

Az epesavak sejtmembrán károsító hatásai

1. Bevezetés

Az elmúlt három évtizedben került az epesavak farmakológiai alkalmazhatósága a kutatások középpontjába.¹⁻⁷ Hidrofób epesavak jelenlétekor egyes hidrofíl gyógyszerek sejtmembrán flukszusa megnövekszik.¹ Az epesavak hatásmechanizmusa abban nyilvánul meg, hogy a sejtmembránban a vizsgált gyógyszerekkel az epesavak reverz micellákat vagy hidrogénhidas komplexeket alkotnak.^{1,3,7,8} Az irodalomban felmerült egy másik alternatív mechanizmus megvalósíthatóságának kérdése is, mely szerint az epesavak, mint felületaktív vegyületek, a sejtmembrán lipid alkotóelemivel egyes micellákat képeznek, miközben megnövelik a membrán fluiditását, azaz a permeabilitását.³ E mechanizmus az epesavak sejtmembrán károsító hatásainak az alapja, mert úgymond „lyukakat” hoznak létre a sejtmembránon.⁹ Az epesavak membránkárosító hatásait *in vitro* kísérleti feltételek mellett a hemolitikus potenciál fejezi ki, míg *in vivo* kísérleti körülmények között az ozmótikus ellenálás.¹⁰ Munkánk célja feltárni az epesav molekulák szerkezete és membránkárosító hatásaik közötti összefüggést.

2. Az epesavak mint amfifil molekulák

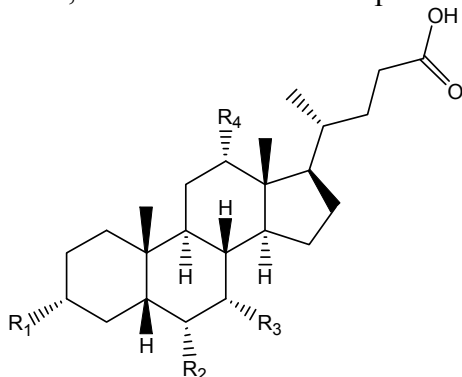
A vizsgált epesavak az 5 β -kolánsav hidroxi és keto (oxo) származékai (1. ábra). Ismeretes, hogy az O (OH, O) atomok lehetséges térbeli helyzetei határozzák meg a szteroidváz hidrofób – hidrofíl tulajdonságát,^{11,12} így a vizsgált epesavak membránkárosító hatásait is.

Ha az epesav hidroxid csoportja α axiális (a) helyzetű, akkor a hidroxid csoport a molekula hidratációs rétegéből csak a szteroidváz konkáv felület felőli vízmolekulákat stabilizálhatja hidrogén kötésekkel.

* Dr. Pósa Mihály, egyetemi docens, Újvidéki Egyetem, Orvostudományi Kar, Gyógyszerésztudományi Tanszék, Újvidék

** Farkas Zita, PhD hallgató, Újvidéki Egyetem, Orvostudományi Kar, Gyógyszerésztudományi Tanszék, Újvidék

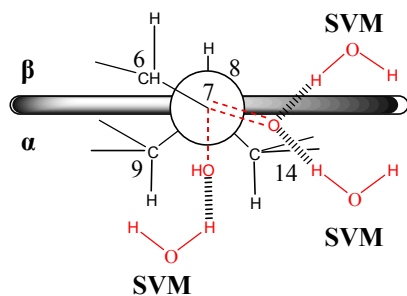
Ellenben, az α ekvatoriális orientációjú hidroxid csoport képes hidrogén kötést létesíteni a szteroid gyűrűrendszer konvex felületén lévő vízmolekulákkal is (2. ábra). Tehát, az ekvatoriális hidroxid csoporttal rendelkező epesav hidrofilebb, mint az axiális OH csoporttal rendelkező.¹¹⁻¹³



$R_1 = R_4 = \text{OH}; R_2 = R_3 = \text{H}$	3 α ,12 α -dihidroxi-5 β -kolánsav (deoxikólsav); DC; 1
$R_1 = R_3 = \text{OH}; R_2 = R_4 = \text{H}$	3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -kolánsav (kenodeoxikólsav); CD; 2
$R_1 = R_3 = R_4 = \text{OH}; R_2 = \text{H}$	3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -kolánsav (kólsav); C; 3
$R_1 = R_4 = \text{OH}; R_3 = \text{=O}; R_2 = \text{H}$	3 α ,12 α -dihidroxi-7-oxo-5 β -kolánsav; 7-OD; 4
$R_1 = R_3 = \text{OH}; R_4 = \text{=O}; R_2 = \text{H}$	3 α ,7 α -dihidroxi-12-oxo-5 β -kolánsav; 12-OCD; 5
$R_4 = \text{OH}; R_1 = R_3 = \text{=O}; R_2 = \text{H}$	12 α -hidroxi-3,7-dioxo-5 β -kolánsav; 12OH-3,7-DOC; 6
$R_1 = \text{OH}; R_3 = R_4 = \text{=O}; R_2 = \text{H}$	3 α -hidroxi-7,12-dioxo-5 β -kolánsav; 7,12-DOL; 7
$R_1 = R_3 = R_4 = \text{=O}; R_2 = \text{H}$	3,7,12-trioxo-5 β -kolánsav; 3,7,12-TOC; 8
$R_1 = \text{OH}; R_4 = \text{=O}; R_2 = R_3 = \text{H}$	3 α -hidroxi-12-oxo-5 β -kolánsav; 12-OL; 9
$R_1 = R_4 = \text{=O}; R_2 = R_3 = \text{H}$	3,12-dioxo-5 β -kolánsav; 3,12-DOC; 10
$R_1 = \text{OH}; R_3 = \text{=O}; R_2 = R_4 = \text{H}$	3 α -hidroxi-7-oxo-5 β -kolánsav; 7-OL; 11
$R_1 = R_3 = \text{=O}; R_2 = R_4 = \text{H}$	3,7-dioxo-5 β -kolánsav; 3,7-DOC; 12
$R_1 = R_2 = R_4 = \text{OH}; R_3 = \text{H}$	3 α ,6 α -trihidroxi-5 β -kolánsav; HD; 13

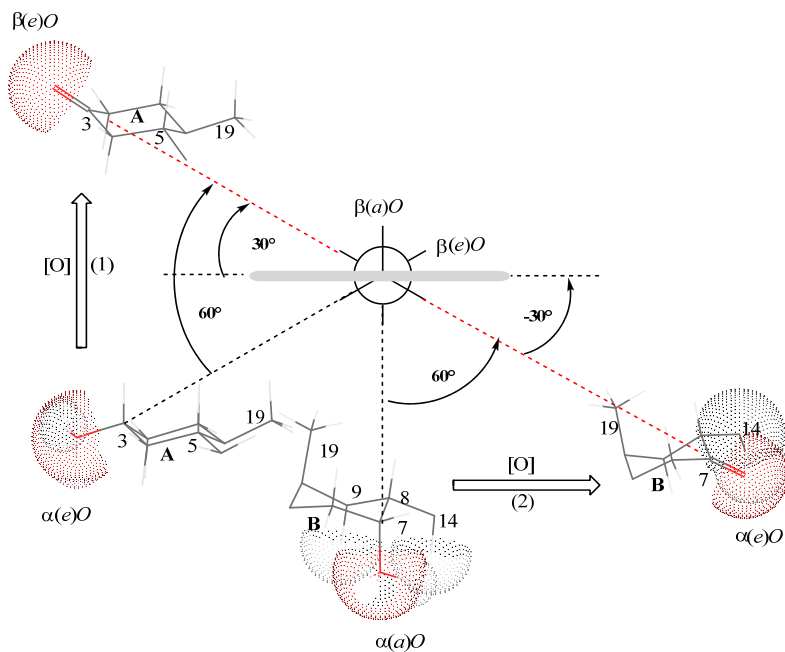
1. ábra
A 5 β -kolánsav hidroxid és oxo származékai

Az epesav hidroxid csoportjának oxidációja során (ekvatoriálisnál és axiálisnál egyaránt), a Newman projekciós ábrázolás szerint, a kapott oxo csoport oxigén atomja a kiinduló hidroxid csoport oxigén atomjához képest 60°-al elmozdul, azaz közeledik a szteroidváz β oldalán lévő anguláris metil csoportok felé (3. ábra). A 3. ábra mutatja, hogy az α axiális hidroxid csoport oxidációjakor a keletkezett oxo csoport α ekvatoriális helyzetű.



2. ábra

Az epesav hidroxi és oxo csoportja térbeli helyzetének hatása a hidratációs réteg vízmolekuláinak stabilizációjára, SVM – hidrogén kötéssel stabilizált vízmolekula



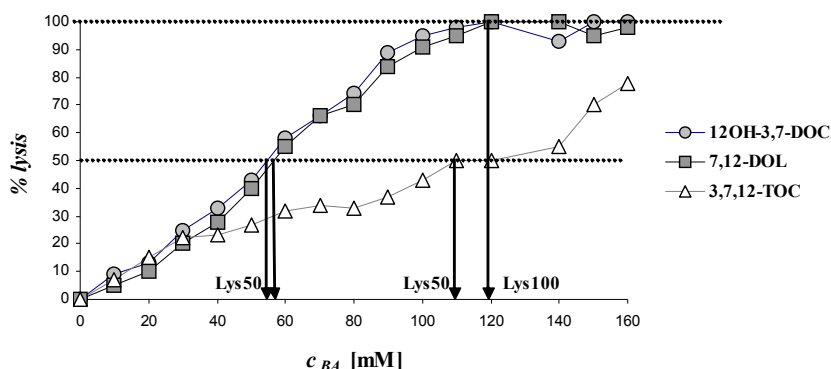
3. ábra

Az epesavmolekula ekvatoriális (1) és axiális (2) hidroxid csoportjának oxidációja

Az epesavak hidroxid csoportjának oxo csoporttal történő szubsztitúciója megnöveli a molekulák hidrofil tulajdonságát, amiből az következik, hogy kritikus micelláris koncentrációjuk szintén növekszik, azaz csökken az önszerveződésre (aggregátumok képződésére) való hajlamuk.¹²

3. A hemolitikus potenciál

A hemolitikus potenciál megállapításakor az oldatban, meghatározott mennyiségű eritrocita jelenlétében, fokozatosan növeljük a vizsgált epesav nátriumsójának koncentrációját, miközben mérjük a vörösvérsejtekből felszabaduló hemoglobin mennyiségét. A kísérleti eredményeket grafikusan ábrázoljuk: az eritrociták felbomlott hányada (ami arányos az oldat hemoglobin koncentrációjával) az epesav nátriumsójának a koncentráció függvényében (4. ábra).¹

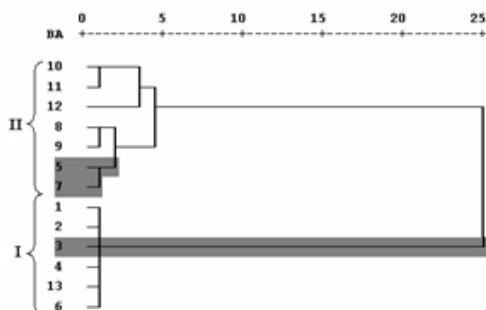


4. ábra

Néhány epesav hemolitikus görbéje, %lysis – a szétbomlott eritrociták százaléka, c_{BA} – az epesavak nátrium sóinak koncentrációja

Pósa a tanulmányozott epesavak összehasonlíthatósága céljából a következő paramétereket alkalmazta: Lys50 (az epesav Na sójának koncentrációja, amelynél az eritrociták 50%-a szétesett) és Lys100 (az epesav Na sójának koncentrációja, amelynél az eritrociták 100%-a szétesett).¹⁰ A Lys50 és a Lys100 alapján (mint egydimenziós vektorterek) meghatározható a vizsgált epesavak dendrogramja (a mintabeli hasonlóság felismerése hierarchikus csoportosítással). A kapott dendrogram

alapján vizsgálható az epesavak szerkezetének (valójában a szteroidvázak szerkezete) a jelentősége a vörösvérsejtmembrán roncsolásában (5. ábra).



5. ábra

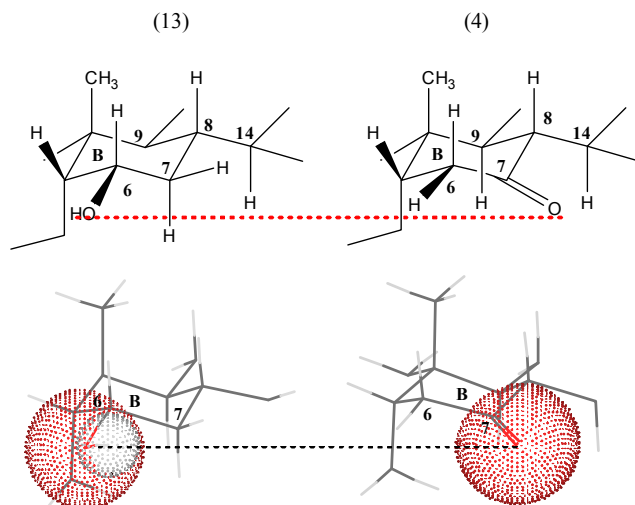
A vizsgált epesav molekulák Lys100-as alapján kapott dendrogramja

Az 5-ös ábra alapján a tanulmányozott epesavak két csoportot alkotnak. Az I. csoportba tartozó epesavakra jellemző a szigmoid alakú „hemolitikus görbe” továbbá, hogy a Lys100-as értékeik meghaladják a kritikus micelláris koncentrációjuk értékeit.¹⁰ Ez azt jelenti, hogy az I. csoportba tartozó epesavak szubmicelláris tartományban kisebb toxikus hatást (sejtmembránnal szemben) mutatnak, mint a II. csoport epesav molekulák, ugyanis ezek Lys100-as értékei a kritikus micelláris koncentrációjuk alatt van. A II. csoport epesav molekulái, szteroidvázuk szerint, a következő kifejezéssel jellemezhetők:

$$\underbrace{\max 2\alpha(e)O \wedge 0\alpha(a)O \vee \max 2\alpha(a)O \wedge \max 1\alpha(e)O}_{\text{II. csoport}} \quad (\text{E1}),$$

ahol az O jelöli az oxigén atomot (OH vagy oxo csoportból), $\alpha(e)$ ekvatoriális orientációt jelöl, míg az $\alpha(a)$ axiálist. A fenti kifejezés értelmében a II. csoportba olyan epesav molekulák tartoznak, amelyek szteroid gyűrűrendszere legfeljebb két α ekvatoriális oxigén atomot tartalmaznak (6. ábra, hiodeoxikólsav (13): C3- $\alpha(e)$, C6- $\alpha(e)$; 7-oxolito-kólsav (4): C3- $\alpha(e)$, C7- $\alpha(e)$; 12-oxolito-kólsav (5): C3- $\alpha(e)$, C12- $\alpha(e)$), valamint azok az epesav molekulák, melyek szteroidvázán maximálisan két α axiális és egy α ekvatoriális O atom található (kólsav (3): C3- $\alpha(e)$, C7- $\alpha(a)$, C12- $\alpha(a)$). Természetesen, a II. csoportba azok az epesav mo-

lekulák is tartoznak, amelyek kevesebb *O* atomot tartalmaznak, a megfelelő orientációban, mint az E1 kifejezés szerint, a csoport határnak megfelelő szerkezetek (deoxikólsav: C3- $\alpha(e)$, C12- $\alpha(a)$ és kenodeoxikólsav: C3- $\alpha(e)$, C7- $\alpha(a)$).



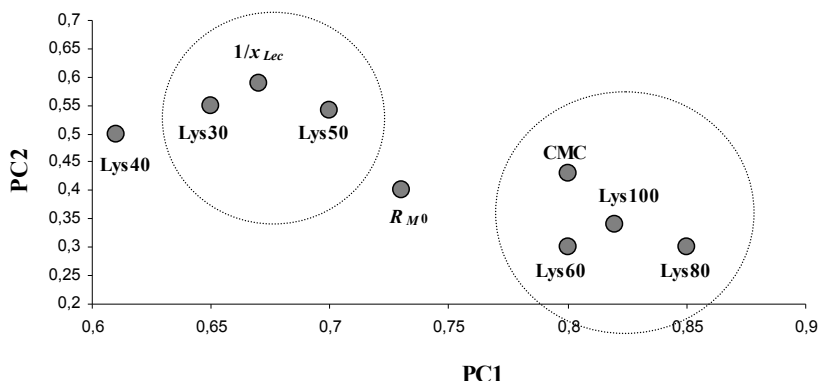
6. ábra

A hideoxikólsav (13) OH csoportjának O atomja és a 7-oxolítólsav (4) oxo csoportjának O atomja azonos térbeli helyzetű (az ábrán az epesav molekulák szteroid vázának a B gyűrűje látható)

Az E1 kifejezés jelentősége az, hogy függetlenül az *O* atomok helyzetétől (az *O* atom a szteroidváz, mely C atomhoz kötődik), ha sztereokémiai szempontból a vizsgált epesavak eleget tesznek az E1 követelményeinek, akkor azok az epesavak a submicelláris térben is membránroncsoló tulajdonságot mutatnak.

Felmerül a kérdés vajon az epesavak mely fizikai-kémiai jellemzőjével (mint független változóval) lehetne matematikailag előrevetíteni a Lys100-as értékeket. Az epesavak fizikai-kémiai paraméterei közül Pósa vizsgálta a reverz fázisú vékony-réteg kromatográfia retenciós koeficiensét (R_{M0}), a lecitin oldhatósági kapacitását ($1/\chi_{Lec}$) és a kritikus micel-láris koncentrációt (CMC). A vizsgált epesavak hemolitikus görbéi és az R_{M0} , $1/\chi_{Lec}$, CMC értékeik alapján főkomponens-elemzéssel – a

kapott súlyfaktorok első (PC1) és második (PC2) főkomponenseinek síkjában a Lys100-ashoz legközelebb a CMC található (7. ábra).¹⁰



7. ábra

Főkomponens-elemzés – súlyfaktorok (loadings)

Tehát, az epesav molekulák fizikai-kémiai jellemzői közül a korreláció a CMC és a Lys100 között a legnagyobb. A Lys100 a következő lineáris regressziós egyenlettel adható meg:

$$\text{Lys100} = -6.02 + 1.21\text{CMC} \quad (E2)$$

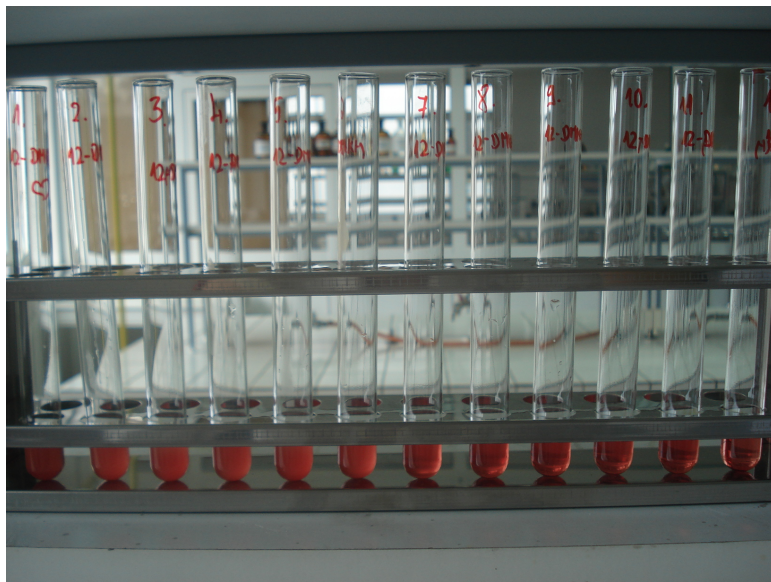
$$N = 13; r^2 = 0.992; sd = 4.85; F = 1433.$$

3. Az ozmotikus ellenállás

Az ozmotikus rezisztencia (ellenállás) meghatározása olyan kísérleti körülmények között történt, ahol az eritrocitákat hipotónikus oldat veszi körül. Ilyen környezetben termodinamikailag lehetséges a vízmolekulák flukszusa J_{viz} (transzportja) a külső oldatból a vörösvérsejt belsejébe. Ahhoz, hogy számottevő vízmolekula kerüljön át a hipotónikus oldatból az eritrocita plazmájába, a termodinamikai feltétel nem elegendő, hanem további feltételként szükséges a vörösvérsejtmembrán permeabilitásának (áteresztő képességének) növekedése is. A membránon keresztül áthaladó víz flukszust a következő egyenlet írja le:

$$J_{\text{viz}} = p_{\text{viz}} \Delta\pi \approx p_{\text{viz}} RT \Delta c_{\text{NaCl}} \quad (\text{E3}),$$

ahol $\Delta\pi$ az eritrocita sejtmembrán felületénél levő ozmotikus nyomáskülönbség (a vörösvérsejt belsejében az ozmotikus nyomás nagyobb mint a hipotónikus oldatban, így a víz mozgása az ozmotikus nyomás növekedése irányában történik), p_{viz} a víz permeabilitási állandója, míg a Δc_{NaCl} a nátrium-klorid intra- és extracelluláris koncentrációjának a különbsége.⁹



8. ábra

Az ozmotikus ellenállás változása: az ábrán látható kémcsövekben jobbról balra fokozatosan csökken az NaCl koncentrációja (0.75% - 0.00%)

A Δc_{NaCl} növekedés (csökkentve a vörösvérsejteteket körülvevő oldat nátrium-klorid koncentrációját) a víz flukszusnövekedését eredményezi, ha a permeabilitás is megfelelő mértékű. Tehát, ha a vizsgált epe-savak „roncsolják” az eritrocita sejtmembránját, akkor annak megváltozik az integritása, ugyanis az epesav sók a membrán foszfolipidjeivel vegyes (kevert) micellákat képeznek, kivonván azokat a membránból. Ennek köszönhetően növekszik a sejtmembrán fluiditása (belső mozgékony-sága – úgymond „lyukak” képződnek a sejtmembránon), azaz növekszik a víz permeabilitása. Az eritrocitába beáramló víz roncsolja a

sejtet, miközben a felszabadult hemoglobin pirosra színezi az oldatot, a vörösvérsejt fragmentumok pedig zavarossá teszik azt. Az epesavak által előidézett eritrocita ozmotikus ellenállás változását úgy határozzák meg, hogy megfelelő dózisú epesav nátrium sóit intravénásan a kísérleti állatba juttatnak, majd az eloszlási fázis után vért vesznek tőle, amelyből egyforma térfogatú mintákat szétosztanak hipotónikus NaCl oldatok között (8 ábra) – a felszabadult hemoglobint spektrofotometriásan határozzák meg. Abban az esetben, ha a hemoglobin a 0.45%-os vagy ennél nagyobb koncentrációjú hipotónikus NaCl oldatban jelenik meg, akkor a vizsgált epesav csökkenti a vörösvérsejt membránjának ozmotikus ellenállását.⁹ Ha a kísérleti adatokra (9. ábra, a hemoglobin mennyiség relatív növekedése a hipotónikus NaCl oldat koncentrációjának függvényében) főkomponens-elemzést alkalmazunk, akkor a 10-es ábra szerinti, az első három főkomponens érték (*score*) alapján kapott epesav molekula csoportokat tudjuk meghatározni. A főkomponens-térben kitűnik, hogy a három leghidrofóbb epesav (I csoport: kólsav, deoxikólsav és kenodeoxikólsav) külön csoportot képez. Valójában ezek az epesavak azok, amelyek jelentősen csökkentik a vörösvérsejtek ozmotikus ellenállását, mivel nátrium sóiknak a legnagyobb az önszerveződésre való hajlama. Így az eritrocita foszfolipidjeivel való micellaképződés is náluk a legkedvezőbb.⁹⁻¹³

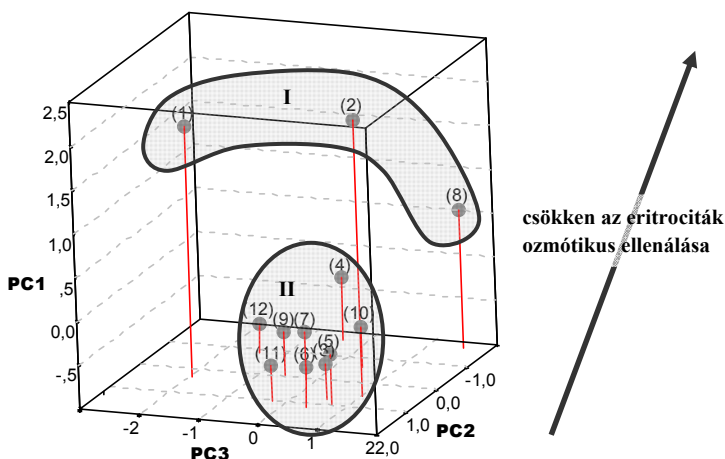
Az epesavak szteroidvázának szerkezeti tulajdonságai a vörösvérsejtek ozmotikus ellenállásának változásában kevésbé érvényesülnek, mint az eritrocita sejtmembránjának károsodásának a hemolitikus potenciállal történő kifejezésében. Ez valószínűleg azért van, mert az ozmotikus ellenállás meghatározása *in vivo* körülmények között történik, aminek következtében több az interferáló tényező, mint az *in vivo* hemolitikus potenciál meghatározásánál.

BA	Concentration of NaCl, %															
	0.75	0.70	0.65	0.60	0.55	0.50	0.45	0.40	0.35	0.30	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	0.00
c.g. ^a	0.00a0.00	0.00a0.00	0.00a0.00	0.00a0.00	0.00a0.00	0.00a0.00	0.00a0.00	0.00a0.00	0.01a0.01	0.02a0.01	0.01a0.01	0.06a0.02	0.09a0.02	0.11a0.03	0.10a0.03	0.12a0.03
1	0.06a0.01	0.09a0.01	0.12a0.01	0.14a0.02	0.13a0.02	0.17a0.03	0.24a0.04	0.24a0.04	0.27a0.05	0.25a0.04	0.29a0.04	0.26a0.04	0.28a0.05	0.31a0.05	0.30a0.04	0.39a0.05
2	0.07a0.01	0.09a0.01	0.09a0.02	0.12a0.02	0.16a0.04	0.19a0.03	0.25a0.05	0.26a0.05	0.26a0.04	0.27a0.05	0.31a0.05	0.29a0.04	0.30a0.05	0.34a0.06	0.36a0.05	0.42a0.07
3	0.06a0.01	0.06a0.00	0.04a0.00	0.06a0.01	0.06a0.01	0.06a0.01	0.08a0.01	0.07a0.01	0.09a0.02	0.11a0.01	0.12a0.02	0.15a0.02	0.18a0.02	0.20a0.03	0.23a0.02	0.25a0.05
4	0.04a0.00	0.05a0.00	0.05a0.01	0.07a0.01	0.05a0.01	0.06a0.01	0.09a0.02	0.08a0.01	0.12a0.02	0.13a0.02	0.14a0.02	0.17a0.02	0.20a0.02	0.24a0.03	0.28a0.04	0.29a0.06
5	0.06a0.01	0.07a0.01	0.04a0.00	0.06a0.01	0.06a0.02	0.05a0.01	0.06a0.01	0.07a0.02	0.11a0.01	0.12a0.02	0.13a0.02	0.15a0.02	0.19a0.02	0.22a0.02	0.24a0.05	0.24a0.05
6	0.06a0.00	0.06a0.01	0.04a0.00	0.05a0.01	0.05a0.01	0.07a0.01	0.09a0.01	0.08a0.02	0.08a0.02	0.11a0.01	0.11a0.01	0.14a0.02	0.17a0.02	0.21a0.04	0.23a0.05	0.26a0.04
7	0.05a0.00	0.06a0.01	0.04a0.00	0.06a0.01	0.06a0.01	0.08a0.02	0.06a0.02	0.09a0.02	0.10a0.01	0.11a0.02	0.13a0.02	0.15a0.02	0.18a0.02	0.22a0.03	0.25a0.06	0.24a0.04
8	0.05a0.00	0.06a0.01	0.06a0.01	0.08a0.01	0.09a0.02	0.06a0.02	0.10a0.01	0.13a0.02	0.16a0.02	0.20a0.03	0.23a0.04	0.25a0.04	0.28a0.05	0.28a0.05	0.30a0.06	0.36a0.05
9	0.05a0.00	0.05a0.00	0.05a0.00	0.06a0.01	0.07a0.02	0.06a0.02	0.08a0.02	0.08a0.01	0.10a0.02	0.11a0.02	0.12a0.02	0.14a0.01	0.18a0.02	0.22a0.03	0.23a0.04	0.27a0.05
10	0.05a0.00	0.04a0.00	0.04a0.00	0.06a0.01	0.06a0.01	0.06a0.01	0.07a0.02	0.07a0.02	0.09a0.02	0.12a0.02	0.14a0.02	0.18a0.03	0.19a0.02	0.22a0.03	0.24a0.04	0.25a0.03
11	0.06a0.01	0.05a0.00	0.06a0.00	0.06a0.01	0.05a0.01	0.06a0.01	0.07a0.01	0.08a0.02	0.08a0.02	0.10a0.02	0.12a0.01	0.15a0.02	0.17a0.03	0.20a0.03	0.22a0.03	0.23a0.03
12	0.04a0.00	0.05a0.00	0.05a0.01	0.06a0.01	0.07a0.02	0.06a0.01	0.07a0.01	0.07a0.02	0.08a0.01	0.11a0.01	0.11a0.01	0.14a0.02	0.18a0.02	0.20a0.02	0.23a0.04	0.23a0.04
13	0.05a0.00	0.04a0.00	0.04a0.00	0.05a0.01	0.05a0.01	0.06a0.01	0.06a0.01	0.07a0.01	0.08a0.02	0.08a0.01	0.08a0.01	0.10a0.01	0.12a0.01	0.15a0.02	0.18a0.02	0.20a0.03

^a c.g., control group; n = 7.

9. ábra

Az ozmotikus ellenállás kísérleti adatai (Pósa, M., Farkas, Z., 2010. Collection of Czechoslovak Chemical Communications 75(8), 767-784)



(1): D; (2): CD; (3): HD; (4): 12-oxoLC; (5): 7-oxoLC; (6): 3,7-dioxoC; (7): 3,12-dioxoC; (8): C; (9): 7-oxoD; (10): 12-oxoCD; (11): 12-OH-3,7-dioxoC; (12): 7,12-dioxoLC; (13): 3,7,12-trioxoC

10. ábra

A vizsgált epesavak csoportosulása a főkomponens-értékek (score) terében, amelyek az ozmotikus ellenállás kísérleti adatai (9 ábra) alapján kerültek bemutatásra

4. Összegzés

Az epesavak szteroidvázának hidrofób, illetve hidrofil felületének aránya lényegesen befolyásolja sejtmembrán károsító hatásait. Mindkét kísérlet, mind a hemolitikus potenciál, mind az ozmotikus ellenállás is igazolta, hogy a vörösvérsejt sejtmembránjában a legnagyobb károsodást a következő epesavak okozzák: kenodeoxikólsav $\approx$ deoxikólsav $>$ kólsav. A kísérletek azt is feltárták, hogy a szteroid gyűrűrendszer hidroxid csoportjának oxo csoporttal történő felcserélése csökkenti az epesavak sejtmembrán roncsoló tulajdonságát.

Felhasznált irodalom:

1. Bowe, C.L., Mokhtarzadeh, L., Venkatesen, P., Babu, S., Axelrod, R.H., Sofia, M.J., Kakarla, R., Chan, T.Y., Kim, J.S., Lee, H.J., Amidon, G.L., Choe, S.Y., Walker, S., Kahne, D., 1997. Design of compounds that increase the absorption of polar molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 12218–12223.
2. Al-Salami, H., Butt, G., Tucker, I.G., Mikov, M., 2008. Influence of the semisynthetic bile acid MKC on the ileal permeation of gliclazide *in vitro* in healthy and diabetic rats treated with probiotics. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.* 30(2), 107–113.
3. Gordon, G.S., Moses, A.C., Silver, R.D., Flier, J.S., Carey, M.C., 1985. Nasal absorption of insulin: enhancement by hydrophobic bile salts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 7419–7423.
4. De Castro, B., Gameiro, P., Guimarães, C., Lima, J.L.F.C., Reis, S., 2001. Study of partition of nitrazepam in bile salt micelles and the role of lecithin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24, 595–602.
5. Kuhajda, I., Pósa, M., Jakovljević, V., Ivetić, V., Mikov, M., 2009. Effect of 12-monoketocholic acid on modulation of the analgesic action of morphine and tramadol, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.* 34, 73–78.
6. Vasović, V., Vukmirović, S., Pósa, M., Mikov, M., Rašković, A., Jakovljević, V., 2006. Effect of rat pretreatment with aqueous solution of stevioside and bile acids on the action of certain cardioactive drugs. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.* 31, 311–314.
7. Pósa, M., Kevrešan, S., Mikov, M., Ćirin-Novta, V., Kuhajda, K., 2007. Effect of cholic acid and its keto derivatives on the analgesic action of

lidocaine and associated biochemical parameters in rats. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.* 32, 109–117.

8. Pósa, M., Guzsány, V., Csanádi, J., Kevrešan, S., Kuhajda, K., 2008. Formation of hydrogen-bonded complexes between bile acids and lidocaine in the lidocaine transfer from an aqueous phase to chloroform. *Eur. J. Pharm. Sci.* 34, 281–292.

9. Pósa, M., Farkas, Z., 2010. Cholesterol solubilization by oxo derivatives of selected bile acids and their osmotic resistance, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 75(8), 767–784.

10. Pósa, M., Kuhajda, K., 2010. Hydrophobicity and haemolytic potential of oxo derivatives of cholic, deoxycholic and chenodeoxycholic acids. *Steroids* 75(6), 424–431.

11. Pósa, M., Pilipović, A., Lalić, M., 2010. The influence of NaCl on hydrophobicity of selected, pharmacologically active bile acids expressed with chromatographic retention index and critical micellar concentration. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 81, 336–343.

12. Pósa, M., 2011. QSPR study of the effect of steroidal hydroxy and oxo substituents on the critical micellar concentration of bile acids. *Steroids* 76(1–2), 85–93.

13. Pósa, M., Pilipović, A., Lalić, M., Popović, J., 2010. Hydrophobicity and retention coefficient of selected bile acid oxo derivatives. *Acta Chimica Slovenica* 57(4) 828–835.