

ПРОЛАЗ ЛЕКОВА КРОЗ МОЖДАНУ БАРИЈЕРУ ПОСЛЕ РЕТРОГРАДНЕ ИНТРААРТЕРИЈСКЕ АПЛИКАЦИЈЕ

Стевић С.¹, Јаковљевић В.², Митић Р.¹, Жорић Л.⁴, Станојевић З.¹, Букумирић З.¹, Булајић С.¹, Бурсаћ М.¹, Витковић Л.³

¹ Институт за фармакологију и токсикологију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

² Завод за фармакологију, токсикологију и клиничку фармакологију, Медицински факултет, Нови Сад

³ Институт за хистологију и ембриологију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

⁴ Клиника за очне болести, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

DRUG TRANSITION THROUGH THE BLOOD-BRAIN BARRIER AFTER THE RETROGRADE INTRAARTERIAL APPLICATION

Стевић С.¹, Јаковљевић В.², Митић Р.¹, Жорић Л.⁴, Станојевић З.¹, Букумирић З.¹, Булајић С.¹, Бурсаћ М.¹, Витковић Л.³

¹ Institute for pharmacology and toxicology, Medical faculty Pristina, Kosovska Mitrovica

² Department for pharmacology, toxicology & clinical pharmacology, Medical Faculty, Novi Sad

³ Institute for histology and embriology, Medical faculty Pristina, Kosovska Mitrovica

⁴ Clinic for eye diseases, Medical faculty Pristina, Kosovska Mitrovica

SUMMARY

Transition of xenobiotics from blood into brain tissue is limited by the blood-brain barrier (BBB), a very selective functional barrier that excludes penetration of various substances, while allowing essential nutrients to enter into CNS. Transport of drugs through the intact BBB depends of their physico-chemical characteristics, the way of drug application and of anatomical and functional integrity of the barrier. The aim of this work was to examine penetration of quinine and lysinacetylsalicylate in vivo through the rat BBB, after the intraarterial injection via the a. axillaris in the course to CNS. The experiment was done on anaesthetized Wistar rats, body weight 200-300 g. Test animals received injection of quinine (25 mg/kg) or LAS (90 mg/kg). Blood from the left jugular vein and brain samples (brain stem, cerebellum, right and left cerebral hemispheres) were taken in four minutes period. Quinine concentrations in rat brain were higher than in blood (ratio between blood/brain concentration was <1) while LAS concentrations in blood were permanently higher, according to their liposolubility. Maximal concentration in the brain tissue of both drugs are time dependent which indicated the useness of an active transport

Key words: Blood-brain barrier, Retrograde intraarterial application.

САЖЕТАК

Транспорт ксенобиотика из крви у мождано ткиво ограничен је крвно-можданом баријером (КМБ), врло селективном функционалном баријером, која онемогућава слободно продирање многих супстанци, а истовремено дозвољава есенцијалним нутритивним да уђу у централни нервни систем (ЦНС). Пролазак лекова кроз интактну КМБ зависи од њихових физичко-хемијских карактеристика, начина давања, као и од анатомског и функционалног интегритета баријере. Циљ нашег рада био је да испитамо пролаз хинина (25 мг/кг) и ацетилсалицилата (90 мг/кг) кроз КМБ пацова, после интраартеријског давања лекова, кроз пазушну артерију а у смеру према ЦНС. Експеримент је рађен на анестезираним Вистар пацовима, телесне масе 200-300 грама. Узорци крви из леве југуларне вене и мозга (мождано стабло, мали мозак, лева и десна хемисфера) узимани су у у периоду од 4 минута. Концентрације хинина у мозгу биле су више него у крви (однос концентрација крв/мозак <1), док су концентрације ЛАСа стално биле више у крви, у складу са њиховим физичко-хемијским карактеристикама. Максималне концентрације оба лека регистроване су са временским закашњењем, што је узроковано постојањем активног транспорта за ове лекове.

Кључне речи: Крвно-мождана баријера, Ретроградна интраартеријска апликација.

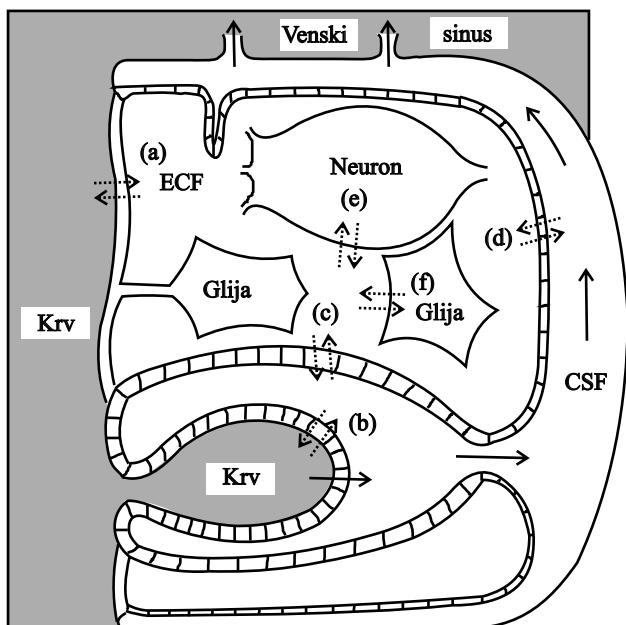
УВОД

У централном нервном систему (ЦНС), постоји мноштво анатомских структура, са сплетом физиолошких и биохемијских особина, које онемогућа-

вају слободан улаз ксенобиотика из крви у мозак. Специфичне ултраструктурне и функционалне карактеристике можданих баријера, дају слику богат-

ства ензима и транспортних система у церебралном ендотелијуму (1,2). Јединствена препрека за несметан пролаз супстанци и лекова, названа је Blutirnschranke-транспортна баријера (3).

На слици 1 приказано је кретање материја кроз транспортне баријере мозга. Баријере можданог ткива описане су као крвно - мождана (КМБ), крвно-ликворска (КЛБ) и ликворско - мождана баријера (ЛМБ).



Слика 1 - Шематски приказ проласка ксенобиотика кроз систем компартмана крв-мозак-ликвор. (4)

- кретање у смеру крв-мозак и пролаз кроз КМБ-у
- кретање у смеру крв-ликвор и пролаз кроз КЛБ-у
- кретање у смеру ликвор-мозак и пролаз кроз ЛМБ-у
- пролаз кроз пиа-глијалну мембрану
- пролаз кроз ћелијску мембрану неурона
- пролаз кроз мембрану глија ћелија

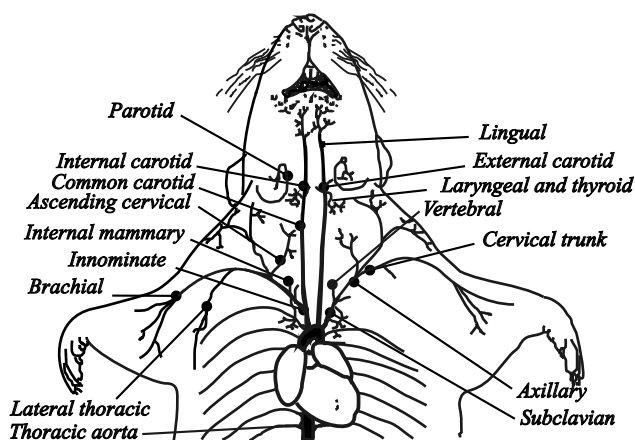
Крвно-мождана баријера (КМБ) представља хомогену липидну мембрану са појачаном структуром (5). Чине је ендотел и базална мембрана крвних капиЛАра, неуроглијална мембрана и неуроглијални периваскуларни омотач, кога образују завршеци продужетака астроцита (6). Ендотел крвних капиЛАра мозга нема интерцелуларне поре и не образује пиноцитозне везикуле. Карактеристике га присуство тзв. тесних чврстих веза (tight junction) између ендотелних ћелија (7). Ове везе имају врло висок електрични отпор - око $3000 \Omega/\text{cm}^2$ (8). Ланац чврстих веза налази се и у капиЛАрима других органа, али је посебан склоп перикапиЛАрних глија ћелија одговоран за строго контролисан и редукован улаз супстанци или лекова (9,10). У физиолошким условима, у мождано ткиво могу продрети само липофилни, слободни, неполарни и недисосовани молекули, промера мањег од 0,4 нм, простом дифузијом. (11).

Продирање лека у ЦНС зависи од степена филогенетског развоја третиране врсте (12,13,14)

животног доба (15,16), као и физичко-хемијских особина самих ксенобиотика. Код нижих кичмењака КМБ је пропустљивија у односу на сисаре (17).

Организам је врло динамичан систем, који својим оригиналним правилима функционисања, утиче на исход огледа *in vivo* (18). Код система *in vitro*, услови су познати и мање подложни променама, тако да ендотелне ћелије церебралних капиЛАра могу изгубити поларност, коју демонстрирају у *in vivo* условима (19). Тако се и КМБ у огледима *in vitro* понаша другачије него у условима *in vivo* (20).

Једна од нових могућности испитивања кинетике ксенобиотика у ЦНС-у *in vivo* је интра-артеријска апликација (21,22). Ретроградним инјекцијом супстанце у пазушну артерију, омогућава се да убризгана супстанца буде однета у мозак и путем кичмене артерије. (Слика 2)



Слика 2 - Шематски приказ крвних судова пацова.

ЦИЉ РАДА

- Испитати кретање лизинацетилсалицилата, која дисосује као слаба киселина, кроз интактну КМБ-у, након инјектирања у артеријску циркулацију према ЦНС-у.

- Испитати кретање хининхлорида, који представља слабу базу, кроз КМБ, после ретроградне интраартеријске апликације.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

Експеримент је рађен *in vivo* на лабораторијским пацовима соја "Wistar", оба пола, телесне масе 200-300 грама. Пацови су из окога узгојених у Заводу за фармакологију и токсикологију (Медицински факултет Нови Сад) и на фарми лабораторијских животиња ВМА (Београд). Животиње су имале слободан приступ води и храни целог дана, уз одржан циклус светлост-тама по 12 сати. Осам сати пре огледа пацовима је ускраћена храна.

Животиње су биле подељене у две групе: пацови, који су примали хинин и пацови, који су примали лизинацетилсалицилат.

Чисте супстанце добијене од произвођача, растваране су у дестилованој води. Нови раствори прављени су свакодневно. Дозе употребљаваних лекова израчунате су на основу телесне масе животиња. Хинин је апликован у дози од 25 мг/кг т.м.

Лизин ацетилсалицилат (ЛАС) под именом "Ласдол" (Срболек), апликован је у дози од 90 мг/кг т.м.

За наркозу је коришћен уретан (етилни естар карбаминаске киселине), прављен као 25% раствор (4 мл/кг т.м.).

За испитивање функционалности КМБ коришћена је метода по В.Јаковљевић (22). Анестезираним животињама испрепарисана је лева југуларна вена. После препарисања десне пазушне артерије, у отвор је увучена канила, затегнута горњом лигатуром и кроз њу је убризгано 1 мл/кг испитиваног лека у времену од 5-10 секунди.

Из југуларне вене узимано је по 0,1 мл крви у 30. 60. 90. 120. и 240. секунду, а затим је 5 мл дестиловане воде у болусу убризгано интракардијално. Пацови су жртвовани декапитацијом у наведеним временским интервалима, ради узимања узорак мозга животиња.

Остеотомијом свода кранијума, одвојен је мозак и структурни компартмани: možдано стабло, мали и велики мозак (лева и десна хемисфера). Сви делови мозга су ослобођени možданих опни.

Маса дисецираних možданих структура мерена је на ваги марке "Саутер" и затим хомогенизована Potter-овим хомогенизатором ("Браун") у четвороструком волумену дестиловане воде. Хомогенизован материјал је чуван у фрижидеру на температури од -20 степени, до биохемијских испитивања.

За екстракцију хинина коришћена је метода по Stamer-у и Isaakson-у (1963), уз мање модификације.

Узорак крви разблажен дестилованом водом (1:10) и 0,5 мл хомогената мозга мешани су са 1 мл 0,1N NaOH и 3 мл бензола и центрифугирани 10 мин./3000-3500 о/мин. Одвојеном супернатанту додато је 3 мл 0,1 N H₂SO₄ и поново је мешан и центрифугиран. Флуоресценција хинина мерена је на апарату марке "Ампсо-Вовман" при екситационој таласној дужини од 350 нм и емисионој од 450 нм. Раствори хинин хлорида концентрације 5, 2,5 и 1,25 мг/мл прављени су за стандарде.

Модификована метода по Salzman-у (1948) послужила је за извођење екстракције ЛАС из узорака.

Разблажени узорци крви и мозга мешани су са 4 мл Волфрамске киселине и након стајања од 10 минута, центрифугирани под истим условима. У 3 мл супернатанта је додато по 4 мл 10 N NaOH, а мерење је вршено после 30 минута (ексцитациона тал. дужина 310 нм, емисиона 400 нм). Стандарди су имали 62, 31 и 15,5 мг/мл раствора ЛАС-а.

Количина лекова у биолошком материјалу одређена је формулом:

$$\frac{P_n - P_0}{P_c} \times \Phi [\mu\text{g/ml}]$$

P_0 - флуоресценција бланко раствора

P_n - непозната флуоресценција

P_c - средња вредност флуоресценције стандарда

Φ - фактор разређења

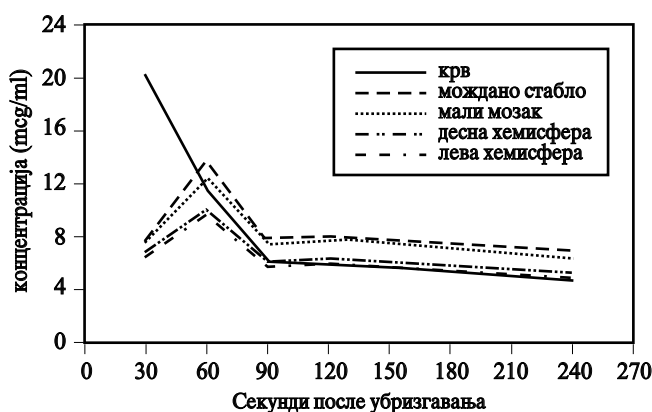
Пермеабилност КМБ-е за лекове, проверавана је и израчунавањем међусобног односа концентрација лекова у крви и у мозгу третираних животиња.

Резултати добијени у току експеримента приказани су графички и табеларно, а степен статистичке значајности провераван је Студентовим Т-тестом за мале зависне и независне узорке.

РЕЗУЛТАТИ РАДА

Кинетика хинина у крви и у мозгу животиња после ретроградне интраартеријске апликације

Концентрација хинин хлорида мерена је у пет различитих временских интервала (графикон 1).



Графикон 1 - Кинетика хинина у крви и мозгу пацова после ретроградне интраартеријске апликације.

Највиша концентрација хинина у крви измерена је у 30. секунду након интраартеријског инјектирања лека (20,26 mcg/ml), док је у 240. секунду била 4,7 mcg/ml. Концентрације хинина у свим деловима

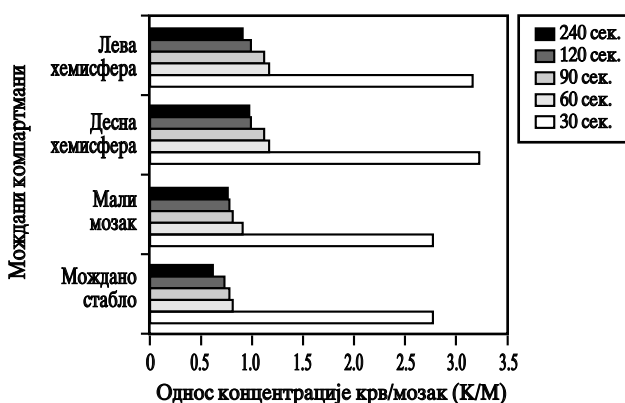
Табела 1. - Кретање концентрације хинина у крви и у мозгу пацова после интраартеријског давања лека (mcg/ml) током испитиваног времена (изражено у секундима).

Компартман	0"	30"	60"	90"	120"	240"
крв	0	20.26	11.47	6.11	6.01	4.7
moždano стабло	0	7.51	13.53	7.88	7.94	6.82
мали мозак	0	7.34	12.21	7.43	7.76	6.33
десна хемисфера	0	6.7	10	6.1	6.33	5.1
лева хемисфера	0	6.61	10.09	5.96	6.34	5.3

вима мозга, више су од концентрација у крви. Највише су забележене у 60. секунду (13,53 mcg/ml).

Прави показатељ функционисања КМБ-е је однос концентрација у крви и у можданим компартманима (К/М) у испитиваним временским интервалима (графикон 2). Тако је у 30. секунду концентрација хинина у крви у односу на мождано стабло и мали мозак била виша за 2,5 - 3 пута. Већ у 60. секунду, однос концентрација крв/мозак се мења у корист можданог стабла и малог мозга до последњег испитиваног времена.

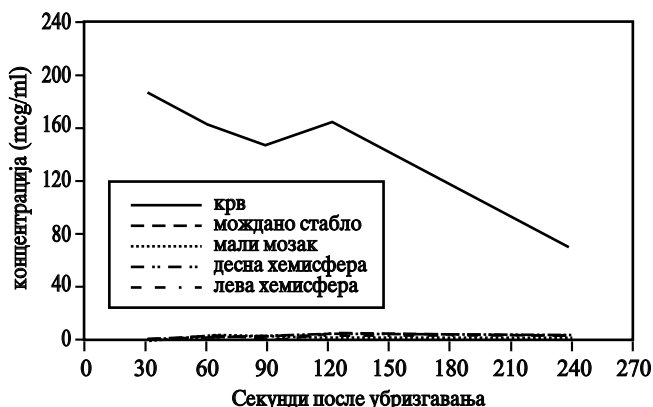
У великом мозгу је концентрација хинина била нижа до 90. секунду у обе хемисфере.



Графикон 2 - Однос концентрација хинина у крви и мозгу њацова

Кинетика лизинацетилсалицилата (ЛАС) у крви и у мозгу животиња после ретроградне интраартеријске апликације

Количина овог лека мерена је у истим временским интервалима са узимањем узорака хинина. (Графикон 3).



Графикон 3 - Кинетика ЛАС-а у крви и мозгу њацова после ретроградне интраартеријске апликације

Највиша концентрација ЛАС-а у крви измерена је у 30. секунду (190,6 mcg/ml). Нагло је опала у 60. секунду, а у 120. је порасла у односу на 90. секунд (149,9 mcg/ml). Најнижа концентрација је добијена последњим мерењем (75,72 mcg/ml).

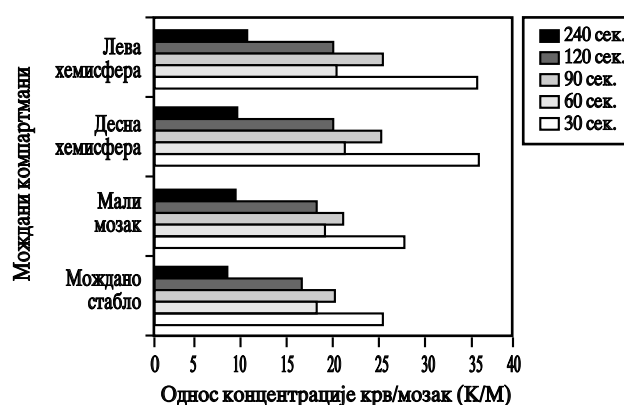
Концентрације ЛАС-а у можданој маси животиња биле су ниже од концентрација у крви у свим мереним временским интервалима. У можданом стаблу ЛАС је имао најнижу концентрацију у 90. (7,36 mcg/ml), а највишу у 120. секунду (9,94 mcg/ml). Кретање ЛАС-а кроз мали и велики мозак је слично, у релацији са временским интервалима. Вредности концентрација лека у великом мозгу су пропорционално ниже од вредности у претходним компартманима. Најниже концентрације у 30. секунду биле су исте у оба компартмана (5,29 mcg/ml), а највише су нотирање у 120. секунду (8,4 и 8,36 mcg/ml). Концентрације у левој хемисфери су биле нешто више од концентрација у десној у 60. и 90. секунду, а у 240. секунду су биле ниже (табела 2).

Табела 2. - Кретање концентрације ЛАС-а у крви и у мозгу њацова после интраартеријског давања лека (mcg/ml) током испитиваног времена (изражено у секундима).

Компартман	0"	30"	60"	90"	120"	240"
крв	0	190.6	165.66	149.9	165.24	75.2
мождано стабло	0	7.49	9.22	7.36	9.98	9.45
мали мозак	0	6.96	8.68	7.42	9.5	8.65
десна хемисфера	0	5.29	7.96	5.88	8.4	8.28
лева хемисфера	0	5.29	8.16	5.96	8.36	7.77

Праћење односа концентрације ЛАС-а у крви и у можданом ткиву испитиваних животиња приказано је на графикону бр 4. Максимална измерена концентрација лека у крви у 30. секунду била је од 25,5 до 36,21 пута виша од почетних концентрација у можданом ткиву.

Пад односа концентрација забележен је у 60. секунду, и поново смањен у 120. секунду. На крају експеримента свуда је забележен најнижи однос концентрација К/М (8,17-10,24).



Графикон 4 - Однос концентрација ЛАС-а у крви и мозгу њацова

ДИСКУСИЈА

Наше истраживање је било усмерено на проучавање динамике проласка лекова у централни нер-

вни систем, кроз интактну крвно-моздану баријеру пацова, после ретроградне интраартеријске апликације. За овај начин убризгавања лекова, определили смо се из више разлога.

Убризгано средство директно струји у моздане крвне судове, и истовремено избегава утицај неких фактора повезаних са општом кинетиком лека, као што су: брзина ресорпције лека после супкутаног или интрамускуларног инјектирања лека, ефект првог проласка кроз јетру после пероралне или интрапери-тонеалне апликације, или расподела по целом организму после интравенског убризгавања, мада се канилирање унутрашње југуларне вене, разматра као нова метода за праћење кинетике у *in vivo* условима.

Техничка сложеност директног убризгавања у унутрашњу каротидну артерију, или у унутрашњу југуларну вену, или, њихова катетеризација, вероватно последично делују и на интегритет и функцију КМБ-е.

Ове чињенице навеле су нас да се определимо за мало једноставнији метод, који је, сматрамо, меродавнији за испитивање проласка лекова кроз КМБ-у. За подражавање и праћење физиолошког транспортног пута ксенобиотика до ЦНС-а, извршена је катетеризација десне пазушне артерије (а. axillaris dextra). Захваљујући артерији аноними, лекови који су убризгани катетером у пазушну артерију, ударним волуменом срца потискивани су кранијално. Пошто је кичмена артерија грана поткључне артерије, инјектирањем ксенобиотика у највећу поткључну грану, пазушну артерију, омогућено је да део убризгане супстанце буде однет у мозак и путем кичмене артерије.

Пролазак лекова кроз КМБ-у испитиван је у разним временским интервалима.

Огледи код контролних група животиња указују на разлике у кинетици хинина и ЛАС-а у крви и у ЦНС-у, након њихове ретроградне интраартеријске апликације.

Коришћени лекови су, по својим физичко-хемијским карактеристикама различити лекови. Хининхлорид дисосује на катјон тј, као база у циркулацији, док ЛАС у физиолошком рН, јонизује на негативно наелектрисану киселину.

Највиша концентрација хинина у крви измерена је у иницијалном испитиваном времену, док је у мозданом ткиву у целини, максимална концентрација лека констатована увек са временским закашњењем. Хинин спада у групу липосолубилних супстанци, па се очекивало несметано продирање лека у моздану масу. Овај налаз би се могао објаснити постојањем активног транспорта за хинин у мозгу. Ипак, липофилност хинина потврђена је налазом виших концентрација лека у мозгу него у крви у каснијим временским интервалима. Концентрације хинина у крви и у мозгу третираних животиња, које су регистроване у нашем раду, углавном се подудару са измереним концентрацијама његовог стереоизомера хинидина без обзира на њихову, унеколико различиту фармакокинетику (25).

Највиша концентрација ЛАС-а у крви измерена је такође у почетном испитиваном времену. Највише концентрације ЛАС-а у мозданом ткиву третираних животиња забележене су са много већим закашњењем од момента давања, него код хинина. ЛАС-у је било потребно више времена, да достигне максималне концентрације у мозгу. Захваљујући управо његовој хидрофилној природи, ЛАС је током целог експеримента био много мање заступљен у комплетној мозданом ткиву, тј. концентрације ЛАС-а у мозгу биле су и преко тридесет пута ниже од концентрација у крви.

ЛАС је хидросолубилни облик ацетилсалицилне киселине, а аминокиселина лизин вероватно омогућава и бољу пенетрацију саме салицилне киселине кроз КМБ (26) и ретроградно апликоване ацетилсалицилне киселине (27) Концентрације ових лекова у крви и у мозгу, углавном су компарабилне. На основу добијених резултата, констатује се у суштини отежан улазак у ЦНС.

Осим мерења апсолутних вредности супстанци, у раду је одређен и међусобни однос концентрација у одговарајућим временским тачкама. Заправо, једино се праћењем односа концентрација испитиваних лекова у крви и у мозгу третираних животиња, добијају реални подаци о стварној количини лека, која је из крвног прешла у моздану ткиво.

Хинин је у мозгу постизао углавном више концентрације него у крви, што показују и ниске вредности односа концентрација. Хинин као липосолубилна, базна супстанца, има релативно висок волумен дистрибуције (Вд), који износи 1,8 л/кг (28). Зато лако пролази у ткива богата мастима, тако да је дошло до прерасподеле из крви у моздану ткиво.

Потпуно другачији налази регистровани су при испитивању кинетике ЛАС-а.

У комплетном опсервираном временском периоду, концентрације ЛАС-а у мозданом ткиву увек су биле ниже од концентрација у крви испитиваних животиња. Високи односи концентрација указују на слабо продирање овог лека кроз КМБ-у. То је вероватно последица веће дисоцираности ЛАС-а у подручју физиолошке вредности рН, односно малог волумена дистрибуције, који износи 150 мл/кг т.т. (29).

Као што се види из резултата, у мозданом стаблу и у малом мозгу регистроване су више концентрације оба лека у односу на њихове концентрације у хемисферама великог мозга. То се може објаснити анатомским положајем ових структура. Лек, који је убризган у пазушну артерију, најпре крвљу доспева до делова мозга, који су топографски најближи, а то су делови, који образују моздану стабло, па затим мали мозак, где су измерене највише концентрације.

Разлике у концентрацијама у различитим деловима мозга, упућују на постојање мултикомпартманске организације у ЦНС-у. Постоји подела на најмање два компартмана: један образују моздану стабло и мали мозак, а други образују обе хемисфере великог мозга.

Регистрована је и боља међусобна повезаност концентрација лекова унутар истог компартмана. Највероватније тумачење је да постоје разлике у физичко-хемијским особинама компартмана. Дакле, измерене вредности концентрација, које су више у првом него у другом компартману, условљене су локалним крвотоком и регионалним особинама КМБ-е.

ЗАКЉУЧЦИ

1. Динамика кретања лекова кроз КМБ, може се прецизно пратити након интраартеријског убризгавања лекова, кроз канилирану пазушну артерију, у смеру према ЦНС-у. На овај начин избегавају се они фармакокинетски процеси, који утичу на понашање ксенобиотика у организму.

2. Разлике у концентрацијама и међусобна повезаност испитиваних лекова указују на постојање два функционална мождана компартмана. Први компартман образују мождано стабло и мали мозак, а други представља велики мозак са својим хемисферама.

3. Испитивани ксенобиотици имају различите концентрације у ЦНС-у, које су последица њихових различитих физичких и хемијских особина. Концентрације хинина углавном су више у мозгу, док су концентрације ЛАС-а много више у крви.

4. Максималне концентрације оба лека у можданом ткиву, региструју се са временским закашњењем у односу на њихове максималне концентрације у крви.

ЛИТЕРАТУРА

- Dermietzel R, Krause D: Molecular anatomy of the BBB as defined by immunocytochemistry. *Int. Rev. Cytol.* 1991; 127:57-109.
- Rubin LI, Hall DE, Porter S et al: A cell culture model of the blood-brain barrier. *J. Cell. Biol.* 1991; 115:1725-35.
- Lewandowsky M: Zur Lehre Der Cerebrospinalflussigkeit. *Zeitschrift fur Klinische Medizin.* 1900;40:480-494.
- Davson W (eds.): *Physiology And Patophysiology of Cerebrospinal fluid* 1987.
- Forth W, Henschler D, Rummel Fh, Foestermann U, Starke K (eds.): *Allgemeine und Speziell Pharmakologie und Toxikologie.* *auflage, Urban&Fisher, Munchen-Jena 2001.
- Đorđević ZV: *Funkcionalna anatomija nervnog sistema.* udžbenik, I izd. Sirius, Niš. 1994; (1):480.
- Brightman MW, Reese TS: Junction between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J. Cell. Biol.* 1969; 40:648-677.
- But JM, Jones HC: Effect of histamine and antagonists on electrical resistance across the BBB in rat brain - surface microvessels. *Brain. Res.* 1992; 569:100-105.
- Gherzi-Egea JF, Minn A, Siest G: A new aspect of the protective function of the blood-brain barrier: Activities of four drug metabolizing enzymes in isolated rat brain microvessels. *Life Sci* 1988; 42/24:2515-2523.
- Bradbury MWB: The Blood-Brain barrier. *Experim. Physiol.* 1993; 78:453-72.
- Rappaport SI: *Blood-brain barrier in physiology and medicine.* Raven Press, New York, 1976; p87.
- Kupferberg H, Way EL: Pharmacologic basis for the increased sensitivity of the newborn rat to morphine. *J-Pharmacol-Exp-Her.* 1963. 141:105-112.
- Albert Z, Orłowski M, Rzedzido Z, Orłowska J: Histochemical localization in the central nervous system of man and different animal species. *Acta Histochem.* 1966;25:312-320.
- Cser HF, Van Dyke DH: Blood-brain in vertebrates. *Fed. Proc.* 1967; 26: 1024-1026.
- Lajtha A: The development of the blood-brain barrier. *J.Neurochem.* 1957; 1:216-227.
- Adinolfi M, Beck SE, Haddad SA, Seller MJ: Permeability of the blood-cerebrospinal fluid barrier to plasma proteins during foetal and perinatal life. *Nature.* 1976; 259:140-141.
- Zupanic GKH: *Entwicklung und pathologie der Blut-Hirn-Schranken-Gefass.* Neurowissenschaftliche Gesellschaft. V. Gibson&mdc-Berlin de 2004.
- Betz AL: An overview of the multiple functions of the blood-brain barrier. *NIDA. Res. Monog.* 1992; 120:54-72.
- Hughes CC, Lantos PL: Uptake of leucine and alanine by cultured cerebral capillary endothelial cells. *Brain. Res.* 1989; 480(1-2):126-32.
- Van-Bree JB, De-Boer AG, Danhof M, Breimer DD: Drug transport across the blood-brain barrier: II Experimental techniques to study drug transport. *Pharm. Weekbl. Sci.* 1992; 14(6):338-48.
- Banić B, Jakovljević V, Radunović A: The effect of Alchloride upon the transsition of drugs through the BBB into the CNS. *Europ. J. Drug. Metab. Pharm.* 1991; 16 (3):171-75).
- Jakovljević V: *Eksperimentalna farmakologija u naučno-istraživačkom radu.* Alfagraf. Novi Sad, 2006.
- Cramer G, Isaakson BS: Quantitative determination of quinidine in plasma. *Scand. J. Invest.* 1963; 15:553.
- Saltzman A: Fluorometric method for the estimation of salicylates in blood. *J. Biol. Chem.* 1948; 174:399.
- Jakovljević V, Popović M, Banić B, Sabo A: Effect of aluminium ion on hepatic elimination of quinine and quinidine. *Europ. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.* 1995; 20(3):185-90.
- Toth I: A novel chemical approach to drug delivery: lipid amino acid conjug. *J. Drug. Target.* 1994; 2(3): 217-39).
- Bascarevic S, Vasovic V, Mikov M, Kuhajda K, Kevresan S: Salicylates transport into the rat brain under the influence of monoketocholic acid. 16th European Workshop on Drug Metabolism. Copenhagen, Denmark. 1998.
- White NJ, Chathananich P, Krishna S et al: Quinine disposition kinetics. *Br.J.Clin.Pharm.* 1983; 16: 99-403.
- Levy G: Pharmacokinetics of salicylate in man. *Drug. Metab. Rev.* 1979; 9:3-19.