clin Microbiol. 1999;37:4086-4092.
19. Bacon RM, Kugeler KJ, Mead PS. Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for Lyme disease—United States, 1992–2006. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2008;57:1-9.
20. <http://www.cdc.gov/lyme/stats/index.html> (15.05.2015)
21. Menne B, Ebi KL. Climate change and adaptation strategies for human health. Steinkopff, Darmstadt; 2006. 449 p.
22. <http://www.batut.org.rs/index.php?content=1168> (15.05.2015)
23. Stanek G, Fingerle V, Hunfeld KP, Jaulhac B, Kaiser R, Krause A, Kristoferitsch W, O'Connell S, Ornstein K, Strle F, Gray J. Lyme borreliosis: clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. Clin Microbiol Infect. 2011;17:69-79.
24. Strle F. Lyme borreliosis in Slovenia. Zentralbl Bakteriol. 1999;289:643-652.
25. Huppertz HI, Bohme M, Standaert SM, Karch H, Plotkin SA. Incidence of Lyme borreliosis in the Wurzburg region of Germany. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999;18:697-703.
26. Steere AC, Sikand VK, Meurice F, Parenti DL, Fikrig E, Schoen RT, Nowakowski J, Schmid CH, Laukamp S, Buscarino C, Krause DS. Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein A with adjuvant. Lyme Disease Vaccine Study Group. N Engl J Med. 1998;339:209–215.
27. Sigal LH, Zahradnik JM, Lavin P, Patella SJ, Bryant G, Haselby R, Hilton E, Kunkel M, Adler-Klein D, Doherty T, Evans J, Molloy PJ, Seidner AL, Sabetta JR, Simon HJ, Klempner MS, Mays J, Marks D, Malawista SE. A vaccine consisting of recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A to prevent Lyme disease. Recombinant Outer-Surface Protein A Lyme Disease Vaccine Study Consortium. N Engl J Med. 1998;339:21–22.
28. Aucott J, Morrison C, Munoz B, Rowe PC, Schwarzwaldar A, West SK. Diagnostic challenges of early Lyme disease: lessons from a community case series. BMC Infect Dis. 2009;9:79-85.

29. Rijpkema SG, Tazelaar DJ, Molkenboer MJ, Noordhoek GT, Plantinga G, Schouls LM, Schellekens JF. Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. *Clin Microbiol Infect.* 1997;3:109-116.
30. van Dam AP, Kuiper H, Vos K, Widjojokusumo A, de Jongh BM, Spanjaard L, Ramselaar AC, Kramer MD, Jankert J. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestation of Lyme borreliosis. *Clin Infect Dis.* 1993;17:708-717.
31. Wang G, van Dam AP, Schwartz I, Dankert J. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12:633-653.
32. Collares-Pereira M, Couceiro S, Franca I, Kurtenbach K, Schäfer SM, Vitorino L, Gonçalves L, Baptista S, Vieira ML, Cunha C. First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1316-1318.
33. Fingerle V, Schulte-Spechtel UC, Ružić-Sabljić E, Leonhard S, Hofmann H, Weber K, Pfister K, Strle F, Wilske B. Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int J Med Microbiol.* 2008;298:279-290.
34. Ružić-Sabljić E, Maraspin V, Lotrič-Furlan S, Jurca T, Logar M, Pikelj-Pečnik A, Strle F. Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from human material in Slovenia. *Wien Klin Wochenschr.* 2002;114:544-550.
35. Maraspin V, Ružić-Sabljić E, Strle F. Lyme borreliosis caused by *Borrelia spielmanii*. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:1177-1183.
36. Strle F, Nelson JA, Ružić-Sabljić E, Cimperman J, Maraspin V, Lotrič-Furlan S, Cheng Y, Picken MM, Trenholme GM, Picken RN. European Lyme borreliosis: 231 culture-confirmed cases involving patients with erythema migrans. *Clin Infect Dis.* 1996;23:61-65.
37. Strle F, Ružić-Sabljić E, Cimperman J, Lotric-Furlan S, Maraspin V. Comparison of findings for patients with *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* isolated from cerebrospinal fluid. *Clin Infect Dis.* 2006;43:704-710.
38. Lotrič-Furlan S, Cimperman J, Maraspin V, Ružić-Sabljić E, Logar M, Jurca T, Strle F. Lyme borreliosis and peripheral facial palsy. *Wien Klin Wochenschr.* 1999;111:970-975.
39. Kristoferitsch W. Neurological manifestations of Lyme borreliosis: clinical definition and differential diagnosis. *Scand J Infect Dis.* 1991;77:64-73.
40. Scheffold N, Herkommer B, Kandolf R, May AE. Lyme carditis-diagnosis, treatment and prognosis. *Dtsch Arztbl Int.* 2015; 112(12):20220-2028.
41. Ružić-Sabljić E, Lotrič-Furlan S, Maraspin V, Cimperman J, Logar M, Jurca T, Strle F. Comparison of isolation rate of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in MKP and BSK-II medium. *Int J Med Microbiol.* 2006;296:267-273.
42. Carlsson SA, Granlund H, Jansson C, Nyman D, Wahlberg P. Characteristics of erythema migrans in *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii* infections. *Scand J Infect Dis.* 2003;35:31-33.

43. Strle F, Nadelman RB, Cimperman J, Nowakowski J, Picken RN, Schwartz I, Maraspin V, Aguero-Rosenfeld ME, Varde S, Lotrič-Furlan S, Wormser GP. Comparison of culture-confirmed erythema migrans caused by *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in New York State and by *Borrelia afzelii* in Slovenia. *Ann Intern Med.* 1999;130:32-36.
44. Girschick HJ, Morbach H, Tappe D. Treatment of Lyme borreliosis. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:258-265.
45. Wormser GP, Nadelman RB, Dattwyler RJ, Dennis DZ, Shapiro ED, Stere AC, Rish TJ, Rahn DW, Coyle PK, Persing DH, Fish D, Luft BJ. Practice guidelines for the treatment of Lyme disease. *Clin Infect Dis.* 2000;31:S1-14.
46. Strle F. Principles of the diagnosis and antibiotic treatment of Lyme borreliosis. *Wien Klin Wochenschr.* 1999;111:911-915.
47. Ates L, Hanssen-Hübner C, Norris DE, Richter D, Kraiczy P, Hunfeld KP. Comparison of in vitro activities of tigecycline, doxycycline, and tetracycline against the spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Ticks Tick Borne Dis.* 2010; 1(1):30-34.
48. Ružić-Sabljić E, Podreka T, Maraspin V, Strle F. Susceptibility of *Borrelia afzelii* strains to antimicrobial agents. *Int J Antimicrob Agents.* 2005;25:474-478.
49. Sicklinger M, Wienecke R, Neubert U. In vitro susceptibility testing of four antibiotics against *Borrelia burgdorferi*: a comparison of results for the three genospecies *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, and *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1791-1793.
50. Hunfeld KP, Kraiczy P, Wichelhaus TA, Schäfer V, Brade V. Colorimetric in vitro susceptibility testing penicillins, cephalosporins, macrolides, streptogramins, tetracyclines, and aminoglycosides against *Borrelia burgdorferi* isolates. *Int J Antimicrob Agents.* 2000;15:11-17.
51. Veinović G, Cerar T, Strle F, Lotrič-Furlan S, Maraspin V, Cimperman J, Ružić-Sabljić E. In vitro susceptibility of European human *Borrelia burgdorferi* sensu stricto strains to antimicrobial agents. *Int J Antimicrob Agents.* 2013; 41:288-291.
52. Hunfeld KP, Kraiczy P, Wichelhaus TA, Schäfer V, Brade V. New colorimetric microdilution method for in vitro susceptibility testing of *Borrelia burgdorferi* against antimicrobial substances. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19:27-32.
53. Morgenstern K, Baljer G, Norris DE, Kraiczy P, Hanssen-Hübner C, Hunfeld KP. In vitro susceptibility of *Borrelia spielmanii* to antimicrobial agents commonly used for treatment of Lyme disease. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:1281-1284.
54. Preac- Mursic V, Marget W, Busch U, Pleterski-Riegler D, Hagel S. Kill kinetics of *Borrelia burgdorferi* and bacterial findings in relation to the treatment of Lyme borreliosis. *Infection.* 1996;24:9-16.
55. Baradaran-Dilmaghani R, Stanek G. In vitro susceptibility of thirty *Borrelia* strains from various sources against eight antimicrobial chemotherapeutics. *Infection.* 1996;24:60-63.
56. Maraspin V, Ružić-Sabljić E, Strle F, Cimperman J, Jereb M, Preac-Mursic V. Persistence of *Borrelia burgdorferi* after treatment with antibiotics. *Alpe Adria Microbiol J.* 1995;3:211-216.

# Lyme borreliosis- epidemiology, clinical manifestations and treatment

Gorana Veinović, Zorica Stojić Vukanić, Jelena Antić Stanković\*

University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Microbiology and Immunology, 450 Vojvode Stepe, 11221 Belgrade, Serbia

\*Corresponding author: Jelena Antić Stanković  
jelena@pharmacy.bg.ac.rs

---

## Summary

Lyme borreliosis is a multisystem disorder characterized by a wide spectrum of clinical manifestations. In Europe, the main aetiological agents are *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* and *B. burgdorferi* sensu stricto, but *Borrelia spielmanii*, *Borrelia valaisiana*, *Borrelia lusitaniae* and *Borrelia bissettii* have also been reported as rare or potential causes of human disease. In North America, *B. burgdorferi* sensu stricto is the only human pathogen. The most common clinical manifestation of Lyme borreliosis is a skin lesion, *erythema migrans*, which may resolve spontaneously without antibiotic treatment. **However**, the pathogen *can spread to other tissues and organs*, causing more *severe manifestations* that *can* involve a *skin, nervous system, joints*, and/or *heart*, requiring antibiotic therapy. The most commonly used antibiotics in the treatment of Lyme borreliosis are: amoxicillin, ceftriaxone, cefuroxime, doxycycline and azithromycin.

**Keywords:** Lyme borreliosis, *epidemiology, clinical manifestations, treatment*

---

## **Prilozi – Contributions**

### **Zaključci sa sastanka „Da li smo spremni za biosimilare”, održanog 28. aprila 2015. godine, u Beogradu**

Sekcija za farmakoekonomiju Saveza farmaceutskih udruženja Srbije (SFE SFUS) organizovala je 28. aprila 2015. godine u Beogradu međunarodnu konferenciju sa temom: „Da li smo spremni za biosimilare?“.

Biološki lekovi su u poslednjih 30 godina doveli do značajnog unapređenja lečenja mnogih bolesti, pre svega u oblasti onkologije i imunologije ali i metaboličkih, degenarativnih i drugih oboljenja. Po isticanju patentne zaštite originalnog biološkog leka moguća je registracija biološki sličnih lekova, odnosno biosimilara. Imajući u vidu potencijalno nižu cenu biosimilara te rastuće potrebe u lečenju zapaljenskih, malignih i imunoloških oboljenja, ulazak ovih lekova na tržište može doneti uštede zdravstvenim sistemima i poboljšati dostupnost lečenja obolelima. Evropska agencija za lekove je među prvima izdala niz smernica kojima je dala zakonski regulatorni okvir za registraciju biosimilara. Ipak, određene teme, kao što je međusobna zamenljivost i automatska supstitucija, nisu obrađene ovim dokumentima, već je odluka ostavljena regulatornim telima zemalja članica.

Cilj konferencije je bio da se svim zainteresovanim akterima pruži prilika da se upoznaju sa relevantnim informacijama u vezi sa specifičnostima ovih lekova, regulatornim okvirima i iskustvima u zemlji, regionu i Evropskoj uniji.

Prvo predavanje na temu „*Šta su to biosimilari prema definiciji različitih regulatornih tela (EMA, FDA)*“ održala je dr sc. Rieke Alten, šef Odeljenja za internu medicinu, reumatologiju, kliničku imunologiju i osteologiju na Schlosspark-Klinik, bolnice Charite u Berlinu, u Nemačkoj. Biosimilari (biološki slični lekovi) nisu identični originalnom biološkom leku te se ne mogu smatrati generičkim lekovima. Razlog ovome je kompleksnost bioloških lekova, njihova veličina, struktura, proces

razvoja i proizvodnja. Biološki lekovi se proizvode u živim, biološkim sistemima i upravo zbog ovoga biosimilar ne može biti identična kopija originalnog biološkog leka.

Zbog ovih specifičnosti nametnula se potreba posebnog regulatornog okvira za registraciju biosimilara. Evropska agencija za lekove je 2005. prva donela smernice u ovom polju, na koje su se kasnije oslanjala regulatorna tela u drugim regionima u svetu. Ove smernice i vodiči se i dalje razvijaju i redefinišu. Cilj razvojnog programa biosimilara je da pokaže biološku sličnost (Biosimilarity) originalnom leku, dok nije potrebno ponavljanje čitavog kliničkog programa. Kliničke studije u ovom slučaju potvrđuju bezbednost i efikasnost u populaciji obolelih, ali u kom obimu će se lek ispitivati zavisi od brojnih faktora i odlučuje se po principu „od slučaja do slučaja“.

Iako regulatorni okvir EMA daje smernice za razvoj i registraciju biosmilara, mnoga pitanja (ekstrapolacija, međusobna zamenljivost, automatska zamena, ime) i dalje zahtevaju razmatranje svetskih i lokalnih stručnih i regulatornih tela. Rieke Alten je pokazala primere stavova različitih strukovnih udruženja po pitanju biosimilara sa posebnim osvrtom na gore pomenute nedoumice.

Prof. Silvio Danese, generalni sekretar Evropskog udruženja za Kronovu bolest i kolitis (ECCO), predstavio je upotrebu biosimilara iz perspektive gastroenterologa. Prof. Danese je u svom predavanju pokazao rezultate ankete sprovedene 2013. godine među više od 300 evropskih stručnjaka koji se bave lečenjem inflamatornih bolesti creva (IBD). Rezultati ankete su pokazali da su IBD stručnjaci dobro informisani o biosimilarama te da ih vide kao priliku za snižavanje troškova lečenja, međutim većina ispitanika smatra da originalni i biološki slični lek nisu međusobno zamenljivi ukoliko ne postoje jaki dokazi o sličnosti u svakoj od odobrenih indikacija. Takođe, većina je odgovorila da se ne oseća sigurno u vezi sa kliničkom primenom biosimilara. Oslanjajući se na rezultate ankete i dostupne podatke Evropsko udruženje za Kronovu bolest i kolitis 2013. godine objavilo je svoj stav o upotrebi biosimilara u lečenju inflamatornih bolesti creva. ECCO smatra da ekstrapolacija indikacija u inflamatornim bolestima creva nije prihvatljiva, s obzirom da pokazana efikasnost biosimilara u jednoj indikaciji ne znači nužno da je efikasan i u drugim indikacijama za koje je originalni lek odobren. Potrebni su specifični dokazi dobijeni u studijama rađenim o inflamatornim bolestima creva kako bi se utvrdila efikasnost i bezbednost, jer ih je nemoguće predvideti na osnovu podataka dobijenih o drugim indikacijama. Međusobna zamena originalnog leka i biosimilara je moguća samo na osnovu mišljenja lekara i uz upoznavanje pacijenta sa intervencijom. Kliničke studije moraju biti dizajnirane tako da identifikuju česta neželjena dejstva i biološku sličnost. Različit INN originalnog i biološki sličnog leka je potreban radi praćenja neželjenih dejstava i sledljivosti svakog

leka ponaosob. Iako su bolja dostupnost adekvatne biološke terapije kao i uštede bitni, osnovni vodiči prilikom donošenja odluka uvek moraju biti jasni naučni dokazi i princip da je oboleli na prvom mestu.

Udruženje reumatologa Srbije je na osnovu dostupnih podataka, stručnih stavova i propisa vezanih za biosimilare usvojilo i objavilo svoj stav za biosimilare koje je profesor Nemanja Damjanov, predsednik Udruženja, na konferenciji predstavio za različite dole navedene aspekte.

### **Registracija**

Biološki slični lekovi moraju da budu registrovani u Srbiji u skladu sa propisima Evropske medicinske agencije (EMA) i Američke agencije za hranu i lekove (FDA) da bi se sprečila registracija biološki sličnih lekova koji zbog svog lošeg kvaliteta mogu ugroziti efikasnost lečenja i bezbednost bolesnika kojima je neophodno biološko lečenje.

### **Ekstrapolacija indikacija**

Biološki sličan lek može da bude registrovan samo za onu indikaciju (bolest) za koju su sprovedena odgovarajuća pretklinička i klinička ispitivanja koja pokazuju da je biološki sličan lek dovoljno sličnog profila efikasnosti i bezbednosti za tu indikaciju kao i originalni biološki lek. Nije dozvoljeno automatsko prenošenje odobrenja upotrebe sa indikacije na kojoj je potvrđena biosličnost, na ostale indikacije odobrene za originalni biološki lek.

### **Medusobna zamenljivost i automatska zamena**

Osnovni stručni princip lečenja biološkim lekom jeste da se jedan biološki lek koji je efikasan i bezbedan u lečenju određenog bolesnika ne treba menjati drugim biološkim lekom, jer takvo menjanje može da dovede do nepredvidivih promena u efikasnosti i bezbednosti lečenja (pojačana imunogenost, smanjena efikasnost ili problemi sa bezbednošću vezani za novi lek). Zbog toga se ne dozvoljava promena jednog biološkog (biološki sličnog) leka drugim, ukoliko je on zadovoljavajuće efikasan ili bezbedan. Ukoliko se pokaže da je lečenje jednim biološkim lekom neefikasno ili nebezbedno, tada je neophodno zameniti ovaj lek drugim biološkim lekom, ali nikada njemu biološki sličnim lekom, ili obrnuto (nije dozvoljena zamena originalnog biološkog leka njegovim biološki sličnim lekom ili zamena biološki sličnog leka njegovim originalnim biološkim lekom).

## **Farmakovigilanca**

Radi odgovarajućeg praćenja efikasnosti i bezbednosti lečenja originalnim biološkim, odnosno biološki sličnim lekom neophodno je da se svaki od ovih lekova pojedinačno prati i posebno se beleže efikasnost i bezbednost svakog leka pojedinačno. Da bi se to obezbedilo, smatramo da je neophodno da se lek identificuje na osnovu INN broja + zaštićenog imena leka + broja proizvođačke serije (anglosaksonski: batch code). Samo tako je moguće odgovarajuće razlikovati efikasnost i bezbednost različitih serija pojedinih lekova.

Udruženje smatra da se ovi stavovi mogu menjati samo nakon prikupljanja dovoljno podataka o efikasnosti i dugoročnoj bezbednosti biološki sličnih lekova koji budu registrovani u našoj zemlji.

Gospođa Vesna Magličić, pravni savetnik, predstavila je iskustva iz Hrvatske sa javnom nabavkom bioloških i biološki sličnih lekova. Pitanje međusobne zamenljivosti postalo je aktuelno početkom 2014. godine prilikom javne nabavke bioloških (biološki sličnih) lekova. Ukoliko bi se biološki lek naveo u tenderskoj dokumentaciji pod generičkim imenom, a sve potrebne količine se nabavljaju jednim postupkom, rezultat bi bila nabavka samo jednog proizvoda, koji se nudi sa nižom cenom, bez obzira na terapiju koju su pacijenti prethodno primali. Stručna javnost se usprotivila automatskom zamenjivanju terapije što bi bila posledica nabavke isključivo jednog, jeftinijeg leka, tj. preslikavanju modela javne nabavke lekova koji imaju generičke paralele. Radi otklanjanja nedoumica u primeni javne nabavke, traženo je mišljenje Agencije za lijekove i medicinske proizvode Hrvatske (HALMED), Hrvatskog zavoda za zdravstveno osiguranje (HZZO) i Ministarstva privrede, Uprave za javna nabavke. HZZO je uputio na HALMED kao merodavan za tumačenje o zamenljivosti bioloških lekova.

HALMED je od ranije na svojoj internet stranici imao objavljene stavove o biosimilarama, uključujući i onaj o međusobnoj zamenljivosti, te se po ovom pitanju nije dodatno izjašnjavao, već uputio na ono što je objavljeno. Stav HALMEDA je da iako biološki sličan lek u osnovi ima isto kliničko dejstvo kao originalni biološki lek, ovi se lekovi ne mogu direktno međusobno zamenjivati.

Ministarstvo privrede je preporučilo da ukoliko naručilac iz opravdanih razloga u tehničkoj specifikaciji navede zaštićeno ime leka, uvek mora označiti s dodatkom ‘ili jednakovredan’ pri čemu je na ponuđaču teret dokaza jednakovrednosti leka (u skladu sa Zakonom o javnim nabavkama) Prilikom ocene jednakovrednosti leka naručilac bi

trebao koristiti stručno mišljenje nadležnih tela kao što su Agencija za lekove i medicinska sredstva. Kao rezultat stavova strukovnih udruženja, HALMED-a i preporuka Ministarstva privrede omogućena je javna nabavka leka pod zaštićenim imenom za bolesnike koji su na terapiji, dok je odvojen postupak raspisan pod generičkim imenom lekova za nove pacijente.

*Automatsku supstituciju zbog stručnih i regulatornih stavova ne odobrava većina Evropskih zemalja, a problem javnih nabavki je različito rešen. Hrvatski model nabavke mogao bi rešiti eventualni problem automatske supstitucije prilikom javne nabavke bioloških lekova u Republici Srbiji. Stručna udruženja su jasno iznela svoje stavove o upotrebi biosimilara, a sledeći korak svakako bi bio stručni stav ALIMS-a, kao krovnog regulatornog tela u zemlji.*

U zaključku konferencije navedeno je da je potrebno da strukovna udruženja i regulatorna tela u Srbiji jasno iznesu svoje stavove po pitanju bioloških i biološki sličnih lekova sa posebnim osvrtom na gore pomenute teme, a zasnovane isključivo na dostupnim naučnim i kliničkim podacima. Ovako sačinjeni stavovi bi doprineli uređenju oblasti bioloških lekova i biosimilara i pomogli donosiocima odluka da omoguće transparentan proces nabavke i obezbede optimalne terapijske opcije obolelima.

Tanja Novaković  
Predsednica Sekcije za  
farmakoekonomiju SFUS

**Izveštaj sa Prve evropske konferencije o lekovima,  
održane u Renu, 13-14. aprila 2015.**

*Milica Lukić*

U periodu od 13. do 14. aprila 2015.god. u Renu (Francuska), održana je Prva evropska konferencija o lekovima pod nazivom "*I<sup>st</sup> European Conference on Pharmaceutics – Drug Delivery*" u organizaciji APV (Internacionalnog udruženja za farmaceutsku tehnologiju *engl. International Association for Pharmaceutical Technology*), APGI (Udruženja farmaceutske galenske industrije, *fr. Association de Pharmacie Galénique Industrielle*) i A.D.R.I.T.E.F. (Italijanskog udruženja za farmaceutsku tehnologiju i regulativu, *it. Associazione Docenti e Ricercatori Italiani di Tecnologie e Legislazione Farmaceutiche*). Konferencija je organizovana tako da su se oba dana odvijale dve paralelne sesije: plenarna predavanja u amfiteatru Rojal i kratke komunikacije – usmene prezentacije postera, u amfiteatru Klovis. Izlagачi su brojnim predavanjima i sa preko 350 poster prezentacija uspeli da prikažu najrazličitije aspekte i trendove u savremenoj isporuci lekova. Više od 600 učesnika iz preko 30 zemalja imali su priliku da čuju predavanja reprezentativnih izlagača – istraživača, stručnjaka iz industrije i regulative, iz oblasti ciljane isporuke lekova, liposoma i nanočestica, oralne i pulmonarne, kao i kožne / vaginalne / rektalne / nazalne / aurikularne / okularne isporuke lekova, zatim pametnih i transdermalnih sistema za isporuku lekova i vakcina.

Profesor Patrick Couvreur, nano-onkolog, zaposlen u laboratoriji Châtenay-Malabry (Pariz, Francuska) koji je svoj istraživački rad posvetio ispitivanjima u oblasti nanomedicine, i trenutno radi na razvoju nanočestica koje ciljano napadaju ćelije kancera, održao je predavanje pod nazivom „Ciljna isporuka lekova – gde smo trenutno?“. Njegovo izlaganje, koje je bilo posvećeno nanolekovima, započelo je prikazom lekova iz ove grupe čija se registracija od strane FDA (Američke agencije za hranu i lekove) očekuje. Nanolekovi se razvijaju radi postizanja ciljane terapije, prevazilaženja rezistencije, kombinovanja različitih funkcija i konačno, da bi se napravio lek koji će reagovati na stimulus. Uz prikaz velikog broja rezultata, slušaoci su upoznati sa značajnijim novinama u oblasti ciljne isporuke lekova kao što su biotinom obložene nanočestice, koje se preko biotinskih receptora na površini ćelije kancera selektivno vezuju za nju. Ovakve su i nanočestice koje mogu da interaguju sa A $\beta$ -

peptidom i koriste se u terapiji Alzheimer-ove bolesti. Zatim nanokonjugati skvalena sa lekovima, kao multifunkcionalne nanočestice, čija se primena pokazala bezbednjom i efikasnijom od primene samog leka. Dodatno je apostrofiran savremen koncept razvoja nanouredaja koji bi reagovali na stimulus (*engl. stimuli-responsive nanodevices*).

Sledeće plenarno predavanje pod nazivom „Transdermalna isporuka lekova: tehnologija koja je sazrela i razvija se”, održao je profesor Richard Guy iz Univerziteta u Bath (Velika Britanija), koji je kao stručnjak u oblasti karakterizacije kožne barijere, transdermalne isporuke lekova, poboljšanja perkutane apsorpcije, jontoforeze, predviđanja i procene kožne penetracije i lokalne bioraspoloživosti lekova, jedan od najkompetentnijih u oblasti transdermalne isporuke lekova. U svom predavanju istakao je značaj transdermalne isporuke lekova u/kroz kožu, kao i najznačajnije faktore koji se razmatraju pri odabiru lekova za transdermalnu isporuku. Ipak, najveći deo njegovog predavanja posvećen je prikazu savremenih tehnika vizuelizacije leka u koži. *Stimulated Raman scattering* (SRS) je među tim tehnikama, a predstavlja neinvazivnu tehniku koja daje informacije o lokalnoj dispoziciji leka u i na kožnu barijeru. Ovom tehnikom mogu se videti različite brzine penetracije leka kroz folikul dlake u odnosu na intracelularni transport kroz *stratum corneum* ili taloženje leka (kao što je ibuprofen) na površini kože. Uz njegovu ličnu tvrdnju da nanočestice ostaju na površini kože, profesor Guy je dao pregled tehnika kojima se može stimulisati tj. poboljšati penetracija leka u / kroz kožu. Pored jontoforeze koja koristi uređaj koji stimuliše penetraciju, govorio je i o mikroiglama i laserima kojima se u koži formiraju pore i koje bi na taj način trebalo da poboljšavaju penetraciju leka.

Dr Michael Sournac iz laboratorije Pierre Fabre (Tuluz, Francuska) održao je predavanje pod nazivom „Transdermala isporuka lekova: sa industrijske tačke gledišta”, koje je u najvećoj meri bilo posvećeno jednoslojnim filmovima, nosačima lekovitih supstanci i njihovo proizvodnji. Odmah nakon njega predavanje je održao i predstavnik regulatornih poslova, Sean Jones iz Regulatorne agencije Velike Britanije. Njegovo predavanje „Nove smernice za kvalitet transdermalnih flastera: novi zahtevi u razvoju”, bilo je posvećeno novim smernicama i vodičima u oblasti transdermalnih sistema, pre svega flastera.

U popodnevnoj sesiji koja je bila posvećena oralnoj isporuci lekova dr Martin Lueck je izložio novije izazove sa kojima se danas suočavaju formulatori lekova sa kontrolisanim oslobođanjem za oralnu primenu. Nakon njega prof. David Brayden iz Univerziteta u Dablinu (Irska) održao je predavanje „Pitanja terapijskih indeksa kod ubrzivača penetracije oralnih peptida”. Sve veći interes za oralnom isporukom lekova, koja bi zamenila postojeću parenteralnu isporuku, doveo je do razvoja ekscipijenasa kakvi su intestinalni penetracioni ubrzivači (apsorpcioni inhenser) koji povećavaju biološku raspoloživost lekova. Oralna isporuka makromolekula kakvi su peptidi i proteini ograničena je pre-sistemskom degradacijom i lošom penetracijom duž GIT-a.

Intestinalni penetracioni inhenserji koji se intenzivno ispituju su limunska kiselina, luroil karnitin, žučna so/soli, natrijum kaprilat/kaprat i dr. Zahvaljujući primeni apsorptivnih inhenserja oralne formulacije slabo apsorptivnih peptida su se razvile u lekove koji se klinički ispituju. Najuspešniji pristup prezentiraju formulacije inkapsuliranih peptida sa zaštitnim nosačima i apsorptivnim ubrzivačima, sposobnim da brzo i reverzibilno povećaju epitelnu permeabilnost.

Dr Dejan Đurić iz Bayer-a (Berlin, Nemačka) održao je predavanje „Orodisperzibilni farmaceutski oblici“. Poslednjih godina na tržištu su se pojavile različite formulacije orodisperzibilnih formulacija lekova. Oralni liofilizati i orodisperzibilne granule, tablete ili filmovi imaju, u tom smislu, određene terapijske prednosti, i u okviru predavanja predstavljena su dostignuća kompanije Bayer na tom polju.

U okviru kratkih komunikacija u sesijama posvećenim kontrolisanoj oralnoj isporuci lekova i nanočesticama i nosačima mlađi istraživači su u okviru petnaestominutnih izlaganja prikazali deo aktuelnih istraživanja u ovim oblastima. U okviru prezentacija najzastupljenija su bila predavanja vezana za različite *dissolution* metode (ispitivanja brzine rastvaranja), tj. ispitivanja uticaja različitih faktora i razvoj novih protokola i metoda u ovoj oblasti. Grupa autora iz Italije prikazala je novi militečni kontinualni protočni uređaj koji je predložen za *dissolution* ispitivanja oralnih tankih filmova. Ovaj uređaj je dizajniran sa osnovnom idejom da reprodukuje uslove proticanja koji imitiraju fiziološke uslove u ustima. Zbog malih dimenzija u radu sa ovim uređajem nisu primećene nejasnoće vezane za uslove testiranja koje su prijavljene u izveštajima kada su ispitivanja sprovedena sa USP aparaturom 4 ili neuspjeh, što je bio slučaj sa testovima sprovedenim sa USP aparaturom 1-2. Dobijeni podaci pokazali su dobru reproduktivnost i pouzdanost. Grupa istraživača iz Nemačke (Diseldorf) prikazala je *dissolution* metod za meke sisteme za žvakanje. Ovi sistemi su osmišljeni da bi se povećala komplijansa veterinarskih lekova i za njih u Evropskoj farmakopeji ne postoji odgovarajuća monografija i tretiraju se kao oralne tablete. Međutim na ovaj način se ne mogu dobiti veoma značajni podaci, kao što je količina leka koja se oslobađa u ustima pri žvakaju. Da se ovo ne bi zanemarilo njihova metoda podrazumevala je upotrebu teksturnog analizera koji se koristi za imitiranje žvakanja.

U okviru nanočestica i nosača kratka izlaganja su uglavnom bila posvećena ispitivanjima u oblasti antikancer terapije i sistemima za isporuku ovih lekova, kao i biotehnoloških lekova.

Drugi dan konferencije posvećen „Pametnim sistemima isporuke lekova“ započeo je profesor Gianfranco Pasut sa Univerziteta u Padovi (Padova, Italija) predavanjem pod nazivom „Napredak u ciljanoj isporuci antikancer lekova uz primenu polimernih konjugata“. Istraživački interes prof. Gianfranca Pasuta u oblasti isporuke lekova usmeren je na proteine i nisko molekularne konjugate lekova sa polimerima. On je dao

pregled razvoja lekova koji se koriste u terapiji kancera od četrdesetih godina prošlog veka do danas, uz poseban osvrt na značaj nanolekova u ovoj terapiji. Kada je reč o polimernim konjugatima, iako se njihov potencijal u ciljnoj isporuci lekova intenzivno proučava, još uvek nije u potpunosti ispitana. Nešto više reči bilo je o faktorima koji imaju važnu ulogu u uspehu t.j. neuspehu konjugata lek-polimer: količina i mesto oslobađanja leka, biodistribucija (ciljanje i penetracija tumora), imunogenost (nosača), homogenost (značaj konformacije polimera), supramolekulske strukture (šta stvarno cirkuliše u krvi) i konačno cena prenosa laboratorijske proizvodnje na industrijski nivo. U početku je glavni zadatak polimera bio da povećaju rastvorljivost leka, da smanje telesni klirens i da se iskoristi efekat povećanja permeabilnosti i retencije (EPR efekat). Danas zahtevi koje treba da ispunи nosač prevazilaze jednostavne zahteve za biokompatibilnošću i adekvatnom količinom leka koja može u njega da se inkorporira, već se od nosača očekuje i dobra selektivnost, preuzimanje u ćelije, ciljna isporuka, odgovor na stimulus i samoorganizovanje. Nizom primera, odnosno rezultata, uglavnom njegove grupe saradnika, prof. Pasut je pokazao kako se mogu ispuniti pomenuti zahtevi.

Predavanje profesora Clive Roberts-a sa Notingemskog Univerziteta (Notingem, Velika Britanija) koji se bavi razvojem i primenom novih analitičkih i formulacionih strategija za razvoj lekova i medicinskih sredstava bilo je posvećeno istraživanjima novih proizvodnih postupaka baziranih na tehnikama 3D štampe (*engl. 3D printing*). Različite tehnike štampanja (2D štampa, *ink-jet* štampa, kao i 3D štampa) pokazale su da bi štampane formulacije mogle biti potencijalno dobar način za postizanje personalizovane terapije, odnosno da bi se razvojem ovih formulacija mogli dobiti personalizovani lekovi. 3D štampani lekovi koje je predstavio prof. Roberts pokazali su se, zbog prednosti u određenim aspektima (količina leka koja na ovaj način može da se inkorporira, oslobađanje lekovite supstance, određeni problemi proizvodnog procesa i dr), kao najznačajniji predstavnici štampanih formulacija.

Još jedno plenarno predavanje u podnevnoj sesiji pod naslovom „Napredak u pulmonarnoj isporuci lekova“ održao je profesor Hartmut Derendorf sa Univerziteta Florida (Florida, SAD). Kako su doziranje, bezbednost i efikasnost glavni faktori u formulisanju inhalacionih preparata, ovo predavanje bilo je posvećeno izazovima u svakoj od pomenutih oblasti uz prikaz trenutnih dostignuća koja se bave ovom problematikom. Broj lekovitih supstanci koje se unose inhalacijom intenzivno se povećava, ne samo zbog novih lekova za tretman pulmonarnih oboljenja, već i zbog lekova koji se koriste u kombinovanoj terapiji, bioloških lekova i kandidata za sistemsku isporuku preko pluća. Da bi se ovi lekovi formulisali kao inhalacioni preparati neophodno je razumevanje i dobro poznavanje njihove sudsbine u plućima, odnosno farmakokinetike i farmakodinamike. Veliki broj nedoumica i ograničen broj

podataka u ovoj oblasti ukazuju na neophodnost saradnje akademskih i industrijskih istraživača i regulatornih tela.

Popodnevna sesija bila je posvećena isporuci peptida i proteina i plenarno predavanje održao je prof. Wim Hennink sa Univerziteta u Utrehtu (Utrecht, Holandija). Njegovo predavanje, uz osvrt na značaj proteinskih i peptidnih struktura u savremenoj terapiji, u najvećoj meri, odnosilo se na različite pristupe i sisteme koji se danas razvijaju, odnosno ispituju, za upotrebu kao nosači proteinskih molekula. Značaj i karakteristike koje ovi sistemi moraju imati da bi se koristili kao nosači prikazani su kroz pregled dostignuća u ovoj oblasti.

U okviru ove sesije dr sc. Darek O Hagan iz Novartisovog sektora za vakcine održao je predavanje pod nazivom „Izazovi i prednosti ostvarene u oblasti isporuke vakcina“. Njegovo predavanje u najvećoj meri odnosilo se na prikaz trenutnog stanja u oblasti istraživanja adjuvanasa. Prve generacije adjuvanasa bazirane su na nerastvornim solima aluminijuma, emulzijama ulje u vodi i liposomima i one se već duže vreme koriste kao najznačajnija grupa adjuvanasa u registrovanim vakcinama. Poslednjih decenija tek mali broj čestičnih adjuvanasa uspeo je da napravi ograničen uspeh u kliničkim ispitivanjima. Većina adjuvanasa druge generacije sadrži potencijatore imuniteta kojima se povećava potentnost. O Hagan smatra da je važno istaći sve ono što je možda doprinelo uspehu malog broja novijih adjuvanasa, kao i da u novim tehnologijama koje se već koriste može da se nađe rešenje za neke probleme koji se sreću u formulaciji vakcina.

U okviru kratkih predavanja pod nazivom „Napredni sistemi isporuke“ predstavljeni su brojni radovi, kako onih istraživača koji se bave razvojem metoda za poboljšanje penetracije lekova kroz kožu, tako i onih koji se bave razvojem novih sistema za transdermalnu isporuku lekova. Grupa istraživača sa Univerziteta u Lionu (Francuska) ispitivala je uticaj zamrzavanja na strukturu i funkciju *stratum corneum*-a i posledice ovog postupka po rezultate *ex vivo* i *in vitro* studija permeacije lekovitih supstanci u kojima se koriste ovakvi uzorci kože. Kao što se i očekivalo, stanje kožne membrane može snažno da utiče na rezultate permeacionih studija zbog čega predstavlja ključni faktor u eksperimentalnoj proceduri. Ovaj faktor se obavezno mora uzeti u obzir pri ispitivanju perkutane apsorpcije lekova i pri poređenju rezultata iz različitih izvora. Grupa naučnika iz Japana predstavila je mezoporozne fosfolipidne čestice kao novu platformu za isporuku lekova. Ovi sistemi se zbog njihovih jedinstvenih osobina koriste u različitim oblastima. U istraživanjima isporuke lekova mezoporozne čestice mogu se koristiti kao rezervoari lekova, a njihova mala gustina može biti velika prednost u pulmonarnoj isporuci lekova jer se mogu isporučiti duboko u pluća. Ova grupa je prikazala jednostavnu proceduru za pripremu mezoporoznih čestica koje se sastoje samo od fosfolipida, i imaju veliki potencijal kao nova platforma za isporuku lekova koja može biti komparativna ili zamena postojećim tehnologijama

liposomnih materijala. Istraživači iz Kine prikazali su novu nano-termalnu i tehniku analize slike za praćenje distribucije leka unutar PLGA (*engl. poly (d,l-lactic-co-glycolic) acid*) mikrosfera, koje se poslednjih godina intenzivno koriste za kontrolisano oslobađanje lekovitih supstanci. Ova nova tehnika *Transition Temperature Microscopy* (TTM), je varijanta nanotermalne analize i u ovoj studiji je korišćena zajedno sa *Modulated Temperature Differential Scanning Calorimetry* (MTDSC). Dobijeni rezultati su pokazali da bi se ovaj analitički alat mogao više koristiti i kao skrining metoda, ali i u optimizaciji konačnog oslobađanja lekovite supstance iz mikrosfera.

Grad domaćin Rens nalazi se na 129 km udaljenosti od Pariza u oblasti Šampanj-Ardan, koja je čuvena, pre svega, po najpoznatijem penušavom vinu Francuske – šampanjcu. Ovaj gradić, koji su osnovali drevni Gali, ima dugu istoriju, a do izgradnje Versajskog dvorca ceremonija krunisanja odvijala se u katedrali u Renu. Ova katedrala koja se zove kao i čuvena pariska *Notr-Dam* katedrala, datira iz 13.veka i urađena je u gotskom stilu, i jedna je, od čak, tri građevine koje se nalaze u Renu, a pod zaštitom su UNESCO-a. To su još i *Palais du Tau*, rezidencija renskih biskupa, danas pretvorena u muzej, i samostan Sv. Rena iz 6. veka. Pored ovih znamenitosti, ljupkost i šarm Rensa upotpunili su opšti veoma dobar utisak vezan za celokupnu organizaciju prve evropske konferencije o lekovima.