

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Milkica A. Crevar Sakač

**UTICAJ EKSTRAKTA LISTA ARTIČOKE  
NA METABOLIZAM ATORVASTATINA I  
OPTIMIZACIJA METODA TEČNE  
HROMATOGRFIJE ZA PRAĆENJE  
NASTALIH METABOLITA U BIOLOŠKOM  
MATERIJALU**

doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Milkica A. Crevar Sakač

**INFLUENCE OF ARTICHOKE LEAF  
EXTRACT ON ATORVASTATIN  
METABOLISM AND OPTIMIZATION OF  
LIQUID CHROMATOGRAPHY METHODS  
FOR DETERMINATION OF  
ATORVASTATIN AND METABOLITES IN  
BIOLOGICAL MATERIAL**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015.

MENTOR:

---

dr sc. Zorica Vujić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

---

dr sc. Jelena Kotur Stevuljević, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

---

dr sc. Zoran Vujčić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutsku hemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Deo doktorske disertacije koji se odnosi na određivanje osnovnih biohemijskih i lipidnih parametara, markera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u uzorcima eksperimentalnih životinja je urađen na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.*

*Želim da izrazim svoju zahvalnost svima koji su mi pomogli u izradi ove doktorske disertacije.*

*Pre svega, želim da se zahvalim svom mentoru, prof. dr Zorici Vujić na izboru teme, poverenju koje mi je ukazano i na slobodi koju sam imala u naučno-istraživačkom radu. Svojoj profesorki sam zahvalna i na svim životnim lekcijama koje me pokušavala naučiti prethodnih godina.*

*Veliku zahvalnost dugujem i prof. dr Jeleni Kotur Stevuljević na podršci, mnogobrojnim savetima i idejama i na svemu onome što me je naučila o radu u biohemijskoj laboratoriji. Veliko hvala i Jasmini sa Katedre za medicinsku biohemiju na pomoći u eksperimentalnom radu.*

*Zahvaljujem se prof. dr Zoranu Vujčiću na svesrdnoj pomoći i korisnim savetima tokom završne izrade doktorske disertacije.*

*Izuzetnu zahvalnost dugujem i prof. dr Marini Milenković sa Katedre za mikrobiologiju i imunologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu koja nam je obezbedila vivarijum za rad sa eksperimentalnim životinjama i učestvovala u planiranju i izvođenju eksperimenata. Hvala i Nataši i Vesni koje su hrabro učestvovala u žrtvovanju životinja.*

*Želim da se zahvalim i svojim kolegama sa Katedre za farmaceutsku hemiju, a posebno prof. dr Danici Agbaba, Caci, Niki, Branki, Bojanu, Jeci, Vladi, Jelici, Mariji i Katarini koji su uvek imali reči podrške za mene i sa kojima je rad zaista lakši...*

*Hvala mojoj porodici: mami, tati, Joji, Aci, Teji i Ićku jer me bezgranično inspirišu svojom ljubavlju.*

# UTICAJ EKSTRAKTA LISTA ARTIČOKE NA METABOLIZAM ATORVASTATINA I OPTIMIZACIJA METODA TEČNE HROMATOGRAFIJE ZA PRAĆENJE NASTALIH METABOLITA U BIOLOŠKOM MATERIJALU

## REZIME

Atorvastatin pripada grupi antihiperlipidemijskih lekova poznatih pod nazivom *statini*. Osnovni mehanizam delovanja ovih lekova je specifična, kompetitivna i reverzibilna inhibicija *HMG-CoA reduktaze*, enzima koji je značajan za proces biosinteze holesterola. Osim direktnog dejstva na biosintezu holesterola, atorvastatin pokazuje niz plejotropnih efekata koji imaju povoljno dejstvo na aterosklerotske promene. Atorvastatin metaboliše u jetri pod dejstvom CYP3A4 enzima pri čemu nastaju dva aktivna metabolita: *orto*-hidroksiatorvastatin i *para*-hidroksiatorvastatin i tri neaktivna metabolita: atorvastatin-lakton, *orto*-hidroksiatorvastatin-lakton i *para*-hidroksiatorvastatin-lakton.

Artičoka (*Cynara scolymus* L., *Asteraceae*) je zeljasta, jednogodišnja biljka rasprostranjena širom Mediterana. Terapija hiperlipidemija, pored lekova uključuje i nefarmakološke mere (promena ishrane, fizičke vežbe, prestanak pušenja i unošenja alkohola, primena biljnih ekstrakata). Obzirom da su svi delovi artičoke bogati jedinjenjima koja se ponašaju kao prirodni antioksidansi, ekstrakt lista artičoke i atorvastatin se često u terapiji primenjuju zajedno.

Cilj doktorske disertacije je da se ispita uticaj vodeno-etanolnog ekstrakta lista artičoke (*Tinctura Cynarae*) na metabolizam atorvastatina i opravdanost istovremene primene atorvastatina i navedenog biljnog ekstrakta. Za ispitivanja su korišćene komercijalne biljne kapi na bazi artičoke u kojima je kvantifikovan sadržaj cinarina i hlorogenske kiseline primenom HPLC metode (određen sadržaj obe komponente je 0,2 %).

Eksperimentalni rad je zasnovan na određivanju i praćenju promene koncentracije metabolita atorvastatina: *orto*-hidroksiatorvastatina, *para*-hidroksiatorvastatina i atorvastatin-laktone u uzorcima plazme eksperimentalnih životinja koje su bile na aterogenoj ishrani i koje su primale atorvastatin kao monoterapiju ili zajedno sa ekstraktom lista artičoke. Za izvođenje eksperimenta korišćeni su pacovi soja *Wistar*. Životinje su podeljene u 5 grupa koje su bile na različitoj ishrani i/ili terapiji. Jedna grupa životinja je tokom celog eksperimenta bila na normalnoj ishrani, dok su preostale četiri grupe do kraja eksperimenta bile na aterogenoj ishrani. U skladu sa prethodno postavljenim planom eksperimenta, različite grupe životinja na aterogenoj ishrani su, posle određenog vremena, primale atorvastatin, ili atorvastatin i ekstrakt

lista artičoke, ili samo ekstrakt lista artičoke. Na kraju eksperimenta životinje su žrtvovane i sakupljeni su uzorci plazme, hemolizata eritrocita, tkiva jetre i abdominalne aorte.

Koncentracije metabolita su određivane metodama visoko-efikasne tečne hromatografije (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) i tečne hromatografije spregnute sa masenom spektrometrijom (*Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS).

HPLC metoda je optimizovana primenom eksperimentalnog dizajna (*Design of Experiments, DoE*). *Screening* dizajn je izveden  $2^3$  punim faktorskim dizajnom sa centralnom tačkom u kombinaciji sa metodologijom površine odgovora (*Response Surface Methodology*). Ispitivan je uticaj temperature kolone, sastava i protoka mobilne faze na retenciju jedinjenja i dužinu trajanja hromatografskog razdvajanja. Optimalni hromatografski uslovi su procenjeni *face centered* centralnim kompozitnim dizajnom primenom Derringer-ove funkcije poželjnih odgovora kojom se vrši istovremena optimizacija više nezavisno promenljivih veličina prema većem broju posmatranih odgovora. Određene su individualne funkcije poželjnih odgovora ( $d_i$ ) i globalne funkcije poželjnih odgovora (D) na osnovu kojih su konstruisani 3D dijagrami sa kojih se očitavaju optimalni hromatografski uslovi. Predloženom HPLC metodom postignuto je dobro razdvajanje analiziranih supstanci u uzorcima standardnih rastvora kao i u uzorcima plazme eksperimentalnih životinja. Ograničenja u primeni metode su se javila zbog nedovoljne osetljivosti detektora i niske koncentracije atorvastatina i metabolita u pripremljenim uzorcima (red veličine ng/mL ili manje). U daljem radu korišćena je metoda tečne hromatografije koja je povezana sa masenim detektorom.

Metoda LC-MS/MS je osetljivija od HPLC metode jer omogućava selektivno praćenje zadatog produkt jona koji nastaje iz odgovarajućeg prekursora (*Selected Reaction Monitoring*, SRM način rada). Priprema uzoraka je vršena primenom metode čvrsto-tečne ekstrakcije (*Solid Phase Extraction*, SPE) koja daje dovoljno čiste ekstrakte uz minimalnu supresiju jonizacije. Za izvođenje LC-MS/MS metode korišćena je Zorbax Eclipse C18 Analytical, 4,6 x 100 mm (veličina čestica 3,5  $\mu\text{m}$ ) hromatografska kolona, gradijentno eluiranje mobilnom fazom acetonitril : 0,1 %  $\text{CH}_3\text{COOH}$  i rosuvastatin kao interni standard. Za analizu atorvastatina i metabolita izabrana je elektrosprej jonizacija (*Electrospray Ionization*, ESI) u pozitivnom modu. Detekcija je izvršena na četiri zasebna kanala pri čemu je svaki kanal odgovarao izabranom SRM prelazu ( $m/z$ ,  $Q1 \rightarrow Q3$ , energija kolizije) (oOH-AT i pOH-AT se prate na istom kanalu ( $m/z$ ,  $574,86 \rightarrow 439,65$ ; 20 eV), AT ( $m/z$ ,  $558,9 \rightarrow 439,52$ ; 22 eV), AT-L ( $m/z$ ,  $540,8 \rightarrow 447,6$ ; 19 eV) i IS (beleži se signal kojim nastaju dva definisana fragmenta

( $m/z$ , 481,75  $\rightarrow$  257,73; 31 eV i 299,74; 35 eV)). Optimizovana SPE-LC-MS/MS metoda je validirana prema vodičima Evropske agencije za lekove (*European Medicines Agency*, EMEA) i Američke agencije za hranu i lekove (*Food and Drug Administration*, FDA).

Nakon žrtvovanja životinja, u uzorcima plazme, hemolizata eritrocita i tkiva jetre određeni su osnovni biohemijski i lipidni parametri (koncentracije *alanin-aminotransferaze*, *aspartat-aminotransferaze*, ukupnih proteina, glukoze, ukupnog holesterola, triglicerida, HDL-holesterola, LDL-holesterola i nonHDL holesterola), markeri oksidativnog stresa (koncentracija malondialdehida i prooksidativno-antioksidativni balans) i antioksidativne zaštite (aktivnost enzima *superoksid-dizmutaze* i *paraoksonaze 1*, koncentracije redukovano glutationa i ukupnih sulfhidrilnih grupa). Određena je debljina zida trbušne aorte i morfologija tkiva jetre.

Praćenje efekta relativno male doze atorvastatina na osnovne biohemijske i lipidne parametre, parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite je pokazalo da šest nedelja terapije nije dovoljno da atorvastatin pokaže značajan hipolipemijski i antioksidativni efekat, što ukazuje na neophodnost duže terapije statinima. Ekstrakt lista artičoke je ispoljio značajan antioksidativni efekat, čime su potvrđeni rezultati drugih autora. Rezultati dobijeni u uzorcima pacova koji su primali kombinovanu terapiju atorvastatinom i ekstraktom lista artičoke pokazuju manji antioksidativni efekat u odnosu na efekat biljnog ekstrakta. Praćenje morfologije jetre i merenje debljine zida trbušne aorte potvrđuje rezultate dobijene iz plazme, hemolizata eritrocita i tkiva jetre.

Sadržaj atorvastatina, *o*-hidroksiatorvastatina, *p*-hidroksiatorvastatina i atorvastatin-laktona u plazmi pacova koji su primali atorvastatin (kao monoterapiju ili u kombinaciji sa ekstraktom lista artičoke) ukazuje da biljni ekstrakt ubrzava metabolizam atorvastatina i pomera ravnotežu između kiselinskog i laktonskog oblika ka neaktivnom laktonu.

**Ključne reči:** ateroskleroza, atorvastatin, ekstrakt lista artičoke, *Cynara scolymus* L., eksperimentalni dizajn, metabolizam, LC-MS/MS

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmaceutska-medicinska hemija i strukturna analiza

**UDK broj:** 582.998.1:543.544:616-092.9(043.3)

616.13-004.6:615.451.1:581.13(043.3)

**INFLUENCE OF ARTICHOKE LEAF EXTRACT ON ATORVASTATIN  
METABOLISM AND OPTIMIZATION OF LIQUID CHROMATOGRAPHY  
METHODS FOR DETERMINATION OF ATORVASTATIN AND METABOLITES  
IN BIOLOGICAL MATERIAL**

**ABSTRACT**

Atorvastatin belongs to the group of antihyperlipidemic drugs known as *statins*. The basic mechanism of action of these drugs is specific, competitive and reversible inhibition of *HMG-CoA reductase*, an enzyme involved in cholesterol biosynthesis. In addition, atorvastatin shows many beneficial pleiotropic effects. Atorvastatin is metabolized in the liver under the influence of the CYP3A4 enzyme to two active metabolites: *ortho*-hydroxyatorvastatin and *para*-hydroxyatorvastatin and three inactive metabolites: *ortho*-hydroxyatorvastatin lactone, *para*-hydroxyatorvastatin lactone and atorvastatin lactone.

Artichoke (*Cynara scolymus* L., *Asteraceae*) is annual plant, distributed throughout Mediterranean. The treatment of hyperlipidemia, in addition to pharmacotherapy, includes nonpharmacological measures (diet changes, physical activity, cessation of smoking and alcohol intake, use of herbal extracts). Since all the parts of artichoke plant are rich in natural antioxidants, artichoke leaf extract and atorvastatin are often used together.

The Ph. D. dissertation is focused to investigate the effect of aqueous-ethanolic extract of artichoke (*Tinctura Cynarae*) on the metabolism of atorvastatin and justification of co-administration of atorvastatin and herbal extract mentioned above. Experiments were conducted using commercial artichoke preparation. The contents of chlorogenic acid and cynarin in *Tinctura Cynarae* were quantified by means of the HPLC method (determined content of both components is 0.2 %).

Experimental work is based on determination and monitoring changes in the concentration of atorvastatin metabolites: *ortho*-hydroxyatorvastatin, *para*-hydroxyatorvastatin and atorvastatin lactone in the plasma samples of experimental animals fed with atherogenic diet and treated with atorvastatin (alone or in combination with artichoke leaf extract). Experiments were conducted on experimental animals (Wistar rats). The animals were divided into 5 groups on different diet and/or therapy. One group of animals was on normal diet all the time during experiment, and the remaining four groups were on the atherogenic diet. Three of these four groups were treated with: atorvastatin, artichoke leaf



extract and the combination of atorvastatin and artichoke leaf extract. According to experimental plan, the animals were sacrificed and the samples of plasma, erythrocyte hemolysate, liver tissue and the abdominal aorta were collected.

The concentrations of metabolites were determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), and Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS).

HPLC method was optimized by means of experimental design (*Design of Experiments*, DoE). As screening design, full factorial design ( $2^3$ ) in combination with Response Surface Methodology was used. The effects of column temperature, mobile phase composition and flow rate on the retention of investigated compounds as well as the duration of chromatographic run were investigated. The estimation of optimal chromatographic conditions was performed by *face centered* central composite design with Derringer's desirability function which enables the simultaneous optimization of multiple independent variables in regard to several observed responses. The individual desirability functions ( $d_i$ ) were determined and the global desirability function (D) was defined according to calculated data. 3D diagrams showing optimal chromatographic conditions were constructed. Proposed HPLC method enables a good separation of analyzed substances in standard solutions as well as in the plasma samples of experimental animals. The limitation of this method derived from the detector's lack of sensitivity and low concentrations of atorvastatin and metabolites in the plasma samples (ng/mL or less). Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry method was used for future work.

LC-MS/MS method is more sensitive than HPLC since it allows selective monitoring of specified product ion generated from corresponding parent ion (Selected Reaction Monitoring, SRM mode). Sample preparation was performed by Solid Phase Extraction (SPE) which gives cleaner extracts with the minimal suppression of ionization. Rosuvastatin was chosen as internal standard. Analyses were performed on Zorbax Eclipse C18 Analytical, 4.6 x 100 mm (3.5  $\mu$ m particle size) chromatographic column. The mobile phase consisted of acetonitrile and 0.1 %  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . The composition of mobile phase gradiently changed during time with flow rate 400  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Good separation of analytes was achieved in relatively short run time. Electrospray ionization in positive mode (ESI+) was used. Mass detection was performed on four separate channels with following SRM transitions: (m/z, Q1  $\rightarrow$  Q3, collision energy) of atorvastatin (558.9  $\rightarrow$  439.52; 22 eV); atorvastatin-lactone (540.8  $\rightarrow$  447.6; 19 eV); *ortho*-hydroxyatorvastatin and *para*-hydroxyatorvastatin (574.86  $\rightarrow$  439.65; 20 eV) and rosuvastatin (481.75 with selected combination of two fragments 257.73,

31 eV and 299.74; 35 eV). Optimized SPE-LC-MS/MS method was validated according to the guidelines of *European Medicines Agency*, EMEA and *Food and Drug Administration*, FDA.

Basic biochemical and lipid parameters (concentration of *alanin-aminotransferase*, *aspartat-aminotransferase*, total proteins, glucose, total cholesterol, triglycerides, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and nonHDL-cholesterol), markers of oxidative stress (concentration of malondialdehyde and prooxidative-antioxidative balance) and antioxidative protection (*superoxide-dismutase* and *paraoxinase 1* activity, concentration of reduced glutathione and total sulfhydryl groups) were determined in plasma, erythrocyte hemolysate and liver tissue samples. Abdominal aorta wall thickness was determined as well as liver tissue morphology.

Monitoring the effect of relatively small doses of atorvastatin on basic biochemical and lipid parameters, the parameters of oxidative stress and antioxidant protection showed that six weeks of therapy is not enough for atorvastatin to show significant hypocholesterolemic and antioxidant effect, indicating the necessity of longer treatment with statins. Artichoke leaf extract has demonstrated significant antioxidative effects, which were confirmed by the results of other authors. Results obtained from the samples of rats treated with the combination of atorvastatin and artichoke extract showed lower antioxidative effects in comparison with the samples obtained from animals treated with the herbal extract alone. Monitoring liver morphology and measuring the abdominal aorta wall thickness confirmed the results obtained from the plasma, erythrocyte hemolysate and liver tissue.

The content of atorvastatin, *o*-hydroxyatorvastatin, *p*-hydroxyatorvastatin and atorvastatin-lactone in the plasma of rats treated with atorvastatin (alone or in combination with artichoke leaf extract) indicated that the herbal extract accelerates the metabolism of atorvastatin and favors the formation of an inactive lactone in comparison to active acid form.

**Keywords:** atherosclerosis, atorvastatin, artichoke leaf extract, *Cynara scolymus* L., experimental design, metabolism, LC-MS/MS

**Scientific field:** Pharmacy

**Narrow scientific field:** Pharmaceutical-medicinal chemistry and structural analysis

**UDK number:** 582.998.1:543.544:616-092.9(043.3)

616.13-004.6:615.451.1:581.13(043.3)

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	1
<b>1.1. Ateroskleroza</b>	2
1.1.1. Lipidi u organizmu	2
1.1.1.1. Transport lipida – lipoproteini	3
1.1.1.2. Metabolizam lipida	4
1.1.2. Hiperlipidemije	6
1.1.3. Proces aterogeneze	8
1.1.3.1. Uloga oksidativnog stresa u razvoju ateroskleroze	9
1.1.3.2. Protektivna uloga HDL čestica u razvoju ateroskleroze	12
<b>1.2. Terapija dislipidemija</b>	12
1.2.1. Fibrinska kiselina i njeni derivati (fibrati)	13
1.2.2. Nikotinska kiselina	14
1.2.3. Inhibitori intestinalne resorpcije holesterola	15
1.2.4. Smole koje vezuju žučne kiseline	16
1.2.5. Inhibitori <i>HMG-CoA reduktaze</i> (Statini)	17
1.2.5.1. Otkriće statina	19
1.2.5.2. Sinteza holesterola	19
1.2.5.3. Mehanizam dejstva statina	20
1.2.5.4. Plejotropni efekti statina	22
1.2.5.5. Neželjeni efekti statina	23
1.2.5.6. Atorvastatin	25
1.2.6. Prirodni proizvodi	26
1.2.6.1. Artičoka ( <i>Cynara scolymus</i> L.)	28
<b>1.3. Metode za određivanje sadržaja atorvastatina</b>	31
1.3.1. Tečna hromatografija sa tandemskom masenom spektrometrijom (LC-MS/MS)	32
1.3.1.1. Metode jonizacije	33
1.3.1.2. Unošenje uzorka u maseni spektrometar	35
1.3.1.3. Maseni analizatori	37
1.3.1.4. Tandemska masena spektrometrija (MS/MS)	37
1.3.2. Metode prečišćavanja uzoraka	39

1.3.3. Razvoj hromatografskih metoda primenom hemometrije	41
1.3.3.1. Eksperimentalni dizajn	41
1.3.3.2. Vrste eksperimentalnog dizajna	42
1.3.3.3. Metodologija multikriterijumskog odlučivanja	43
<b>2. CILJ RADA</b>	45
<b>3. EKSPERIMENTALNI DEO</b>	47
<b>3.1. Optimizacija i validacija HPLC i LC-MS/MS metoda</b>	48
3.1.1. Standardi i hemikalije	48
3.1.2. Materijal, oprema i kompjuterski programi	48
3.1.3. Priprema rastvora	50
3.1.4. Priprema uzoraka plazme pacova primenom metode čvrsto- tečne ekstrakcije (SPE)	56
3.1.5. Hromatografska analiza – HPLC metoda	58
3.1.6. Hromatografska analiza – LC-MS/MS metoda	60
3.1.7. MS/MS analiza	60
<b>3.2. Ispitivanje osnovnih biohemijskih parametara i parametara     oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite</b>	65
3.2.1. Plan eksperimenta	65
3.2.1.1. Eksperimentalne životinje	65
3.2.1.2. Standardi i hemikalije	65
3.2.1.3. Materijal, oprema i kompjuterski programi	66
3.2.1.4. Ishrana pacova	66
3.2.1.5. Kvantifikacija cinarina i hlorogenske kiseline u ekstraktu lista artičoke	67
3.2.1.6. Priprema rastvora	68
3.2.1.7. Izvođenje eksperimenta	70
3.2.2. Metode određivanja osnovnih biohemijskih i lipidnih parametara	73
3.2.3. Metode određivanja koncentracije markera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite	73
3.2.3.1. Metoda određivanja ukupne aktivnosti <i>superoksid-dizmutaze</i>	74
3.2.3.2. Metoda određivanja aktivnosti <i>paraoksonaze 1</i>	76
3.2.3.3. Metoda određivanja koncentracije malondialdehida	79

3.2.3.4. Metoda određivanja koncentracije redukovanog glutationa	81
3.2.3.5. Metoda određivanja koncentracije ukupnih sulfhidrilnih grupa	84
3.2.3.6. Metoda određivanja prooksidativno-antioksidativnog balansa	86
<b>3.3. Ispitivanje debljine zida trbušne aorte i morfologije jetre</b>	90
3.3.1. Metoda određivanja debljine zida trbušne aorte	90
3.3.2. Metoda određivanja morfologije jetre	90
<b>4. REZULTATI I DISKUSIJA</b>	92
<b>4.1. Rezultati optimizacije HPLC metode</b>	93
4.1.1. Optimizacija metode čvrsto-tečne ekstrakcije	93
4.1.2. Optimizacija HPLC metode	100
4.1.2.1. <i>Screening</i> dizajn	102
4.1.2.2. Optimizacioni dizajn	103
4.1.3. Primena optimizovane HPLC metode	115
<b>4.2. Rezultati optimizacije i validacije LC-MS/MS metode</b>	117
4.2.1. Priprema uzoraka za LC-MS/MS analizu	117
4.2.2. Rezultati optimizacije LC-MS/MS metode	118
4.2.3. Izvođenje MS/MS analize	119
4.2.4. Validacija LC-MS/MS metode	126
4.2.4.1. Selektivnost	126
4.2.4.2. Linearnost	128
4.2.4.3. Preciznost	131
4.2.4.4. Tačnost	133
4.2.4.5. Stabilnost	134
4.2.4.6. Efikasnost postupka čvrsto-tečne ekstrakcije (Recovery)	136
4.2.4.7. Donji limit kvantifikacije (LLOQ) i limit detekcije (LOD)	137
4.2.5. Primena validirane LC-MS/MS metode	138
<b>4.3. Rezultati ispitivanja uticaja atorvastatina i ekstrakta lista artičoke na osnovne biohemijske parametre i parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite</b>	141
4.3.1. Uslovi izvođenja eksperimenta	141

4.3.2. Rezultati određivanja osnovnih biohemijskih i lipidnih parametara u plazmi pacova	143
4.3.3. Rezultati određivanja parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u plazmi	149
4.3.3.1. Rezultati određivanja prooksidativno-antioksidativnog balansa u plazmi	151
4.3.3.2. Rezultati određivanja koncentracije malondialdehida u plazmi	151
4.3.3.3. Rezultati određivanja slobodnih sulfhidrilnih grupa u plazmi	152
4.3.3.4. Rezultati određivanja koncentracije redukovanog glutationa u plazmi	153
4.3.3.5. Rezultati određivanja aktivnosti <i>paraoksonaze</i> u plazmi	154
4.3.3.6. Rezultati određivanja aktivnosti <i>superoksid-dizmutaze</i> u plazmi	155
4.3.4. Rezultati određivanja parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u hemolizatu eritrocita	156
4.3.4.1. Rezultati određivanja koncentracije malondialdehida u hemolizatu eritrocita	158
4.3.4.2. Rezultati određivanja aktivnosti <i>superoksid-dizmutaze</i> u hemolizatu eritrocita	159
4.3.4.3. Rezultati određivanja koncentracije redukovanog glutationa u hemolizatu eritrocita	160
4.3.5. Rezultati određivanja parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u tkivu jetre	161
4.3.5.1. Rezultati određivanja koncentracije malondialdehida u tkivu jetre	163
4.3.5.2. Rezultati određivanja koncentracije redukovanog glutationa u tkivu jetre	163
<b>4.4. Rezultati ispitivanja uticaja atorvastatina i ekstrakta lista artičoke na debljinu zida trbušne aorte i morfologiju jetre</b>	166
4.4.1. Rezultati ispitivanja debljine zida trbušne aorte	166
4.4.2. Rezultati ispitivanja morfologije jetre	169

<b>5. ZAKLJUČAK</b>	172
<b>6. LITERATURA</b>	175
<b>7. PRILOZI</b>	196
<b>8. BIOGRAFIJA</b>	199

## LISTA SKRAĆENICA:

ACAT – *Acil-koenzim A: holesterol aciltransferaza*

AI – Ishrana pacova sa povećanim sadržajem masti

AI + AT – Ishrana pacova sa povećanim sadržajem masti i terapija atorvastatinom

AI + AT + ELA – Ishrana pacova sa povećanim sadržajem masti i terapija kombinacijom atorvastatina i ekstrakta lista artičoke

AI + ELA – Ishrana pacova sa povećanim sadržajem masti i terapija ekstraktom lista artičoke

ALT – *Alanin-aminotransferaza*

APCI – *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

API – *Atmospheric Pressure Ionization*

AST – *Aspartat-aminotransferaza*

AT – Atorvastatin

AT-L – Atorvastatin lakton

CETP – *Cholesteryl Ester Transfer Protein*

CI – *Chemical Ionization*

DESI – *Desorption Electrospray Ionization*

DI – *Desorption Ionization*

DMP – *Decision maker parameters*

DNK – Deoksiribonukleinska kiselina

DoE – *Design of Experiments*

DTNB – 2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzoeva kiselina

DZO – Diazokson

EDTA – Etilendiamino tetrasirćetna kiselina

EI – *Electron Impact*

ELA – Ekstrakt lista artičoke

EMA – *European Medicines Agency*

ESI – *Electrospray Ionization*

FDA – *Food and Drug Administration*

FT-ICR – Furijeova transformacija - jon ciklotron rezonanca

GLU – Glukoza



GSH – Redukovani glutation

HDL – Lipoproteini velike gustine

HK – Hidrogen-peroksid komplementarne jedinice

HMG-CoA – Hidroksi-metilglutaril koenzim A

HPLC – Visoko-efikasna tečna hromatografija (*High Performance Liquid Chromatography*)

IDL – Lipoproteini srednje gustine

IMHP – 2-izopropil-4-metil-6-hidroksipirimidin

IS – Interni standard

LC/MS – Tečna hromatografija spregnuta sa masenom spektrometrijom (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*)

LCAT – Lecitin-holesterol acil transferaza

LC-MS/MS – Tečna hromatografija sa tandemskom masenom spektrometrijom (*Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*)

LDL – Lipoproteini male gustine

LLOQ – Donji limit kvantifikacije

LOD – Limit detekcije

MALDI – *Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization*

MCDM – *Multicriteria decision making*

MDA – Malondialdehid

MS – Masena spektrometrija

NADPH – Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

oOH-AT – *Orto*-hidroksi atorvastatin

PAB – Prooksidativno-antioksidativni balans

PAF – *Platelet Activating Factor*

pOH-AT – *Para*-hidroksi atorvastatin

PON1 – *Paraoksonaza 1*

PPAR $\alpha$  – *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha*

QC – *Quality Control*

QQQ – Trostruki kvadropol

Q-TOF – *Kvadropol-Time Of Flight*

RP-HPLC – Reverzno-fazna visoko-efikasna tečna hromatografija (*Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography*)

RRt – Relativno retenciono vreme

Rs – Faktor rezolucije

RSD – Relativna standardna devijacija

Rt – Retenciono vreme

SD – Standardna devijacija

SI – Standardna ishrana pacova

Sim – Simetrija

SOD – *Superoksid-dizmutaza*

SPE – Čvrsto-tečna ekstrakcija (*Solid Phase Extraction*)

SRM – *Selected Reaction Monitoring*

SSA – Sulfosalicilna kiselina

TBK – Tiobarbiturna kiselina

TBKRS – Tiobarbiturna kiselina-reagujuće supstance

TG – Trigliceridi

TM – Telesna masa

TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin

TNB<sup>2-</sup> – Anjon tionitrobenzojeve kiseline

TOF – *Time of flight*

TP – Ukupni proteini

uHOL – Ukupni holesterol

UV – Ultra-ljubičasta svetlost

VLDL – Lipoproteini veoma male gustine

WHO – *World Health Organization*

# **1. UVOD**

## 1.1. ATEROSKLEROZA

Ateroskleroza se definiše kao hronično inflamatorno oboljenje koje nastaje kao posledica dugotrajnog taloženja masnih naslaga na unutrašnjim stranama zidova krvnih sudova. Prema izveštajima Svetske Zdravstvene Organizacije (*World Health Organization*, WHO), stanja koja nastaju kao posledica razvoja ateroskleroze su vodeći uzrok smrtnosti u svetu (ishemijska bolest srca, srčani udar).

Ateroskleroza se razvija veoma sporo, tokom nekoliko decenija, bez vidljivih simptoma. Kada se pojave prve kliničke manifestacije ateroskleroze, obično je u pitanju već uznapredovala bolest.

U terapiji ateroskleroze se koristi niz lekova sa manjim ili većim uspehom. Najčešći izbor su statini, inhibitori *HMG-CoA reduktaze*. Obzirom da lekovi pokazuju i ozbiljnije ili manje ozbiljne neželjene efekte, u prevenciji ili terapiji ateroskleroze se koriste i prirodni proizvodi za koje se smatra da su potpuno bezbedni. Prirodni proizvodi koji se koriste su uglavnom ekstrakti različitih biljaka i često se primenjuju istovremeno sa lekovima. Aktivne komponente u biljnim ekstraktima mogu stupiti u interakciju sa lekovima i uticati na njihovu efikasnost, aktivnost ili metabolizam. Za mnoge od prirodnih proizvoda nije dokazana efikasnost u terapiji ili prevenciji ateroskleroze već se koriste na osnovu iskustva. Zato je veoma važno obezbediti dokaze o aktivnosti korišćenih prirodnih proizvoda i njihovim mogućim interakcijama sa lekovima sa kojima se često kombinuju.

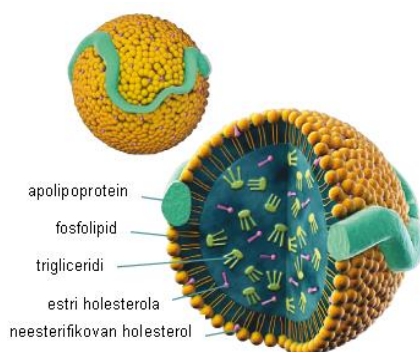
### 1.1.1. Lipidi u organizmu

Lipidi imaju višestruku ulogu u organizmu: predstavljaju najveći depo energije (trigliceridi) i strukturni su elementi ćelijske membrane (fosfolipidi čine osnovu lipidnog dvosloja u čiji sastav ulaze i glikolipidi i holesterol).

### 1.1.1.1. Transport lipida – lipoproteini

Lipidi su hidrofobna jedinjenja i ne mogu se direktno transportovati kroz krv. Transport lipida između pojedinih tkiva i organa omogućavaju makromolekulski kompleksi – **lipoproteini**. Lipoproteini imaju važnu ulogu u resorpciji holesterola, masnih kiselina dugog lanca i triglicerida, transportu triglicerida i holesterola od jetre do perifernih tkiva i transportu holesterola od perifernih tkiva do jetre.

Lipoproteini (Sl. 1) su čestice sfernog oblika. Sastoje se od hidrofobnog jezgra, koje sadrži estere holesterola i trigliceride, i hidrofилnog omotača koga izgrađuju fosfolipidni dvosloj i neesterifikovan holesterol. Fosfatna grupa fosfolipida i polarna OH grupa neesterifikovanog holesterola okrenute su ka površini čestice. Na površini lipoproteinskih čestica se nalaze i apolipoproteini. Prema novijim saznanjima (1) apolipoprotein u obliku peptidnog lanca obavija lipoproteinsku česticu.

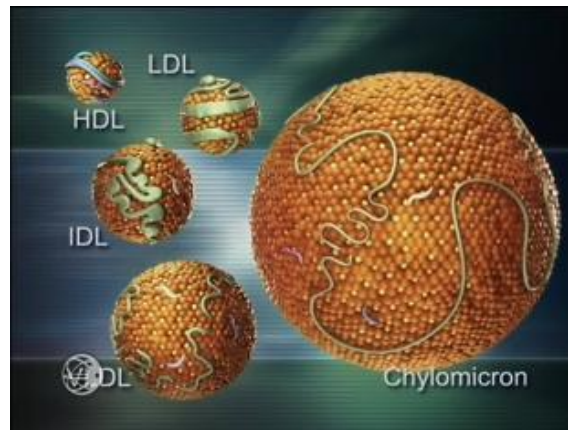


**Slika 1.** Struktura lipoproteinske čestice

(izvor slike: [http://lookfordiagnosis.com/~lookfordiagnosis/mesh\\_info.php?term=Apolipoproteins+B&lang=1](http://lookfordiagnosis.com/~lookfordiagnosis/mesh_info.php?term=Apolipoproteins+B&lang=1))

Lipoproteini se dele u četiri grupe (Sl. 2) prema odnosu zapremine hidrofobnog jezgra i hidrofилnog omotača, gustini i tipu apolipoproteina koji se nalaze na njihovoj površini:

- hilomikroni (najvećeg dijametra, najmanje gustine)
- lipoproteini veoma male gustine (VLDL)
- lipoproteini srednje gustine (IDL)
- lipoproteini male gustine (LDL)
- lipoproteini velike gustine (HDL, najmanjeg dijametra, najveće gustine)



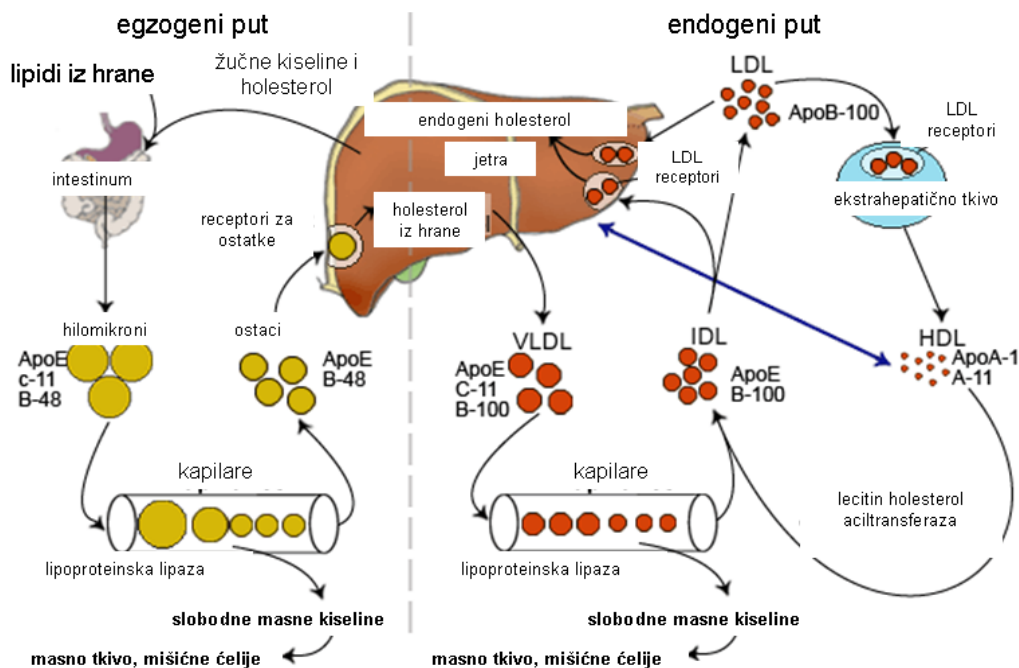
**Slika 2.** Tipovi lipoproteinskih čestica

(izvor slike: <http://thearrowsoftruth.com/tag/lipoproteins/>)

Svaka od navedenih grupa lipoproteina ima specifičan sastav lipidnih čestica i posebnu ulogu u metabolizmu tj. transportu lipida. Gustina lipoproteinskih čestica zavisi od odnosa lipida i proteina u njima. Što je veći sadržaj lipida, gustina je manja.

#### **1.1.1.2. Metabolizam lipida**

Putevi metabolizma egzogenih (unetih hranom) i endogenih (sintetisanih u organizmu) lipida se razlikuju (Sl. 3).



**Slika 3.** Egzogeni i endogeni put metabolizma lipida

(Izvor slike: [http://www.elu.sgul.ac.uk/rehash/guest/scorm/294/package/content/liver\\_lipoprotein.html](http://www.elu.sgul.ac.uk/rehash/guest/scorm/294/package/content/liver_lipoprotein.html))

### *Egzogeni put*

Holesterol i trigliceridi se resorbiraju iz gastrointestinalnog trakta i transportuju u plazmu u obliku hilomikrona (prvi transportni oblik egzogeno unetih masnoća) do kapilara u mišićnom i masnom tkivu. Na jezgro hilomikrona bogato trigliceridima deluje enzim *lipoproteinska lipaza*, a nastale slobodne masne kiseline preuzimaju tkiva. Hilomikronski ostaci, bogati estrima holesterola, dolaze do jetre i preko receptora na hepatocitima ulaze u ćelije. U hepatocitima se oslobađa kolesterol koji se dalje može deponovati, oksidovati do žučnih kiselina ili nepromenjen sekretovati u žuč. Kolesterol deponovan u jetri može ući u endogeni put metabolizma.

### *Endogeni put*

Holesterol i sintetisani trigliceridi se transportuju iz jetre do mišićnog i masnog tkiva u obliku VLDL čestica. Slično hilomikronima, jezgro VLDL čestica je bogato trigliceridima. U mišićnom i masnom tkivu dolazi do hidrolize triglicerida pod dejstvom *lipoproteinske lipaze* pri čemu nastaju slobodne masne kiseline koje ulaze u tkivo. Količina triglicerida u jezgru VLDL čestica se smanjuje kao i dijametar i one prelaze u LDL čestice, bogate kolesterolom. Ćelije preuzimaju LDL čestice procesom endocitoze,

preko posebnih LDL-receptora koji prepoznaju apolipoproteine na površini LDL čestica. Holesterol iz tkiva se može vratiti u plazmu u obliku HDL čestica. Estri holesterola u HDL česticama nastaju delovanjem enzima *lecitin-holesterol acil transferaze* (LCAT) koji se aktivira posredstvom apoA-I, proteina koji se nalazi na površini HDL. Estri holesterola se kasnije prenose na VLDL ili LDL čestice preko posebnih transportnih proteina (CETP, *Cholesteryl Ester Transfer Protein*) prisutnih u plazmi.

### 1.1.2. Hiperlipidemije

Prihvatljive koncentracije ukupnog holesterola i pojedinih lipoproteinskih čestica se razlikuju u zavisnosti od rase, nacionalne pripadnosti, pola i starosti (2). U svakom slučaju, povećana vrednost odnosa koncentracije LDL čestica i koncentracije HDL čestica je važan faktor procene rizika za razvoj ateroskleroze (3).

U krvotoku se, u svakom trenutku, može detektovati slobodan holesterol, estri holesterola, trigliceridi i fosfolipidi. **Hiperlipidemije** su stanja koja karakteriše povećanje koncentracije bilo koje od navedenih lipidnih komponenti. Pošto se lipidi u krvi nikada ne nalaze slobodni već vezani za lipoproteinske čestice, hiperlipidemije su uvek praćene **hiperlipoproteinemijama** koje su usko povezane sa razvojem ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti kao što su ishemijska bolest srca, ishemijska bolest mozga i periferna vaskularna bolest (4, 5).

Hiperlipidemije mogu biti:

- primarne (genetski uslovljene)
- sekundarne (posledica različitih faktora rizika, oboljenja ili delovanja lekova)
- kombinovane.

Podela hiperlipoproteinemija se vrši prema Fredrickson-ovoj klasifikaciji (Tabela 1). Iako ova podela ima izvesna ograničenja (ne uzima u obzir HDL holesterol i ne pravi razliku između monogeniski i poligeniski uzrokovanih poremećaja lipoproteina) još uvek se široko primenjuje.

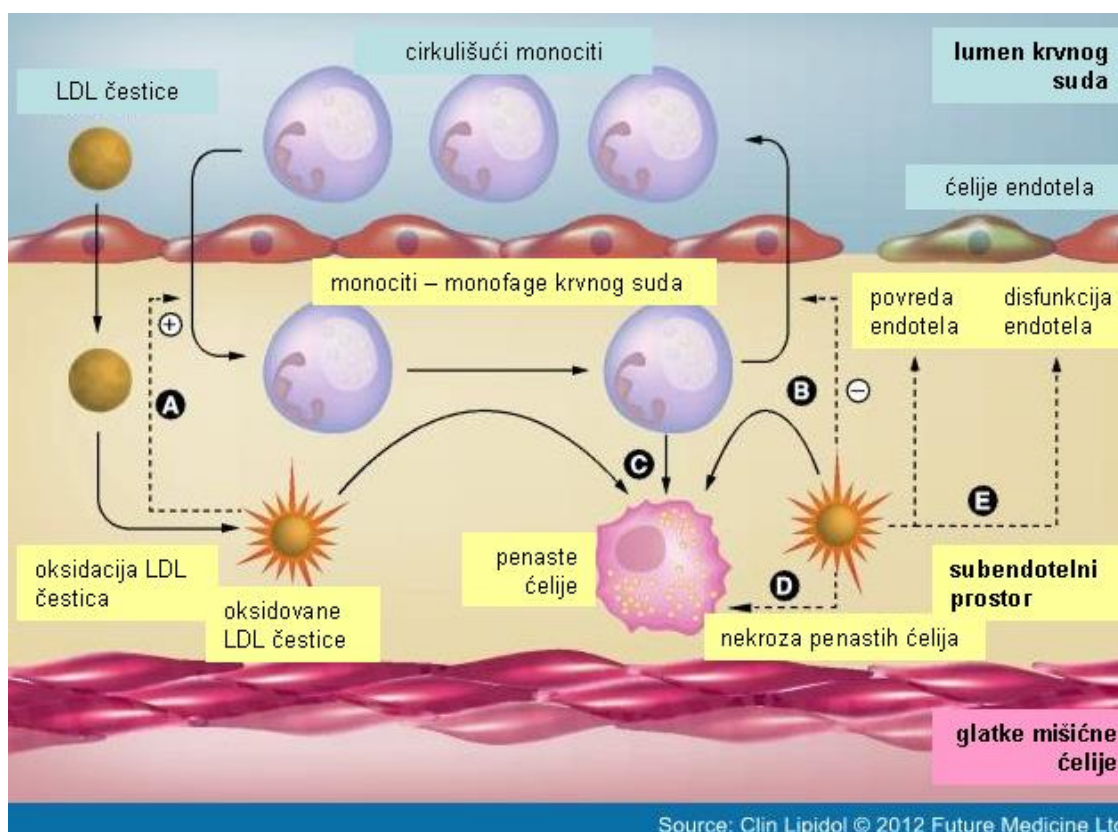


**Tabela 1.** Fredricksonova podela hiperlipoproteinemija

Tip	Sinonimi	Karakteristika	Povećani lipoproteini	Simptomi	Terapija	Izgled seruma
<b>I</b>	<i>Buerger-Gruetz-ov sindrom ili porodična hiperhilomikronemija</i>	smanjenja aktivnost lipoproteinske lipaze				
	<i>porodična apoprotein CII deficijencija</i>	izmenjen ApoC2	hilomikroni	akutni pankreatitis, <i>lipemia retinalis</i> , eruptivni ksantomi na koži, hepatosplenomegalija	kontrola ishrane	zamućen površinski sloj
		LPL inhibitor prisutan u krvi				
<b>II</b>	<i>porodična hiperholesterolemia</i>	deficijencija LDL receptora	LDL	ksantelazma, <i>arcus senilis</i> ,	adsorbensi žučnih kiselina, statini, niacin	bistar
	<i>porodična kombinovana hiperlipidemija</i>	smanjen broj LDL receptora i povećan ApoB	LDL i VLDL		statini, niacin, fibrati	bistar
<b>III</b>	<i>porodična disbetalipoproteinemija</i>	defekt u Apo E 2 sintezi	IDL	turboeruptivni ksantomi ksantomi na dlanovima	fibrati, statini	zamućen
<b>IV</b>	<i>porodična hipertrigliceridemija</i>	povećana proizvodnja i smanjeno izlučivanje VLDL	VLDL	pankreatitis u slučajevima jako visokih TG	fibrati, niacin, statini	zamućen
<b>V</b>		povećana proizvodnja VLDL i smanjena aktivnost LPL	VLDL i hilomikroni		niacin, fibrati	zamućen površinski sloj, talog na dnu

### 1.1.3. Proces aterogeneze

Aterogeneza je veoma spor proces koji se odvija više decenija tokom kojih se ne uočavaju kliničke manifestacije. Pojava prvih simptoma ukazuje na već uznapredovalu aterosklerozu. Kliničke manifestacije ateroskleroze se javljaju na specifičnim mestima u kardiovaskularnom sistemu. To su mesta sa smanjenim protokom i/ili povećanom turbulencijom krvi. Početna faza u procesu aterogeneze (Sl. 4) je zadržavanje lipoproteina bogatih holesterolom i ostataka metabolizma lipoproteina u subendotelnom prostoru krvnog suda.



**Slika 4.** Shematski prikaz procesa aterogeneze

(Izvor slike: [http://www.medscape.com/viewarticle/767759\\_2](http://www.medscape.com/viewarticle/767759_2))

Mnogi istraživači su proučavali mehanizme razvoja ateroskleroze (6, 7). Uobičajen je stav da većina faktora rizika (povišen krvni pritisak, pušenje, ishrana bogata zasićenim masnim kiselinama, dijabetes, nedostatak fizičke aktivnosti...) dovodi do početnog oštećenja endotela. Zdrav endotel proizvodi veći broj medijatora koji imaju zaštitnu ulogu, kao što je NO (8). Aterogeneza se odvija kroz nekoliko stadijuma. U početnoj

fazi dolazi do zaustavljanja LDL-holesterola u subendotelnom prostoru, gde dolazi do oksidacije ovih čestica posredstvom makrofaga. Istovremeno dolazi do oksidacije glatkih mišićnih i endotelnih ćelija. Oksidovani LDL može stimulisati hemotaksu monocita (A) i sprečiti monocite da napuste zid krvnog suda (B). Monociti se transformišu u makrofage koje preuzimaju oksidovane LDL čestice, čime nastaju penaste ćelije (C). Oksidovani LDL dovodi i do nekroze penastih ćelija (D) pri čemu dolazi do oslobađanja lizozomalnih enzima, povrede i disfunkcije endotela (E). Vremenom dolazi do progresije masnih mrlja i razvoja tranzitorne lezije, a potom i fibroznog aterogenog plaka koji može da pređe u komplikovani plak. Da li će doći do stvaranja komplikovanog plaka prvenstveno zavisi od njegovog sastava. Plakovi koji imaju tanku fibroznu kapu lakše pucaju i nazivaju se **nestabilni plakovi**. Plakovi koji imaju debelu fibroznu kapu nazivaju se **stabilni plakovi** i mnogo ređe pucaju.

Kao posledica migracije monocita, njihovog vezivanja za endotel krvnih sudova i migracije u unutrašnjost endotela javlja se proliferacija i migracija glatkih mišićnih ćelija u intimu krvnih sudova i deponovanje lipida u njima. Na ovaj način zidovi krvnih sudova zadebljavaju (9). I drugi autori (10) su došli do zaključka da povreda zida krvnog suda, koja se dešava tokom procesa aterogeneze, stimuliše proliferaciju glatkih mišićnih ćelija koje grade zid krvnog suda i dovode do zadebljanja zida. Bots i saradnici (11) su određivali debljinu zida karotidne arterije kod starijih žena sa aterosklerozom i bez ateroskleroze i, takođe zaključili da je došlo do zadebljanja aorte usled aterogenetskih promena. Slične promene u debljini zida aorte je uočio i Järvisalo (12) kod dece sa povećanim rizikom od razvoja ateroskleroze.

### 1.1.3.1. Uloga oksidativnog stresa u razvoju ateroskleroze

Slobodni radikali, kao glavni medijatori oksidativnog stresa, imaju ulogu u normalnom funkcionisanju vaskularnih ćelija (fiziološka uloga), ali i značajnu ulogu u patogenezi vaskularnih bolesti. Najznačajniji slobodni radikali su različita reaktivna jedinjenja kiseonika i azota (azot-monoksid (NO), superoksidni anjon ( $O_2^-$ ), vodonik-peroksid ( $H_2O_2$ ) i peroksinitritni anjon ( $ONOO^-$ )) (13). Azot-monoksid fiziološki nastaje u endotelnim ćelijama, dejstvom enzima *endotelijalna azot-monoksid sintaza*. U



Faktori rizika za razvoj ateroskleroze su **promenljivi faktori** kao što su hiperlipidemije (naročito hiperholesterolemija i hipertrigliceridemija), dijabetes, arterijska hipertenzija, fizička neaktivnost, pušenje, hormonski status, hronična infekcija (*Chlamydia* i virusi), gojaznost i **nepromenljivi faktori** (genetska predispozicija, pol, starost, rasa, psihosocijalni faktori i ponašanje). Danas se sve više pridaje značaj oksidativnom stresu (15-18) i inflamaciji (19, 20) kao novim faktorima rizika za razvoj kardiovaskularnih i drugih bolesti. Novija saznanja govore (21, 22) da su oba procesa, i oksidativni stres i inflamacija, uključena u proces aterogeneze. U početnom stadijumu razvoja aterosklerotske lezije dolazi do nakupljanja monocita u subendotelnom prostoru, što je reakcija na proces inflamacije. Istovremeno dolazi do oksidacije LDL čestica pod dejstvom slobodnih radikala čije je nastajanje u inflamiranom tkivu povećano. Oksidovane LDL čestice se vezuju za makrofage koje, između ostalog, nastaju i od nakupljenih monocita. Početna lezija prerasta u plak što je potencirano daljom oksidativnom modifikacijom lipida i istovremenom sekrecijom medijatora inflamacije. Oksidativni stres do kog je došlo stimuliše proces inflamacije, i obrnuto, tj. oba procesa se istovremeno odvijaju (23).

Izazov savremenih istraživača je utvrditi koji od pomenutih procesa je dominantan u razvoju ateroskleroze i koji se prvi odvija. Pitanje je da li oksidativni stres pokreće reakcije inflamacije ili obrnuto. Stocker i Keany (24) su izneli teoriju prema kojoj su oksidativni procesi posledica inflamatornih procesa. Ova teorija je dalje nadograđena i formulisana kao hipoteza oksidativne modifikacije lipoproteina (25). Ovom hipotezom su objedinjeni svi faktori koji su karakteristični za početak aterosklerotskog procesa: hiperlipidemija, inicijalna povreda endotela do koje posledično dolazi, inflamacija i oksidativni stres. Prema ovoj hipotezi, aterogeneza započinje oštećenjem endotela. Kada je ovo oštećenje dovoljno veliko, pokreće se čitav niz događaja karakterističnih za inflamaciju. Reakcije inflamacije pokreću oksidativni stres koji dodatno oštećuje endotel i formira se začarani krug koji na kraju vodi do formiranja plaka.

Jedan od poznatih mehanizama oštećenja ćelija u različitim procesima je peroksidacija lipida. Ovaj proces se dešava u humanom, životinjskom ili biljnom organizmu, u svim stanjima u kojima dolazi do oksidativnog stresa. Nastali lipidni peroksidi koji potiču od

nezasićenih masnih kiselina, su nestabilna jedinjenja i brzo se dalje razlažu na veći broj proizvoda. Jedan od najzastupljenijih proizvoda razlaganja lipidnih peroksida je malondialdehid (MDA), pa se merenje njegove koncentracije često koristi kao parametar lipidne peroksidacije.

### **1.1.3.2. Protektivna uloga HDL čestica u razvoju ateroskleroze**

U jednoj od početnih faza ateroskleroze dolazi do akumulacije penastih ćelija u subendotelnom prostoru. Ove ćelije nastaju nekontrolisanim preuzimanjem oksidovanih LDL čestica od strane monocita i/ili makrofaga (26). HDL čestice učestvuju u reverznom transportu holesterola i štite endotel od povrede (sprečavaju nakupljanje leukocita i trombocita, čuvaju antikoagulantne osobine endotela i sprečavaju proliferaciju glatkih mišićnih ćelija zida krvnog suda) (27, 28). Sem toga, HDL čestice učestvuju u inhibiciji oksidacije LDL čestica (29). Pomenute antioksidativne i antiaterogene aktivnosti HDL čestica se pripisuju različitim enzimima i proteinima koji se nalaze na njihovoj površini (*paraoksonaza 1*, *PAF-acetilhidrolaza (Platelet Activating Factor acetylhydrolase)*, *lecitin:acetil-holesterol-acil-transferaza*) (30-32). HDL ima i sposobnost uklanjanja hidroperoksida sa LDL čestica, čime ih dodatno štiti od oksidacije (33), inhibira hiperadhezivnost monocita prema endotelijumu koju indukuje oksidovani LDL i poništava uticaj oksidovanog LDL-a na endotelijum zavisnu relaksaciju arterija.

## **1.2. TERAPIJA DISLIPIDEMIJA**

Prvi korak u lečenju bilo kog oblika dislipidemije je primena **nefarmakoloških mera**, tj. promena načina života. Promena načina života podrazumeva promenu ishrane (smanjenje ukupnog unosa masti, smanjenje unosa zasićenih masnih kiselina i njihova zamena nezasićenim masnim kiselinama *cis* konfiguracije, smanjenje unosa holesterola i ugljenih hidrata (posebno mono- i disaharida), povećanje unosa dijetetskih vlakana i proteina biljnog porekla), gubitak telesne mase, aerobne fizičke vežbe, prestanak pušenja i smanjenje unosa alkohola. Tek ako ove nefarmakološke mere ne pokažu povoljne rezultate prelazi se na **farmakološke mere** tj. primenu lekova.

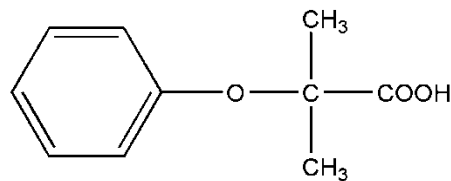
Cilj primene lekova je usporavanje razvoja ateroskleroze i smanjenje učestalosti kardiovaskularnih oboljenja koja posledično nastaju. Od primenjenih lekova se na prvom mestu očekuje da dovedu do sniženja koncentracije LDL i istovremeno do povećanja koncentracije HDL čestica. Prema preporukama Evropskog udruženja kardiologa ukupan holesterol treba da bude manji od 5 mmol/L, LDL manji od 3 mmol/L, a HDL veći od 1 mmol/L. Rezultati epidemioloških studija pokazuju da se kombinovanjem promena načina života sa primenom lekova može postići čak i regresija arteriosklerotskih lezija na koronarnim krvnim sudovima. Svi lekovi koji se trenutno koriste u terapiji hiperlipidemija nisu dovoljno efikasni i/ili bezbedni.

Lekovi koji se koriste u terapiji hiperlipidemija se mogu podeliti u nekoliko grupa u zavisnosti od mehanizma dejstva:

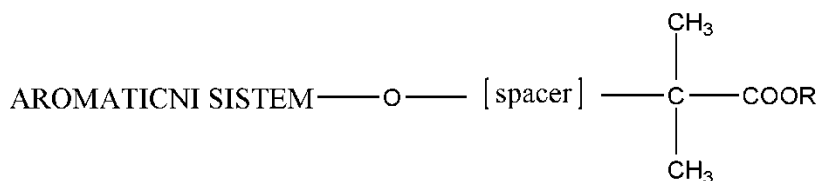
1. Inhibitori *HMG-CoA reduktaze* (statini)
2. Fibrinska kiselina i njeni derivati (fibrati)
3. Nikotinska kiselina
4. Inhibitori intestinalne resorpcije holesterola (ezetimib)
5. Smole koje vezuju žučne kiseline

### **1.2.1. Fibrinska kiselina i njeni derivati (fibrati)**

Fibrinska kiselina i fibrati (Sl. 6) povećavaju aktivnost enzima *lipoproteinske lipaze* koja vrši hidrolizu triglicerida u hilomikronima i VLDL česticama. Fibrati su agonisti PPAR $\alpha$  (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha*), nuklearnog receptora čija aktivacija stimuliše ekspresiju gena odgovornih za sintezu *lipoproteinske lipaze* (u endotelu). Aktivacija *lipoproteinske lipaze* dovodi do ushodne regulacije apoA-I i apoA-II, nishodne regulacije apoA-III (u hepatocitima) i suprimira ekspresiju gena odgovornih za sintezu apoC-III (inhibira lipolizu). Smanjenjem sinteze apoC-III ubrzava se klirens VLDL čestica (34).



FIBRINSKA KISELINA



FIBRATI

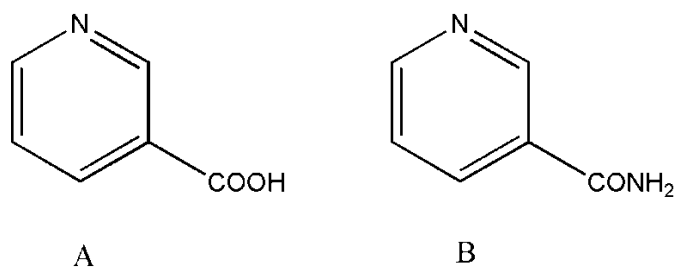
**Slika 6.** Hemijska struktura fibrinske kiseline i opšta formula fibrata

Efekti ove grupe lekova su: povećana oksidacija masnih kiselina u jetri i skeletnim mišićima, povećana lipoliza triglicerida u lipoproteinima, smanjena sinteza triglicerida i povećano preuzimanje masnih kiselina u jetri, smanjena koncentracija VLDL, blago smanjena koncentracija LDL i povećana koncentracija HDL čestica (35).

Predstavnici fibrata su gemfibrozil, ciprofibrat, klofibrat, fenofibrat, bezafibrat, beklofibrat. Fibrati su lekovi izbora u terapiji hipertrigliceridemija.

### 1.2.2. Nikotinska kiselina

Nikotinska kiselina (niacin, vitamin B3) (Sl. 7) pripada grupi hidrosolubilnih vitamina. Njeno dejstvo na nivou lipida u organizmu nije povezano sa vitaminskom ulogom. Na lipide deluje samo nikotinska kiselina, ali ne i nikotinamid (koji ima vitaminsko dejstvo).



**Slika 7.** Hemijska struktura nikotinske kiseline (A) i nikotinamida (B)

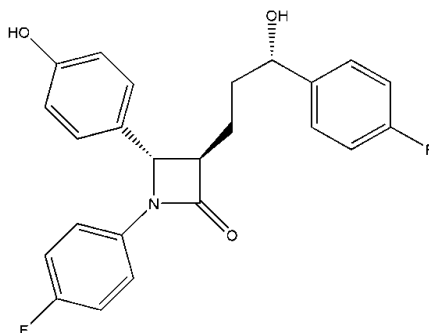


Nikotinska kiselina povećava nivo apoA-I u plazmi i na taj način dovodi do povećanja koncentracije HDL čestica. U jetri inhibira sintezu triglicerida, smanjuje sintezu i povećava klirens VLDL čestica. Nikotinska kiselina dovodi i do smanjenja koncentracije LDL čestica što je posledica inhibirane sinteze VLDL i pojačanog klirensa prekursora LDL čestica (36). Smanjenje koncentracije LDL čestica je veće ako se niacin koristi u kombinaciji sa adsorbensima žučnih kiselina.

Obzirom da je niacin i periferni vazodilatator većina pacijenata, čak i posle malih doza oseća toplotu po koži i celom telu. Ovaj neželjeni efekat se javlja pod dejstvom prostaglandina i lako se može ukloniti istovremenom primenom aspirina. Iako je niacin jedno vreme bio potisnut iz upotrebe novijim antihiperlipidemicima (statinima), novija istraživanja potvrđuju njegovu efikasnost u terapiji hiperlipidemija (37).

### 1.2.3. Inhibitori intestinalne resorpcije holesterola

Inhibitori intestinalne resorpcije holesterola su nova grupa lekova čiji je glavni predstavnik ezetimib (Sl. 8). Ezetimib je selektivni inhibitor resorpcije holesterola iz intestinuma tj. smanjuje koncentraciju holesterola u plazmi tako što sprečava njegovu resorpciju u četkastom pokrovnom epitelu tankog creva vezujući se za transportni protein u zidu creva (38). Ezetimib ne utiče na apsorpciju triglicerida, liposolubilnih vitamina i drugih lipidnih komponenti hrane. Kao posledica smanjene apsorpcije holesterola, dolazi do povećanog preuzimanja LDL čestica preko LDL receptora. Ako se koristi kao monoterapija može dovesti do kompenzatornog povećanja sinteze holesterola, pa se uglavnom kombinuje sa statinima.

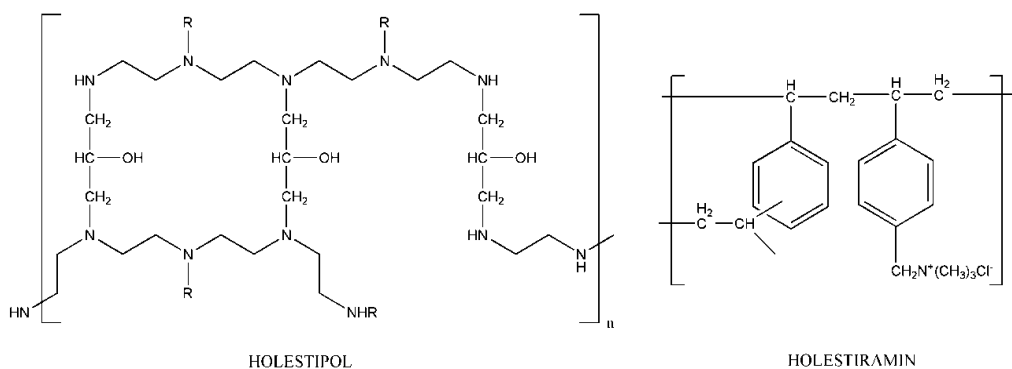


**Slika 8.** Hemijska struktura ezetimiba

## 1.2.4. Smole koje vezuju žučne kiseline

Predstavnici ove grupe lekova su holestiramin i holestipol (Sl. 9). To su sintetske smole sa osobinama anjonskih izmenjivača koje selektivno vezuju i menjaju negativno naelektrisane jone. I holestiramin i holestipol se primenjuju u obliku soli, hlorida, pri čemu hloridni jon može biti zamenjen drugim anjonom (npr. karboksilnom grupom žučne kiseline) koja ima veći afinitet za pozitivno naelektrisani ostatak smole.

Žučne kiseline se, kao metaboliti holesterola, reapsorbuju u jejunumu čak do 95 %. Nakon peroralne primene holestiramin i holestipol u crevima vezuju za sebe žučne kiseline i sprečavaju njihovu reapsorpciju i enterohepatičku cirkulaciju, dajući pritom slobodan jon hlora. Na ovaj način je onemogućena reapsorpcija žučnih kiselina što dovodi do smanjenja njihove koncentracije u hepatocitima. Da bi se nadoknadilo smanjenje koncentracije žučnih kiselina, one se ubrzano sintetišu iz endogenog holesterola. Žučne kiseline su neophodne i za resorpciju holesterola iz hrane, pa se njihovim vezivanjem još više povećava manjak holesterola u jetri. Poremećena homeostaza u jetri se kompenzuje ubrzanom sintezom LDL-receptora na membrani hepatocita i pojačavanjem aktivnosti enzima *HMG-CoA reduktaze (hidroksi-metil-glutaril-koenzim A reduktaza)*, najvažnijeg enzima u sintezi holesterola. Sa povećanjem broja LDL-receptora povećava se preuzimanje holesterola iz cirkulacije, usled čega se snižava koncentracija LDL-holesterola u plazmi (39). Ovi lekovi imaju veoma mali uticaj na nivo HDL u plazmi i mogu da dovedu do povećanja triglicerida.

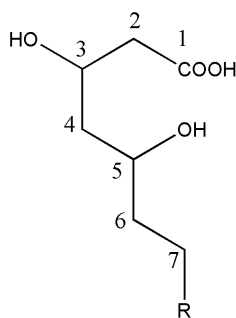


**Slika 9.** Hemijska struktura smola koje vezuju žučne kiseline

Upotrebljavaju se kao dodatna terapija kod pacijenata sa izraženom hiperholesterolemijom.

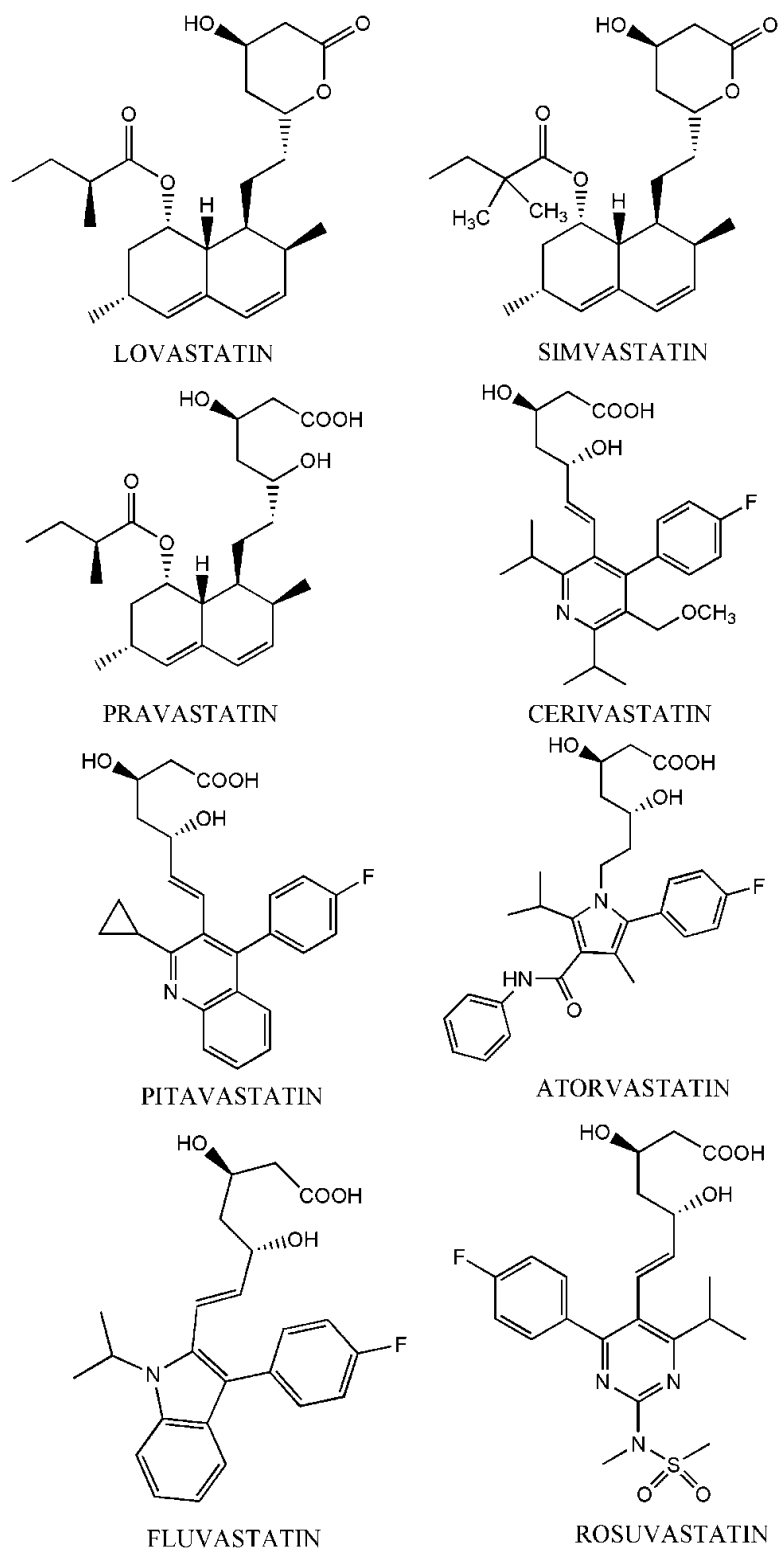
### 1.2.5. Inhibitori *HMG-CoA reduktaze* (Statini)

Statini su kompetitivni i reverzibilni inhibitori *HMG-CoA reduktaze*, enzima koji je uključen u sintezu holesterola. Svi statini su strukturno 7-supstituisani derivati 3,5-dihidroksiheptanske kiseline i predstavljaju se opštom formulom prikazanom na Slici 10.



**Slika 10.** Opšta strukturna formula statina

Predstavnici ove grupe lekova su prikazani na Slici 11.



**Slika 11.** Hemijska struktura inhibitora *HMG-CoA reduktaze*

### 1.2.5.1. Otkriće statina

Statini su otkriveni 1976. godine (40, 41). U kompaniji Sankyo je proučavana fermentaciona smeša gljivica *Penicillium citrinum* i njihovo ponašanje kada se u fermentacionoj smeši nalaze gljivice druge vrste. Uočeno je da u uslovima 'opasnosti' *Penicillium citrinum*, kao deo odbrambenog mehanizma stvaraju jedinjenja (metabolite) koji utiču na rast 'neprijateljskih' gljivica. Ovi metaboliti su izolovani, označeni (ML236-A, ML236-B, ML236-C) i proučen je njihov mehanizam dejstva (40). Otkriveno je da izolovana jedinjenja inhibiraju enzim koji katalizuje sintezu mevalonata, intermedijera u procesu sinteze ergosterola, sastavnog elementa ćelijskog zida mnogih mikroorganizama. Obzirom da postoji sličnost u strukturi ergosterola i holesterola došlo se na ideju da se ispita uticaj izolovanih metabolita na sintezu holesterola u humanoj jetri. Metabolit 236-B se pokazao efikasnim, određena je njegova struktura, nazvan je mevastatin (kompaktin) i predstavlja prvi izolovani statin.

Nedugo nakon ovog otkrića, iz fermentacione smeše gljivica *Aspergillus terreus* izolovan je drugi fermentacioni proizvod koji je, takođe, inhibirao sintezu mevalonata. Izolovani metabolit je nazvan Lovastatin, i predstavlja prvi statin koji je prošao sva klinička ispitivanja i našao se na tržištu. Tokom godina, ovi lekovi su se pokazali visoko efikasnim i, uprkos njihovoj visokoj ceni, postali su najpropisivaniji lekovi za sniženje holesterola u krvi.

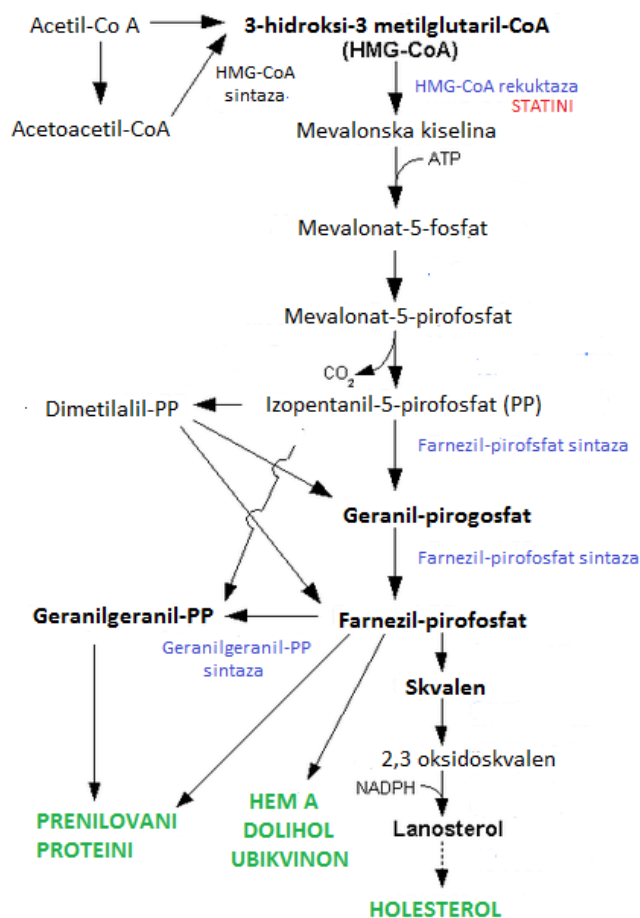
Prema načinu dobijanja, statini se mogu podeliti na :

- prirodne (lovastatin)
- polusintetske (simvastatin, pravastatin)
- sintetske (atorvastatin, fluvastatin, rosuvastatin...)

### 1.2.5.2. Sinteza holesterola

Holesterol u organizmu može biti **egzogenog** (unet hranom) i **endogenog** (sintetisan *de novo*) porekla. Endogeni holesterol se sintetiše iz acetyl-CoA kroz niz reakcija

katalizovanih enzimima (Sl. 12). U prisustvu *HMG-CoA sintaze* iz 3 molekula acetil-CoA nastaje HMG-CoA (3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A). Delovanjem *HMG-CoA reduktaze* dolazi do redukcije HMG-CoA u mevalonat. *HMG-CoA reduktaza* je glavni regulatorni enzim u sintezi holesterola. Iz mevalonata se dalje, preko niza reakcija sintetizuje skvalen, linearni prekursor holesterola. Njegovom ciklizacijom nastaje holesterol.

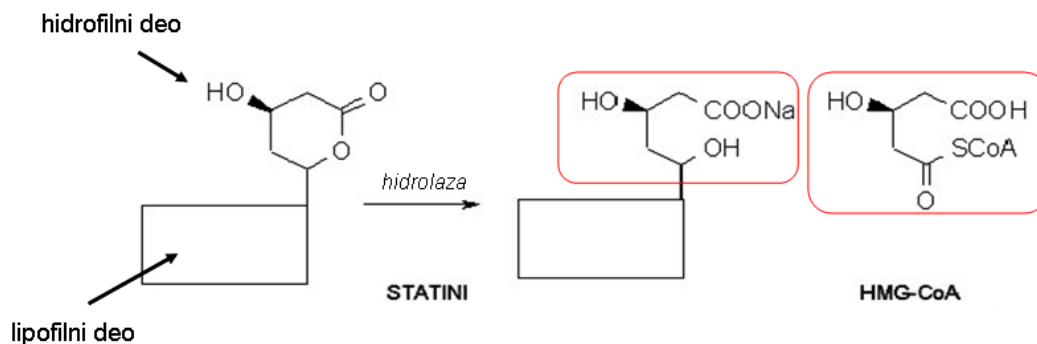


Slika 12. Shema sinteze holesterola

### 1.2.5.3. Mehanizam dejstva statina

Statini su specifični, kompetitivni i reverzibilni inhibitori *HMG-CoA reduktaze*. Inhibicijom ovog enzima smanjuje se sinteza holesterola u jetri i povećava ekspresija gena za LDL receptore u ćelijama jetre što ima za posledicu povećano preuzimanje holesterola (LDL čestica) iz krvi i smanjenje nivoa cirkulišućeg holesterola (42).

Hemijska struktura statina pokazuje sličnost sa strukturom prirodnog supstrata enzima, HMG-CoA (Sl. 13) čime se objašnjava kompetitivna inhibicija.



**Slika 13.** Strukturna sličnost statina i HMG-CoA

Svi lekovi ove grupe u svojoj strukturi imaju lipofilni i hidrofilni deo. Hidrofilni deo može biti u obliku oksi kiseline (atorvastatin, fluvastatin ili rosuvastatin) ili u obliku  $\gamma$  laktona (lovastatin, simvastatin). Statini su aktivni kao oksi kiseline, dok je lakton *pro drug* koji delovanjem enzima *hidrolaza* prelazi u otvoreni, aktivni oblik. Nastala oksi kiselina, derivat 3,5-dihidroksiheptanske kiseline, je strukturni analog HMG-CoA, što omogućava da se molekul leka kompetitivno veže za aktivno mesto na enzimu, umesto HMG-CoA. Lipofilni deo je važan za prolazak leka kroz biološke membrane u organizmu. Što je molekul lipofilniji lakše prolazi kroz membrane i više se distribuira u perifernim tkivima; povećanjem hidrofilnosti smanjuju se neželjena dejstva u perifernim tkivima, a naročito rizik od miotoksičnosti.

Način vezivanja statina za enzim je proučen kokristalizacijom nekoliko statina koji interaguju sa katalitičkim domenom humanog enzima *HMG-CoA reduktaze*. Statini koriste konformacionu fleksibilnost enzima da bi stvorili hidrofobni džep za vezivanje hidrofobnog dela molekula u blizini aktivnog mesta te tako okupiraju i džep za vezivanje HMG-a i deo površine za koju se vezuje CoA (43).

Pored kompeticije sa HMG-CoA za aktivno mesto enzima, statini menjaju i konformaciju enzima (kada se vežu za aktivno mesto) što sprečava *HMG-CoA*

*reduktazu* da zauzme funkcionalnu strukturu. Promena konformacije aktivnog mesta čini ove lekove vrlo efikasnim i specifičnim. Veza između statina i reduktaze je reverzibilna. Snižavanje holesterola u hepatocitima vodi ka povećanju broja LDL receptora na površini jetre, što uzrokuje snižavanje LDL i njegovih prekursora, IDL i VLDL čestica u krvotoku. Paralelno snižavanju LDL holesterola smanjuje se i količina triglicerida. Svi inhibitori *HMG-CoA reduktaze* mogu da dovedu do blagog povećanja nivoa HDL, mada su pojedini istraživači dobili drugačije rezultate. Paragh (44) je, između ostalog, pratio koncentraciju ukupnog holesterola, LDL čestica i HDL čestica kod hiperholesterolemičnih pacijenata koji su bili na terapiji simvastatinom ili atorvastatinom. Njegovi rezultati su pokazali da oba statina snižavaju nivo holesterola i LDL, ali da nemaju značajnog efekta na koncentraciju HDL čestica. Do sličnog zaključka su došli i Nagila i saradnici (45).

#### **1.2.5.4. Plejotropni efekti statina**

Pored direktnog dejstva na sintezu holesterola, statini pokazuju čitav niz plejotropnih efekata koji imaju povoljno dejstvo na regenerisanje oštećenja do kojih je doveo aterosklerotski proces (46). Statini ispoljavaju antiinflamatorno dejstvo na zid krvnog suda smanjujući broj inflamatornih ćelija u aterosklerotskom plaku. Ovi lekovi pokazuju i antioksidativno dejstvo koje je teško razdvojiti od antiinflamatornog dejstva jer se oba ostvaruju istim mehanizmima.

Za statine je dokazano da snižavaju nivo slobodnih radikala (47-50) i smanjuju osetljivost LDL čestica na oksidaciju (49, 51). Antioksidativno dejstvo statina se može objasniti pomoću nekoliko mehanizama. Atorvastatin inhibira nastanak superoksidnog anjona koji se dešava pod dejstvom enzima *NADPH oksidaze* (52, 53). *NADPH oksidaza* je najveći generator superoksidnog anjona u organizmu; aktivnost ovog enzima je povećana kod pacijenata sa aterosklerozom (54). Statini inhibiraju povećanu aktivnost *NADPH oksidaze* koja je indukovana oksidovanim LDL česticama (55). Drugi mehanizam antioksidativnog dejstva je povećanje ekspresije gena odgovornih za sintezu *endotelne NO sintaze* kao i povećanje aktivnosti ovog enzima (56, 57). Povećanje bioraspoloživosti NO dovodi do vazodilatacije i olakšanog protoka krvi kroz miokard,



naročito pod hipoksičnim uslovima (58) čime se štiti miokard od ishemije (59, 60). Dejstvom različitih endotoksina i citokina može doći do indukovanja posebnog oblika *azot-monoksid sintaze* čijom aktivnošću nastaju velike količine NO. Ovako velika količina NO je citotoksična jer, između ostalog, stupa u interakciju sa proteinima koji sadrže gvožđe (61, 62). Osim navedenog, statini povećavaju pokretljivost, proliferaciju, migraciju i stepen preživljavanja endotelnih matičnih ćelija u krvotoku (63). Ovaj efekat je uočljiv samo pri manjim koncentracijama statina.

Statini smanjuju aktivnost trombocita i pojavu akutnog koronarnog sindroma koji je posredovan trombocitima. Ovaj efekat najvećim delom nastaje zbog ushodne regulacije *endotelne NO sintaze* (64). Statini, takođe, inhibiraju ekspresiju tkivnog faktora na makrofagama i smanjuju njihov afinitet ka stvaranju tromba na zidu krvnog suda (65).

U istraživanju koje su izveli Nagila i saradnici (45) na pacijentima sa hiperholesterolemijom pokazalo se da atorvastatin smanjuje koncentraciju lipidnih komponenti (ukupni holesterol i LDL) i da pokazuje antioksidativno dejstvo (snižava nivo malondialdehida, konjugovanih diena, ukupnih peroksida, smanjuje indeks oksidativnog stresa, a povećava ukupnu aktivnost supstanci sa antioksidativnim dejstvom i aktivnost *paraoksonaze*). U radu se navodi da atorvastatin nije uticao na koncentraciju HDL čestica. Heeba i saradnici (66) su poredili efekat atorvastatina na koncentraciju MDA u tkivu jetre sa efektom drugih antioksidanasa (vitamin E i đumbir) kod pacova kod kojih nije izazvana hiperholesterolemija. Njihovi rezultati pokazuju da je atorvastatin prilično slab antioksidans. Poređenje koncentracije MDA u tkivu jetre zečeva koji su bili na terapiji atorvastatinom i onih koji su bili na ishrani obogaćenoj mastima (67) je dalo slične rezultate tj. veoma slab uticaj atorvastatina na smanjenje koncentracije MDA, ali je uočeno značajno povećanje koncentracije redukovano glutaciona (GSH).

#### **1.2.5.5. Neželjeni efekti statina**

Najčešći neželjeni efekti statina se javljaju u gastrointestinalnom traktu (konstipacija, naduvenost, dispepsija, abdominalni bol, dijareja, nauzeja, povraćanje), ali ovi efekti su

blagi i prolazni. Najozbiljnije posledice štetnog delovanja statina se javljaju u jetri i mišićima.

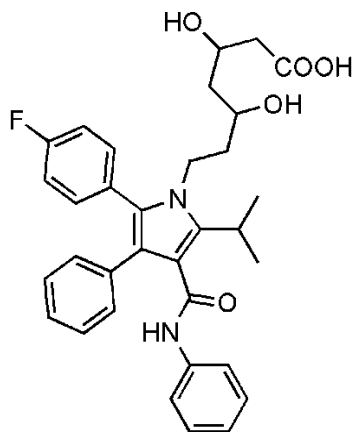
Povećanje nivoa enzima jetre - transaminaza se može javiti ubrzo nakon početka, a prestaje nakon prekida terapije (68, 69) kod malog broja pacijenata (nivo enzima može biti povećan više nego trostruko u poređenju sa gornjom granicom normalnih vrednosti). Mali porast koncentracije transaminaza je primećen i kod većine drugih lekova koji snižavaju nivo lipida. Ova pojava je odgovor na promene u metabolizmu lipida, a ne direktan efekat lekova na jetru.

Statini mogu izazvati rabdomiolizu, ali veoma retko (70, 71). To je oboljenje koje karakteriše masivna nekroza skeletnih mišića koja nastaje usled stvarnog prekida mišićne membrane i oslobađanja mišićnog proteina, mioglobina, u krvotok. Mioglobin se izlučuje putem bubrega (mioglobinurija) i može prouzrokovati prestanak funkcije bubrežnih tubula. Povećane koncentracije kalijuma koje se javljaju nakon pucanja mišićne membrane mogu dovesti do srčanih aritmija i smrti. Rizik od pojave rabdomiolize se povećava ako se statini uzimaju istovremeno sa drugim lekovima (ciklosporin, eritromicin, niacin, fibrati).

Statini mogu izazvati i mijalgiju, miopatiju i miozitis, a simptomi nestaju nakon prestanka terapije. Učestalost pojave ovih neželjenih efekata se povećava ako se statini koriste istovremeno sa lekovima koji interferiraju sa metabolizmom statina putem citohrom P450 sistema. Ako se statini koriste istovremeno sa lekovima koji inhibiraju citohromalne enzime jetre, posledično dolazi do povećanja koncentracije nepromenjenog statina u plazmi.

### 1.2.5.6. Atorvastatin

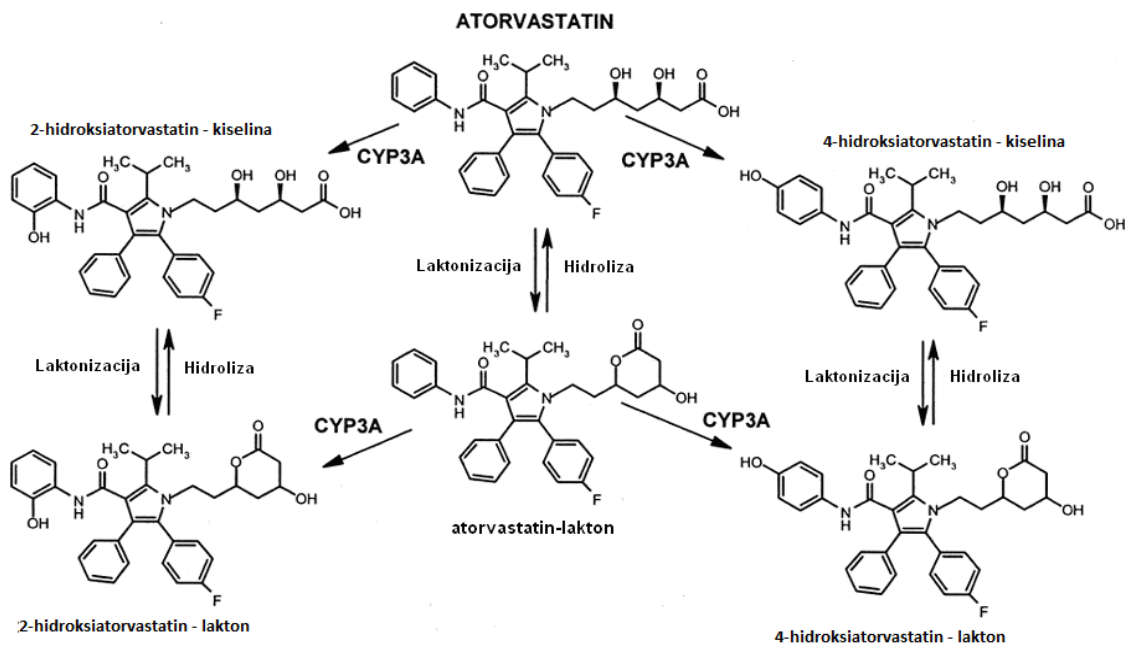
Atorvastatin (Sl. 14) je hemijski [R-(R\*,R\*)]-2-(4-fluorofenil)- $\beta,\delta$ -dihidroksi-5-(1-metiletil)-3-fenil-4-[(fenilamino)karbonil]-1H -pirol-1-heptanska kiselina.



**Slika 14.** Hemijska struktura atorvastatina

Nakon *per os* primene atorvastatin se resorbuje iz tankog creva i portalnom venom stiže u jetru gde u velikom stepenu podleže metabolizmu prvog prolaza. Mali deo unete doze prelazi u cirkulaciju pa je biološka raspoloživost leka mala (u plazmi se nalaze koncentracije reda ng/mL). Više od 98 % resorbovanog atorvastatina se vezuje za proteine plazme.

Atorvastatin se metaboliše u jetri, najvećim delom pod dejstvom CYP3A4 izoenzima u dva aktivna (*orto*-hidroksiatorvastatin i *para*-hidroksiatorvastatin) i tri neaktivna (*orto*-hidroksiatorvastatin-lakton, *para*-hidroksiatorvastatin-lakton i atorvastatin-lakton) metabolita. Od atorvastatina potiče samo 30 % ukupnog efekta leka dok od nastalih aktivnih metabolita potiče čak 70 % ukupne inhibitorne enzimske aktivnosti nakon *per os* primene. Shema metabolizma atorvastatina je prikazana na Slici 15.



**Slika 15.** Shema metabolizma atorvastatina

Obzirom da veliki broj lekova metaboliše pod dejstvom CYP3A4, moguće su interakcije na nivou metabolizma o kojima se mora voditi računa (72, 73). Atorvastatin, kao i ostali lekovi iz ove grupe, se eliminiše uglavnom putem žuči, a manjim delom putem urina.

Statini, kao lekovi koji efikasno snižavaju nivo LDL čestica i pokazuju antioksidativno dejstvo, su prvi izbor u terapiji ateroskleroze. Ipak, obzirom na mogućnost pojave rabdomiolize (u retkim slučajevima, ali sa veoma ozbiljnim posledicama) oni nisu idealni lekovi. Danas se sve više radi na razvoju novih lekova koji će delovati na različite aspekte uključene u patogenezu ateroskleroze, a sa što manje neželjenih efekata.

### 1.2.6. Prirodni proizvodi

Biljne droge se već hiljadama godina koriste u narodnoj medicini za tretman različitih hroničnih bolesti. Njihova upotreba se bazira na godinama iskustva prenošenog sa „kolena na koleno“. Mnogi biljni ekstrakti ili kombinovani ekstrakti nekoliko biljaka

imaju dokazanu efikasnost i ponekad prednost u prevenciji velikog broja oboljenja u odnosu na klasične lekove. Biljni ekstrakti sadrže veliki broj jedinjenja koji mogu delovati sinergistički, na različita ciljna mesta, sa ukupnim povoljnim efektom za pacijenta (74).

Neki biljni preparati deluju na lipide u organizmu, drugi se ponašaju kao antioksidansi, a treći pokazuju i jedno i drugo dejstvo (75). Jedinjenja izolovana iz pojedinih biljaka utiču na resorpciju i sintezu holesterola. Npr. glabrol izolovan iz biljke *Glycyrrhiza glabra* je inhibitor enzima *acil-koenzim A: holesterol aciltransferaze* (ACAT) i blokira esterifikaciju i apsorpciju slobodnog holesterola (76). Kurkumin iz biljke *Curcuma longa* povećava ekspresiju kaveolina-1 i inhibira akumulaciju holesterola (77). Nivo lipida u organizmu različitim mehanizmima snižavaju i sveti bosiljak, *Ocimum Sanctum* L. (78), seme ukrasne bilje Devojka u zelenom, *Nigella Sativa* L. (79), zeleni čaj, *Camellia sinensis* L. (80), beli luk, *Allium sativum* L. (81) kao i niz drugih biljaka rasprostranjenih u raznim područjima sveta.

Veliki broj biljnih ekstrakata ili jedinjenja izolovanih iz biljnog materijala pokazuje antioksidativno dejstvo. Za ekstrakte izolovane iz biljaka *Polygonum multiflorum*, *Rheum undulatum*, *Salvia miltiorrhiza* je dokazano da obnavljaju funkciju endotela (82-85). Za berberin, izolovan iz biljke *Coptis chinensis* (86) i ekstrakt biljke *Morus alba* (87) koji je bogat polifenolima dokazano je da inhibiraju proliferaciju i/ili migraciju glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova.

Antioksidativno dejstvo biljaka potiče od jedinjenja koja su uglavnom fenolne strukture (flavonoidi, fenolne kiseline, stilbeni, tanini, lignani) (88). Fenoli su antioksidansi jer se ponašaju kao donori vodonika tj. redukujući agensi. Mnogi fenoli imaju i sposobnost da grade helatne komplekse sa metalima (89). Dokazano je da su aronija (*Aronia melanocarpa*), brusnica (*Vaccinium oxycoccus*), artičoka (*Cynara scolymus*), majčina dušica (*Thymus vulgaris*) biljke bogate fenolima. Primena ovih biljaka u prevenciji ateroskleroze ili kao dopunska terapija je opravdana.

### 1.2.6.1. Artičoka (*Cynara scolymus* L.)

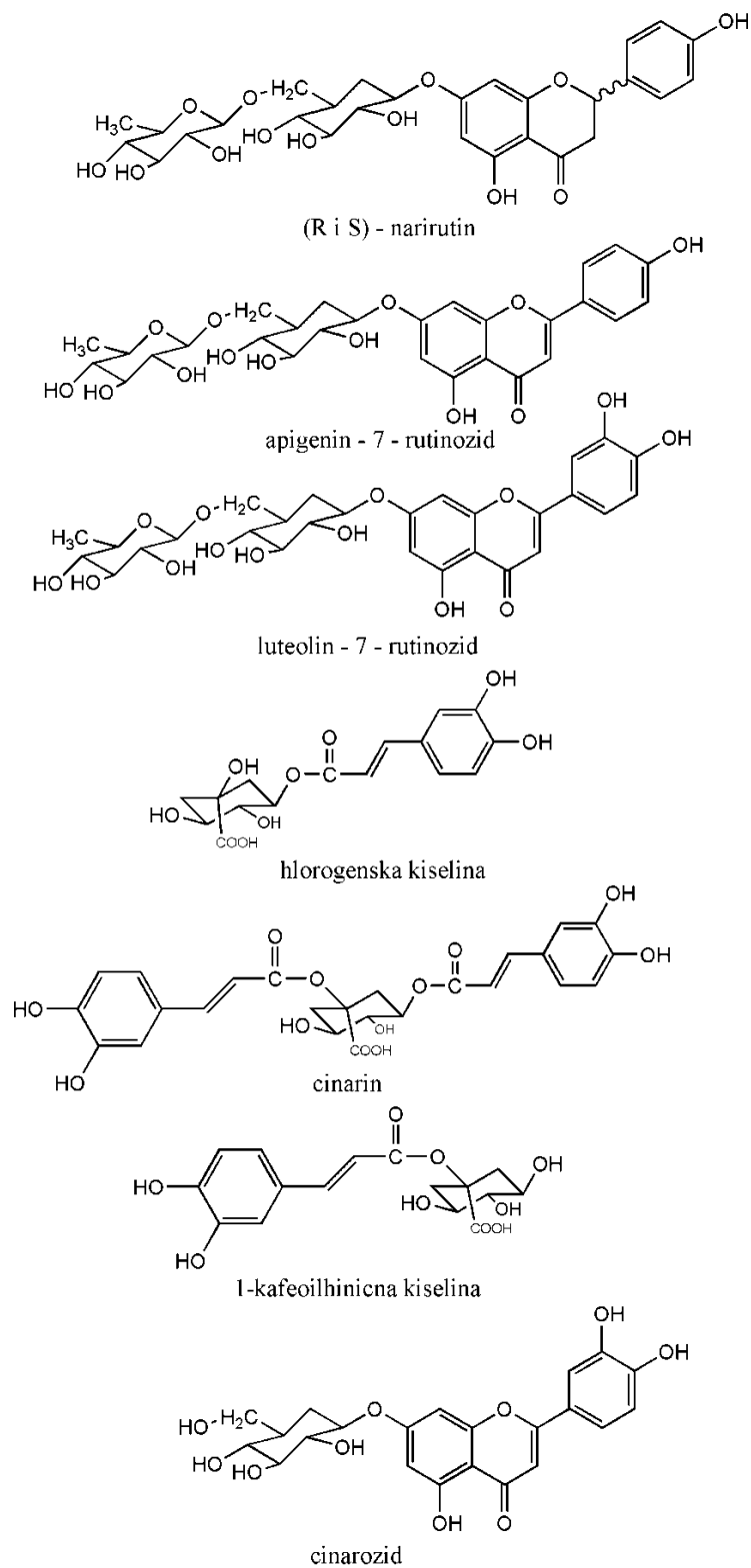
Artičoka (*Cynara scolymus* L. *Asteraceae*) je zeljasta, jednogodišnja biljka (Sl. 16) prirodno rasprostranjena širom Mediterana, ali se uzgaja u mnogim delovima sveta sa toplijom klimom. Veliki pupoljak koji se formira na vrhu biljke se koristi u humanoj ishrani, kao popularan sastojak mediteranske kuhinje.



**Slika 16.** Artičoka (*Cynara scolymus* L.)

(izvor slike: [http://www.harvesttotable.com/2009/06/artichoke\\_growing\\_problems\\_tro/artichoke-buds/](http://www.harvesttotable.com/2009/06/artichoke_growing_problems_tro/artichoke-buds/))

Svi delovi artičoke su bogati jedinjenjima koja se ponašaju kao prirodni antioksidansi (90, 91). Ove supstance su bogate fenolnim funkcionalnim grupama koje su donori vodonika (Sl. 17).



**Slika 17.** Jedinjenja izolovana iz ekstrakta lista artičoke

Postoje dokazi da neka jedinjenja koja ulaze u sastav ekstrakta artičoke, pored antioksidativnog dejstva, pokazuju i antihiperlipidemijsko dejstvo (92, 93). *In vitro*

istraživanja (94, 95) su pokazala da ekstrakt lista artičoke (ELA) smanjuje nastanak reaktivnih jedinjenja kiseonika, oksidaciju LDL čestica i peroksidaciju lipida. Ovakvi rezultati istraživanja ukazuju da primena preparata artičoke može biti opravdana u prevenciji i/ili kao dopunska terapija lekovima koji se koriste u terapiji ateroskleroze.

Rezultate *in vivo* i *in vitro* istraživanja koji pokazuju da ekstrakt lista artičoke ima antioksidativno, hepatoprotektivno, holeretično i antiholestatsko dejstvo objavio je Kraft (96). U radu se navodi da ekstrakt lista artičoke sprečava oksidaciju LDL čestica i inhibira sintezu holesterola. Kraft je došao do zaključka da je luteolin glavna aktivna komponenta ELA, odgovorna za većinu efekata, ali drugi autori ukazuju da u ekstraktu lista artičoke ima mnogo više jedinjenja sa antioksidativnim dejstvom. Gebhardt i Fausel (95) su izvodili *in vitro* testove u cilju identifikacije aktivnih komponenti ELA. Ispitali su antioksidativno i hepatoprotektivno dejstvo hlorogenske i kofeinske kiseline, cinarina i cinarozida. Kofeinska kiseline se pokazala kao najbolji antioksidans u dva *in vivo* testa (praćeno je smanjenje stvaranja MDA i promena aktivnosti *ksantin-oksidadze*), dok su sva četiri jedinjenja pokazala isto hepatoprotektivno dejstvo. Efekat ELA na parametre oksidativnog stresa i lipidne komponente su pratili Kuskü-Kiraz i saradnici (97). Ovi istraživači su izazvali hiperholesterolemiju standardnom hranom kojoj je dodat holesterol i natrijum-holat. Jedan od rezultata koji su dobili je da ELA ne utiče na koncentraciju HDL čestica, mada smanjuje odnos ukupnog holesterola i HDL čestica. Jiménez-Escrig i saradnici (69) su izveli eksperiment na dve grupe životinja – jedna je primala hranu kojoj je dodata ELA, a druga standardnu hranu. Životinje su žrtvovane nakon tri nedelje tretmana. U radu je praćena aktivnost više enzima koji su markeri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite (*superoksid-dizmutaza*, *glutation-peroksidaza*, *glutation-reduktaza* i *katalaza*), ali je samo aktivnost *glutation-peroksidaze* bila povećana u grupi koja je bila na terapiji sa ELA.

Mehmetçik (98) je izazvao oksidativni stres kod pacova primenom ugljen-tetrahlorida (ugljen-tetrahlorid se često koristi kao agens za eksperimentalno izazivanje oksidativnog stresa (99)). Životinje su najpre tretirane ekstraktom lista artičoke dve nedelje, a onda im je data injekcija ugljen-tetrahlorida. Druga grupa životinja nije primala ekstrakt lista artičoke već je samo tretirana ugljen-tetrahloridom. Kod životinja



kod kojih je izazvan oksidativni stres, u tkivu jetre je povećana koncentracija malondialdehida, a smanjena koncentracija redukovanog glutationa. Zaključeno je da je ekstrakt lista artičoke doveo do značajnog smanjenja koncentracije MDA i povećanja koncentracije GSH u grupi životinja koje su tretirane ovim ekstraktom.

### **1.3. METODE ZA ODREĐIVANJE SADRŽAJA ATORVASTATINA**

U literaturi su opisane metode za određivanje atorvastatina u doziranim oblicima (100, 101), njegovih nečistoća (102, 103), kao i metode koje omogućavaju praćenje interakcija atorvastatina sa lekovima koji se istovremeno primenjuju u terapiji (metforminom i glimepiridom (104), aspirinom (105), amlodipinom, ramiprilom i benazeprilom (106), atenololom (107) i mnogim drugim).

Za određivanje sadržaja atorvastatina *in bulk*, primenjene su različite tehnike: inhibicija enzima (108), radioimunološke metode (109), elektrohemijske metode (110), metode visoko-efikasne tečne hromatografije sa UV detekcijom (111-114), tečna hromatografija spregnuta sa masenom spektrometrijom (115), tečna hromatografija na kolonama malog dijametra (*microbore column HPLC*) povezana sa tandemskom masenom spektrometrijom (116) i tečna hromatografija povezana sa tandemskom masenom spektrofotometrijom (117-126). Svaka od navedenih metoda ima izvesna ograničenja: imunološke metode nisu dovoljno specifične zbog mogućih interferencija; inhibicija enzima je dobra za određivanje inhibitornog dejstva atorvastatina na *HMG-CoA reduktazu*, ali ne daje podatke o aktivnosti metabolita. Metode tečne hromatografije sa UV detekcijom nisu dovoljno osetljive zbog prirode samog UV detektora. Metode tečne hromatografije spregnute sa tandemskom masenom spektrometrijom su metode izbora jer su dovoljno osetljive za određivanje male koncentracije metabolita prisutnih u uzorcima.

Kako je jedan od ciljeva rada ispitivanje moguće interakcije atorvastatina i ELA, koja se procenjuje na osnovu određivanja sadržaja atorvastatina i aktivnih metabolita (*orto-*

hidroksiatorvastatina i *para*-hidroksiatorvastatina), i pošto se određivanje koncentracije vrši u biološkom materijalu neophodno je primeniti dovoljno osetljivu metodu. Do sada opisane metode kojima se određuje atorvastatin i metaboliti (117-122) se međusobno razlikuju po osetljivosti tj. postignutom limitu detekcije i kvantifikacije, načinu pripreme uzoraka (čvrsto-tečna ekstrakcija, tečno-tečna ekstrakcija ili precipitacija proteina), jednostavnosti izvođenja (izokratski ili gradijentno, dve komponente mobilne faze ili više, jedna ili više kolona), trajanju analize i broju različitih metabolita koji se detektuju.

### **1.3.1. Tečna hromatografija sa tandemskom masenom spektrometrijom (LC-MS/MS)**

Masena spektrometrija (MS) je analitička metoda kojom se razdvajaju smeše jona na osnovu odnosa masa/naelektrisanje ( $m/z$ ). U kombinaciji sa hromatografskim separacionim metodama, posebno sa HPLC metodom, masena spektrometrija tj. LC/MS je vodeća metoda za analizu smeša u farmaceutskim istraživanjima i razvoju novih lekova. Nezamenjiva je upotreba LC/MS metoda za identifikaciju i određivanje metabolita lekova i praćenje farmakokinetike, karakterizaciju nečistoća i proizvoda degradacije lekovitih supstanci. Današnji LC/MS uređaji omogućavaju formiranje biblioteka koje se mogu koristiti prilikom identifikacije nepoznatih jedinjenja.

Za razdvajanje i određivanje jona sa različitim odnosima mase i naelektrisanja ( $m/z$ ) u vakuumu koriste se različiti principi fizike. Svaki maseni spektrometar snima maseni spektar jedinjenja kroz 4 osnovna koraka:

- I. uvođenje uzorka u uređaj;
- II. jonizacija uzorka (prevođenje neutralnih molekula u jone u gasovitom stanju);
- III. filtriranje dobijenih gasovitih jona prema odnosu  $m/z$  – **maseni analizator**;
- IV. detekcija razdvojenih jona.

Osnovne komponente uređaja su **izvor jona i maseni analizator**. U zavisnosti od očekivanih rezultata i prirode uzorka, bira se uređaj sa odgovarajućim karakteristikama.

#### **1.3.1.1. Metode jonizacije**

Idealna jonizacija u masenom spektrometru bi trebalo da obezbedi visoku efikasnost, ali i dovoljnu stabilnost dobijenih jona za dalju analizu u masenom analizatoru. Postoje različite metode jonizacije: jonizacija napadom elektrona (*Electron Impact*, EI), hemijska jonizacija (*Chemical Ionization*, CI), jonizacija desorpcijom (*Desorption Ionization*, DI), matriksom potpomognuta laserska desorpcija/jonizacija (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*, MALDI), jonizacija desorpcijom pomoću elektrospreja (*Desorption Electrospray Ionization*, DESI), jonizacija elektrosprejom (*Electrospray Ionization*, ESI) i hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI) (Tabela 2).

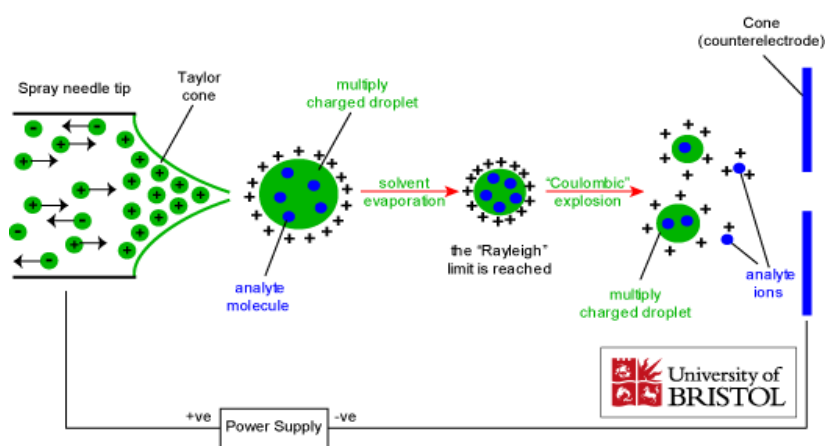
**Tabela 2.** Metode jonizacije koje se koriste u masenoj spektrometriji

Metoda jonizacije	Jonizacioni agens	Osobine	Ograničenja
EI	elektroni	intenzivna fragmentacija, reproduktivan spektar, dobre baze podataka	koristi se za isparljiva, nepolarna jedinjenja
CI	joni gasa reaktanta	dominantan molekularni jon sa fragmentacijom koja se lako kontroliše	koristi se za nepolarna i umereno polarna jedinjenja, ograničena fragmentacija
APCI	elektroda / joni gasa reaktanta	radi na atmosferskom pritisku, jednostavno povezivanje sa HPLC-om, dominantan molekularni jon	koristi se za nepolarna do umereno polarna jedinjenja
DI	energetske čestice (atomi, joni), fotoni	dominantan molekularni jon jedinjenja sa velikom masom	teško se povezuje sa HPLC-om
ESI	visoko električno polje	radi na atmosferskom pritisku, lako se povezuje sa HPLC-om, višestruko naelektrisani joni velikih biomolekula	loši rezultati za nepolarna jedinjenja, slaba fragmentacija

### 1.3.1.2. Unošenje uzorka u maseni spektrometar

Trenutno se najviše koriste metode jonizacije pod atmosferskim pritiskom (*Atmospheric Pressure Ionization, API*), u koje se ubrajaju ESI i APCI.

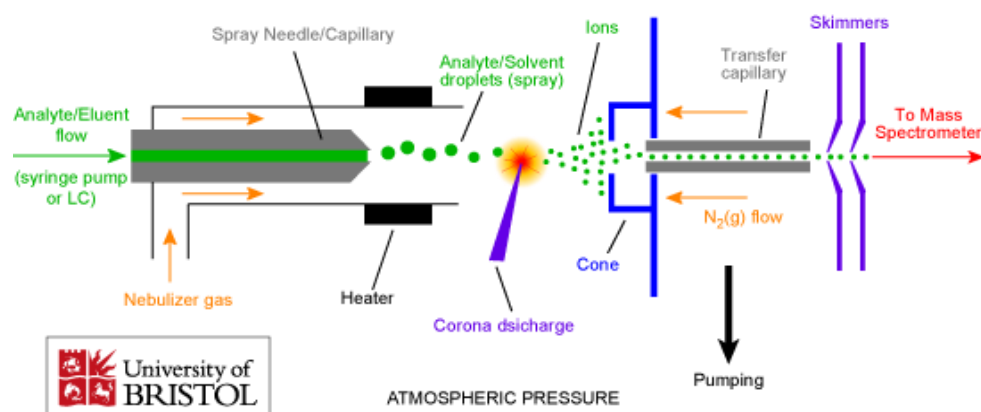
- *Elektrosprej jonizacija (ESI)* je prikazana na Slici 18. Osnovni ESI aparat se sastoji od kapilare od nerđajućeg čelika (preko koje se u jonski izvor uvodi uzorak rastvoren u polarnom isparljivom rastvaraču), termalne ili pneumatske komore za desolvataciju i vakuuma. Kraj kapilare je pod visokim električnim naponom (4-5 kV). Prvi korak u nastanku jona je nakupljanje naelektrisanja na površini kapljice na vrhu kapilare pod dejstvom visokog električnog napona. Nakon odvajanja od kapilare, formirana kapljica se pretvara u visokonaelektrisanu česticu aerosola. Sledeći korak je uklanjanje rastvarača isparavanjem i smanjivanje kapljica čime se povećava gustina naelektrisanja na površini. Kada kulonove sile nadmaše površinski napon, kapljice se raspadnu na još manje kapljice. Dalji proces uparavanja dovodi do stvaranja jona analita. Jedna od najznačajnijih osobina ESI je mogućnost formiranja višestruko naelektrisanih jona proteina i peptida. Obzirom da maseni spektrometar meri odnos mase i naelektrisanja, višestruko naelektrisani joni će se pojaviti u masenom spektru na  $m/z$  vrednostima koje su deo njihove molekulske mase što omogućava detekciju proteina tj. peptida sa velikom molekulskom masom (do 3000 Da raspon masa).



**Slika 18.** Elektrosprej jonizacija (ESI)

(izvor slike: <http://www.bris.ac.uk/nerclsmf/techniques/hplcms.html>)

- *Hemijska jonizacija na atmosferskom pritisku (APCI)* je prikazana na Slici 19. Rastvor uzorka se uvodi u raspršivač sličan onom koji se koristi u ESI metodi, ali bez primene visokog električnog napona. Gas za raspršivanje (obično N<sub>2</sub>) se dodaje da pomogne proces desolvatacije i jonizacije. Kako se za uklanjanje rastvarača koristi grejač i temperatura od 400 do 500 °C, dolazi do minimalne degradacije uzorka. Visikonaponska igla (3-5 kV) stvara struju i indukuje jonizaciju rastvarača, nastali joni rastvarača reaguju sa molekulima analita u gasnoj fazi i nastaju joni analita. Kod APCI metode je proces formiranja jona razdvojen od procesa uparavanja rastvarača (razlika od ESI metode), što omogućava primenu rastvarača koji ne jonizuju lako. Za razliku od ESI, APCI ne formira polivalentne jone jedinjenja velike molekulske mase, a odgovor je direktno proporcionalan ukupnoj količini analita. APCI jonizacija je najefikasnija pri većim protocima mobilne faze (1-2 mL/min), što metodu čini idealnom za povezivanje sa HPLC sistemom.



**Slika 19.** Hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom (APCI)

(izvor slike: <http://www.bris.ac.uk/nerclsmf/techniques/hplcms.html>)

Postoje i drugi načini unošenja uzorka u MS koji se koriste kod analize nepolarnih ili neutralnih jedinjenja. U ove metode se ubrajaju metoda sa snopom čestica (*Particle Beam*) i fotojonizacija pod atmosferskim pritiskom (*Atmospheric Pressure Photoionization*).

### 1.3.1.3. Maseni analizatori

Osnovna uloga masenog analizatora je određivanje odnosa mase i naelektrisanja jona ( $m/z$ ) i razdvajanje jona. Principi rada različitih masenih analizatora zavise od interakcije naelektrisanih čestica sa električnim ili magnetnim poljem. Najčešće korišćeni maseni analizatori su: magnetni sektor, kvadropol, 'ion trap' (zamka za jone), 'time-of-flight' (vreme leta, TOF) i Furijeova transformacija - jon ciklotron rezonanca (FT-ICR). Moguća je kombinacija različitih masenih analizatora pa postoje maseni spektrometri spregnuti sa masenim spektrometrom (MS/MS ili tandemska masena spektrometrija) koji se najviše koriste za strukturnu karakterizaciju.

### 1.3.1.4. Tandemska masena spektrometrija (MS/MS)

Maseni spektrometar spregnut sa masenim spektrometrom (tandemska masena spektrometrija) omogućava ispitivanje određenih jona u smešama više različitih jona. Pomoću prvog analizatora izdvaja se posmatrani jon koji dalje, u kolizionoj ćeliji, biva izložen molekulima gasa (helijum ili argon) pri čemu dolazi do fragmentacije. Proizvodi fragmentacije se detektuju nakon prolaska kroz drugi analizator i krajnji rezultat je MS/MS spektar. Na ovaj način identifikacija ispitivanog jedinjenja se vrši ne samo na osnovu molekulske mase, već i na osnovu specifičnih i karakterističnih fragmenata. MS/MS eksperimenti se mogu izvesti sa različitim kombinacijama masenih analizatora (višestruki sektor instrument, trostruki kvadropol (QQQ) i kvadropol-TOF (Q-TOF)).

Trostruki kvadropol se sastoji od tri uzastopna kvadropola u seriji, pri čemu se prvi ponaša kao filter masa, drugi kao koliziona ćelija (gde se prethodno odabrani joni fragmentuju), a treći kao filter koji odabrane jone propušta do detektora.

Na Slici 20. su prikazana tri različita načina korišćenja QQQ:

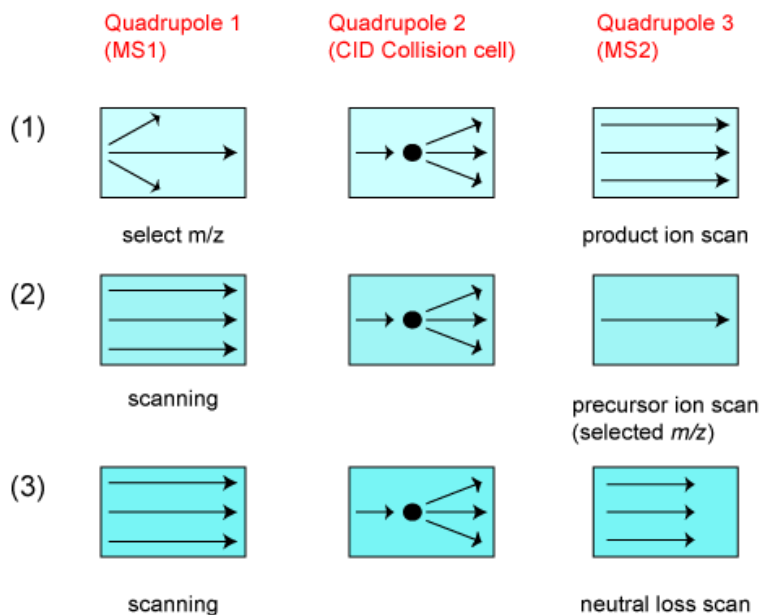
**(1) Skeniranje produkt jona.** Prvi kvadropol (Q1) može biti podešen da izdvoji specifične jone nastale iz određenog uzorka, najčešće molekulske  $(M+H)^+$  ili  $(M-H)^-$  jone. Izabrani joni ulaze u kolizionu ćeliju (Q2) gde se bombarduju molekulima inertnog gasa što dovodi do stvaranja jona fragmenata. Joni fragmenata se analiziraju,

odnosno razdvajaju prema masenim odnosima  $m/z$  u drugom analizatoru (Q3) i dobija se tzv. *fingerprint* obrazac koji je specifičan za ispitivano jedinjenje. Ova vrsta eksperimenta se označava kao skeniranje produkt jona (eng. *product ion scanning*) i naročito je korisna za dobijanje informacija o strukturi malih organskih molekula i za određivanje sekvence peptida.

**(2) Skeniranje prekursor jona.** Q1 omogućava transmisiju svih jona nastalih iz uzorka, pri čemu se Q3 podešava tako da prati specifične fragmentne jone koji se dobijaju bombardovanjem jona uzorka gasom u kolizionoj ćeliji. Ovaj pristup se koristi za identifikovanje klase jedinjenja koji proizvode isti fragment. Na primer, kod detekcije fosforilisanih peptida, skeniranje prekursor jona koji daju fragment jon na  $m/z$  79 ( $\text{PO}_3^-$ ) u negativnom MS/MS modu ukazuje na prisustvo fosfopeptida.

**(3) Skeniranje konstantnog neutralnog gubitka.** I prvi i treći kvadropol su podešeni na skeniranje odnosno prikupljanje podataka u celom opsegu odnosa  $m/z$ , ali treći kvadropol detektuje samo one jone iz prvog koji se razlikuju za određeni broj masenih jedinica (ekvivalentnih neutralnom fragmentu). Neutralni fragment može biti  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{HCN}$  ili  $\text{H}_2\text{S}$ . Ova vrsta eksperimenta je veoma korisna za identifikaciju prisustva neke funkcionalne grupe. Na primer, ispitivanje svih karboksilnih kiselina u smeši se može pratiti na osnovu gubitka neutralnog molekula  $\text{CO}_2$ .





**Slika 20.** Trostruki kvadropol maseni analizator  
(izvor slike: <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/msms.xhtml>)

### 1.3.2. Metode prečišćavanja uzoraka

Analitičke metode koje se koriste za određivanje leka i metabolita u biološkom materijalu zahtevaju važan korak prethodne pripreme uzoraka koji za cilj ima prečišćavanje i eventualno koncentrisanje analiziranih komponenti. Dobro izabrana i optimizovana metoda za pripremu uzoraka je podjednako važna kao i sama analitička metoda. Postoji više tehnika koje se mogu koristiti za pripremu uzoraka (čvrsto-tečna ekstrakcija, tečno-tečna ekstrakcija, precipitacija proteina), a izbor odgovarajuće zavisi od koncentracije analita u uzorku i vrste biološkog materijala (127). Metoda precipitacije proteina se zasniva na taloženju proteina iz biološkog uzorka organskim rastvaračem (najčešće acetonitrilom). Nakon dodavanja acetonitrila uzorak se centrifugira pomoću ultracentrifuge (14000 x g), pri čemu se proteini odvajaju u obliku čvrstog diska na dnu ependorfe, a bistri supernatant se odvajaju u viala koje se direktno prenose u autosempler. Metoda je jednostavna, brza, omogućava rad sa velikim brojem uzoraka istovremeno. Neki autori su koristili metodu precipitacije proteina za pripremu uzoraka plazme za određivanje atorvastatina i metabolita (118). Metoda tečno-tečne ekstrakcije se zasniva na različitoj rastvorljivosti analiziranih komponenti u vodenoj fazi

i organskim rastvaračima. Primenom odgovarajućeg rastvarača, daljim uparavanjem i rekonstituisanjem mogu se dobiti visoki prinosi ekstrakcije. Ova metoda je u prošlosti bila najčešće primenjivana metoda ekstrakcije (117, 119, 120). Glavna ograničenja tačno-tečne ekstrakcije su nemogućnost rada sa velikim brojem uzoraka istovremeno i potreba za dodatnim koracima uparavanja i rekonstituisanja (većina organskih rastvarača se ne može koristiti u masenoj spektrometriji). Metoda čvrsto-tečne ekstrakcije (*Solid Phase Extraction*, SPE) se zasniva na vezivanju aktivnih komponenti iz biološkog uzorka za čvrsti sorbens koji je pakovan u kertridže. U zavisnosti od punjenja kertridža i afiniteta svake od komponenti prema sorbensu, analizirane supstance se vezuju silama različite jačine. Nakon ispiranja kertridža, komponente se eluiraju rastvaračem za koji pokazuju veći afinitet u odnosu na sorbens. Danas postoji veliki broj kertridža različitih veličina i punjenja, što omogućava efikasnu ekstrakciju strukturno različitih jedinjenja. SPE metoda je najčešće korišćena metoda prečišćavanja uzoraka, posebno za pripremu uzoraka za LC-MS/MS (121).

Najveći problem kod analize uzoraka biološkog materijala je kompleksnost i varijabilnost sastava samog matriksa. U plazmi postoji veliki broj endogenih komponenti koje mogu biti prisutne u velikoj koncentraciji, značajno većoj od koncentracije analiziranih jedinjenja. Čak i hemijska struktura nekih od endogenih komponenti može biti slična strukturi analita. Ovaj problem nije toliko izražen prilikom izvođenja LC-MS/MS metoda jer ove metode omogućavaju praćenje jednog produkta nastalog od određenog prekursora. Sa druge strane, kod primene LC-MS/MS metoda endogene supstance mogu dovesti do supresije jonizacije analita. Prilikom izvođenja HPLC metoda, endogene supstance koje sadrže hromofore i pokazuju apsorpciju u UV oblasti mogu dati pik na hromatogramu koji je znatno veći od analiziranih pikova, pa ih može prekriti i onemogućiti njihovu detekciju.

### **1.3.3. Razvoj hromatografskih metoda primenom hemometrije**

Hemometrija je skup matematičkih procedura koje se koriste za obradu, kalibraciju, modelovanje i multikriterijumsku optimizaciju podataka (128). Optimizacija hromatografske metode može biti veoma dugotrajan proces koji zahteva veliki broj eksperimenata ako se izvodi na klasičan način. Danas se sve više koristi statistički pristup optimizaciji metoda, tj. rezultati dobijeni iz malog broja pažljivo planiranih eksperimenata se obrađuju statističkim metodama čime se značajno povećava efikasnost optimizacije.

#### **1.3.3.1. Eksperimentalni dizajn**

Razvoj i optimizacija RP-HPLC metoda je kompleksan postupak koji zahteva istovremeno određivanje većeg broja faktora. Ranije korišćeni način optimizacije bio je zasnovan na principu 'pokušaj i pogreši', ali ovakav pristup je dugotrajan i prati uticaj jednog po jednog faktora na odabrani odgovor, a informacije o ostalim faktorima kao i moguće interakcije između faktora se ne uočavaju.

Eksperimentalni dizajn (*Design of Experiments*, DoE) se definiše kao postupak koji omogućava istraživačima da testiraju različite hipoteze i dođu do validnih zaključaka o vezi između nezavisnih i zavisnih promenljivih. Zahvaljujući rezultatima eksperimentalnog dizajna, željeni odgovori se dobijaju efikasnije, brže i precizniji su. U eksperimentalnom dizajnu eksperimenti se postavljaju na takav način da se namerno menjaju vrednosti jedne ili više promenljivih veličina u određenom opsegu pri čemu se prati uticaj ovih promena na jedan ili više posmatranih odgovora. Promenljive veličine čiji uticaj se meri mogu biti kvalitativne i kvantitativne prirode.

Za izvođenje eksperimentalnog dizajna potrebno je izvršiti planiranje kroz nekoliko koraka. Najpre je važno definisati odgovore koji će se pratiti u eksperimentu (površina pika, koncentracija...). U sledećoj fazi treba odabrati 2-7 promenljivih veličina za koje se smatra da će najviše uticati na praćene odgovore i koji će dalje biti posmatrani kao

faktori. Za svaki od izabranih faktora treba odrediti nivoe koji će se ispitivati tj. koji će biti varirani u eksperimentu. Na kraju, treba izabrati matematički model koji će biti korišćen (Plackett-Burman, Taguchi, Box-Behnken, puni i frakcioni faktorski dizajn).

Osnovu eksperimentalnog dizajna čine dizajn matrica i modeli. **Dizajn matrica** se sastoji od serije eksperimenata izvedenih pod različitim uslovima i dobijenih odgovora. Svaka matrica se sastoji od redova (odnose se na eksperimente) i kolona (odnose se na parametre modela). Da bi se konstruisala matrica potrebno je definisati broj nezavisno promenljivih veličina (varijabli) i vrstu eksperimentalnog dizajna koji će biti korišćen. **Modeli** predstavljaju opis ponašanja sistema tj. matematičku vezu između varijabli i odgovora sistema. Najjednostavniji je linearni model, ali postoje i polinomijalni i kvadratni model.

#### 1.3.3.2. Vrste eksperimentalnog dizajna

Postoje dve grupe eksperimentalnog dizajna: *screening* i optimizacioni. *Screening* dizajn se izvodi u početnoj fazi eksperimenta i njime se određuju promenljive veličine koje su značajne za dalje ispitivanje. Primenom *screening* dizajna se smanjuje broj nezavisno promenljivih veličina koje će dalje biti analizirane (129, 130). Ovom tipu dizajna pripadaju pun faktorski dizajn na dva nivoa, frakcioni i Plaket-Burman-ov dizajn.

Optimizacionim tipom dizajna se vrši detaljna analiza sistema. Ovom tipu dizajna pripadaju pun faktorski dizajn na tri nivoa, centralni kompozicioni dizajn, Box-Behnken-ov i Doehlert-ov dizajn (131, 132).

**Pun faktorski dizajn** se koristi za procenu uticaja varijabli na posmatrani odgovor, kao i procenu značaja interakcija između ispitivanih varijabli. Ovaj tip dizajna se sastoji od  $m^k$  eksperimenata ( $m$  – broj nivoa na kojima se svaka varijabla ispituje,  $k$  – ukupan broj ispitivanih varijabli). Ako se primenjuje pun faktorski dizajn u dva nivoa (gornjem i donjem), izvodi se  $2^k$  eksperimenata. Ovaj dizajn se ne može koristiti za dobijanje

maksimuma i minimuma odgovora sistema i procenu pravih optimalnih uslova (132, 133).

**Frakcioni faktorski dizajn** se uglavnom koristi kao *screening* dizajn kada se ispituje veliki broj nezavisno promenljivih veličina. Veliki broj ispitivanih varijabli povećava broj eksperimenata koji se izvodi primenom punog faktorskog dizajna. Frakcioni faktorski dizajn je eksperimentalni dizajn u kome se ispituje samo određeni podskup (frakcija) punog dizajna pri čemu se koriste oni eksperimenti koji pokrivaju što veću površinu eksperimentalnog domena. Kod frakcionog dizajna se interakcije trećeg ili višeg reda mogu zanemariti u modelu polinoma. Ovaj dizajn je definisan sa  $2^{k-p}$  eksperimenata (k – ukupan broj ispitivanih varijabli, p – stepen frakcionizacije punog faktorskog dizajna).

**Centralni kompozicioni dizajn** se sastoji od punog faktorskog dizajna na dva nivoa i 'zvezda' dizajna (*star* tj. *axial design*). Kada se centralne tačke punog faktorskog i zvezdanog dizajna podudaraju, dobija se centralni kompozicioni dizajn (ukoliko se ne podudaraju u pitanju je necentralni kompozicioni dizajn (134). Deo centralnog kompozicionog dizajna može činiti frakcioni faktorski dizajn (umesto punog faktorskog dizajna).

### 1.3.3.3. Metodologija multikriterijumskog odlučivanja

Metodologija multikriterijumskog odlučivanja (*multicriteria decision making*, MCDM) ili višestruka optimizacija odgovora je istovremena optimizacija više ulaznih varijabli u odnosu na veći broj odgovora sistema. MCDM definiše dve vrste varijabli: faktore (značajne nezavisno promenljive varijable) i odgovore sistema (zavisno promenljive varijable) (134, 135). U okviru ove metodologije postoje tri pristupa: put najstrmijeg uspona (*path of steepest ascent*), funkcija poželjnih odgovora (*desirability function*) i matematičko programiranje (*the mathematical programming*). Kod multikriterijumskog odlučivanja se prvo postavljaju granice i ciljevi za svaki odgovor sistema, a zatim donose odluke o značaju zadovoljenja definisanih ciljeva i eventualnoj favorizaciji nekog od odgovora sistema. Posmatrani parametri se nazivaju parametri odlučivanja (*decision maker parameters*; DMP).

Postoje tri grupe metoda multikriterijumskog odlučivanja. Prvu grupu čine metode kod kojih je DMP potrebno postaviti pre početka rešavanja problema. Drugu grupu čine interaktivne metode kod kojih se u toku rešavanja problema postavljaju DMP. Kod treće grupe se vrši optimizacija bez prethodnog definisanja parametara.

**Funkcija poželjnih odgovora** je najviše primenjivan pristup metodologije multikriterijumskog odlučivanja. Postoji više različitih funkcija poželjnih odgovora, a jedna od najviše korišćenih je Derringer-ova koja pripada prvoj grupi metoda. Kod ove metodologije postavljaju se granice i 'poželjni' ciljevi optimizacije odgovora. Primenjena funkcija transformiše niz različitih karakteristika u jedan cilj, i to u bezdimenzionalnu skalu koja ima vrednosti od 0 do 1 (131, 134, 136). Postoji *individualna funkcija poželjnih odgovora*,  $d_i$ , koja daje informacije za svaki od postavljenih odgovora sistema i *opšta (sveobuhvatna, globalna) funkcija poželjnih odgovora*,  $D$ , koja govori kako kombinacije postavljenih faktorskih nivoa zadovoljavaju postavljene ciljeve za sve posmatrane odgovore (137). Sve funkcije poželjnih odgovora čija je vrednost jednaka nuli su nepoželjne; vrednost 1 se odnosi na poželjne odgovore sistema.

Transformacija koja se primenjuje može biti jednostrana (*one-sided*) ili dvostrana (*two-sided*). Jednostrana se primenjuje kada je potrebno da posmatrani odgovor bude što manji ili što veći. Dvostrana transformacije se koristi kada je poželjno da odgovor bude tačno određena vrednost, koja se nalazi između gornje i donje definisane granice.

## **2.CILJ RADA**

### **Ciljevi ove doktorske disertacije su:**

- Ispitati mogućnost primene HPLC i LC-MS/MS instrumentalnih metoda u određivanju koncentracije atorvastatina i aktivnih (*orto*-hidroksiatorvastatina i *para*-hidroksiatorvastatina) i neaktivnih (atorvastatin-laktona) metabolita.
- Optimizovati i validirati HPLC i LC-MS/MS metode primenom hemometrijskog pristupa (Derringer-ove funkcije poželjnih odgovora).
- Odrediti sadržaj atorvastatina, *orto*-hidroksiatorvastatina, *para*-hidroksiatorvastatina i atorvastatin-laktona u uzorcima plazme pacova koji su bili na terapiji atorvastatinom i na kombinovanoj terapiji atorvastatinom i ekstraktom lista artičoke.
- Proceniti uticaj ekstrakta lista artičoke na metabolizam atorvastatina.
- Ispitati uticaj ishrane sa povećanim sadržajem masti na osnovne biohemijske i lipidne parametre u plazmi pacova, debljinu zida trbušne aorte i histologiju tkiva jetre, parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u plazmi, hemolizatu eritrocita i tkivu jetre eksperimentalnih životinja.
- Ispitati uticaj terapije atorvastatinom, ekstraktom lista artičoke i kombinovane terapije atorvastatinom i ekstraktom lista artičoke na osnovne biohemijske i lipidne parametre u plazmi pacova, debljinu zida trbušne aorte i histologiju tkiva jetre, parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u plazmi, hemolizatu eritrocita i tkivu jetre eksperimentalnih životinja.



### **3. EKSPERIMENTALNI DEO**

## 3.1. OPTIMIZACIJA I VALIDACIJA HPLC I LC-MS/MS METODA

### 3.1.1. Standardi i hemikalije

Atorvastatin, AT (Nobel Ilaç, Istanbul, Turska)

Atorvastatin lakton, AT-L (Nobel Ilaç, Istanbul, Turska)

*orto*-hidroksiatorvastatin, oOH-AT (Nobel Ilaç, Istanbul, Turska)

*para*-hidroksiatorvastatin, pOH-AT (Nobel Ilaç, Istanbul, Turska)

Rosuvastatin (Agencija za lekove i medicinska sredstva, Beograd, Srbija)

Acetonitril, HPLC čistoće (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka)

Amonijum acetat (Merck, Darmstadt, Nemačka)

Ultračista voda

Glacijalna sirćetna kiselina (J.T. Baker, Deventer, Holandija)

### 3.1.2. Materijal, oprema i kompjuterski programi

**Tečni hromatogram:** Agilent Technologies 1200 Series (Santa Clara, CA, SAD)

**Binarna pumpa:** Agilent Technologies 1200 model G 1312A

**Degazer:** Agilent Technologies 1200 model G1379B

**Detektor:** Diode-Array Agilent Technologies 1200 model G1315D

**Termostat za kolonu:** Agilent Technologies 1200 model G 1316A

**Integrator:** HP ChemStation

**Injektor:** Manuelni injektor Agilent Technologies 1200 model G 1328 B; Rheodyne injector valve, sa petljom od 20 µL, SAD

**UHPLC-MS-MS aparat:** Tečni hromatograf spregnut sa triplkvadripolskim masenim detektorom (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, SAD)

UHPLC tečni hromatograf ACELLA (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, SAD)

Triplkvadripolski MS-MS detektor TSQ Quantum Access MAX (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, SAD)

Program TSQ EZ Tune version 2.3.0.1206 SP1

Program Xcalibur 2.1.0.1139

**Kolone za tečnu hromatografiju:**

- ZORBAX Eclipse Plus C18 Analytical (4,6 mm x 250 mm, 5 µm prečnik čestica) (Agilent, Santa Clara, CA, SAD)
- ZORBAX Eclipse C18 Analytical, 4,6 mm × 100 mm, 3,5 µm prečnik čestica) (Agilent, Santa Clara, CA, SAD)

**Kertridži za čvrsto-tečnu ekstrakciju:**

- C18 BakerBond SPE, veličina kertridža 1 mL, punjen sa 100 mg oktadecilsilanom (J.T. Baker, Deventer, Holandija)
- OASIS® HLB SPE, veličina kertridža 1 mL, punjen sa 30 mg OASIS® HLB polimernog sorbensa (Waters, Milford, Massachusetts, SAD)

**Mikrolitarski špric** od 100 µL (SGE Australia Pty. Ltd., Australia)

**Sistem za filtriranje:** Whatman 47 mm Glass/mesh membranski nosač (Whatman International Ltd., Velika Britanija) i membranski filtri 47 mm, 0,45 µm (Agilent, Santa Clara, CA, SAD)

**Analitička vaga:** Mettler (Greifensee, Švajcarska)

**Analitička vaga:** Adventurer™ (Ohaus Corporation, Pine Brook, SAD)

**pH metar sa kombinovanim pH elektrodom:** PHM 240 Meter Lab (Radiometer Analytical, Lyon, Francuska)

**Ultrazvučno kupatilo:** USK (Ei, Niš)

**Komora za čvrsto-tečnu ekstrakciju:** Baker spe-12G vakuum komora (J.T. Baker, Deventer, Holandija)

**Vakuum pumpa:** KNF lab (KNF Neuberger, Trenton, SAD)

**Sistem za prečišćavanje vode:** TKA Water purification system (Niederelbert, Nemačka)

**Najlonski filteri:** LLG-Nylon Syringe filter 0,45 µm, ø25 mm (LLG Labware, Meckenheim, Nemačka)

**Vorteks mešalica:** EV-102 (Tehtnica, Železnik, Slovenija)

**Centrifuga:** Hettich EBA 8S (Hettich, Tuttlingen, Nemačka)

Automatska pipeta 100 – 1000 µL (Socorex®, Isba S.A., Švajcarska)

Automatska pipeta 10 – 100 µL (Socorex®, Isba S.A., Švajcarska)

Automatska pipeta 2-20  $\mu\text{L}$  (Socorex®, Isba S.A., Švajcarska)

### ***Kompjuterski programi***

Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, SAD)

MarvinSketch 5.8.2. (Chem Axon Ltd., Somerville, MA, SAD)

Design-Expert® 7.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, SAD)

PASW® Statistic version 18 (Chicago, Illinois, SAD)

## **3.1.3. Priprema rastvora**

### ***Priprema 0,1 % rastvora glacijalne sirćetne kiseline***

Odmeri se 240  $\mu\text{L}$  glacijalne  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (99,9 %,  $\rho = 1,05 \text{ g/cm}^3$ ) u normalni sud od 250 mL i dopuni ultračistom vodom do oznake. Pre stavljanja na HPLC sistem, rastvor sirćetne kiseline je potrebno profiltrirati kroz membranski filter.

### ***Priprema mobilne faze korišćene u LC-MS/MS metodi***

Mobilnu fazu čini smeša dve komponente, koje se gradijentno propuštaju kroz hromatografsku kolonu (Tabela 20). Komponenta A je acetonitril, a komponenta B 0,1 % rastvor glacijalne sirćetne kiseline. Pre korišćenja, oba rastvora je potrebno profiltrirati kroz membranski filter.

### ***Priprema 100 mM $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ pufera, pH 4,6***

Odmeri se na analitičkoj vagi 3,85 g amonijum-acetata, prenese u normalni sud od 500 mL, doda 300 mL vode i rastvori na ultrazvučnom kupatilu. Dopuni se ultračistom vodom do oznake. Dobijeni rastvor se prenese u laboratorijsku čašu i pH podesi na 4,6 postepenim dodavanjem glacijalne  $\text{CH}_3\text{COOH}$ .

### ***Priprema osnovnih rastvora analiziranih supstanci i internog standarda***

Osnovni rastvori atorvastatina, *orto*-hidroksiatorvastatina, *para*-hidroksiatorvastatina i rosuvastatina (ROS; korišćen kao interni standard (IS) u LC-MS/MS metodi) se pripremaju na isti način. Odmeri se po 5 mg svake od komponenti na analitičkoj vagi i prebaci u pojedinačne normalne sudove od 10 mL. Doda se oko 5 mL smeše acetonitrila i vode (90:10, v/v) i rastvor stavi u ultrazvučno kupatilo do rastvaranja čvrste supstance. Sud se dopuni istom smešom rastvarača do oznake. Dobijena koncentracija osnovnih rastvora je 0,5 mg/mL.

Osnovni rastvor atorvastatin-laktona (AT-L) se priprema odmeravanjem 5 mg standarda na analitičkoj vagi, prebacivanjem u normalni sud od 5 mL i rastvaranjem u 5 mL acetonitrila. Koncentracija ovako pripremljenog rastvora AT-L je 1 mg/mL.

Pripremljeni osnovni rastvori se prenesu u plastične viala u podeljenim porcijama od 500 µL. Rastvori se čuvaju u zamrzivaču, na -8 °C do upotrebe.

### ***Priprema rastvora standarda koncentracije 5 µg/mL***

Po jedna viala pripremljenog osnovnog rastvora AT, oOH-AT, pOH-AT, AT-L i IS se prenese iz zamrzivača u frižider i ostavi da se sadržaj odmrzne. Sadržaj svake viala se prenese u pojedinačne normalne sudove od 50 mL i dopuni sa 100 mM NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO pH 4,6 do oznake. 5 mL rastvora AT-L koncentracije 10 µg/mL se prenese u normalni sud od 10 mL i dopuni istim rastvorom pufera do oznake.

Koncentracija svih pripremljenih rastvora je 5 µg/mL.

### ***Priprema rastvora za optimizaciju HPLC metode***

Preneze se po 1 mL svakog od dobijenih rastvora koncentracije 5 µg/mL u pojedinačne normalne sudove od 10 mL i sudovi se dopune do oznake sa 100 mM NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO

puferom (pH 4,6). Koncentracija dobijenih rastvora je 500 ng/mL. Rastvori se čuvaju na ledu da bi se sprečila interkonverzija laktona u kiseline i obrnuto.

#### ***Priprema rastvora za optimizaciju SPE-LC-MS/MS metode***

Prenese se po 1 mL svakog od dobijenih rastvora koncentracije 5 µg/mL u pojedinačne normalne sudove od 10 mL i dopuni do oznake sa 100 mM NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO puferom (pH 4,6). 1 mL dobijenih rastvora se prenese u pojedinačne normalne sudove od 10 mL i razblaži istim puferom do oznake. Koncentracija dobijenih rastvora je 50 ng/mL. Rastvori se čuvaju na ledu da bi se sprečila interkonverzija laktona u kiseline i obrnuto.

#### ***Priprema smeše analita koncentracije 500 ng/mL***

Prenese se po 1 mL svakog od dobijenih rastvora koncentracije 5 µg/mL u jedan normalni sud od 10 mL i dopuni do oznake sa 100 mM NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO puferom (pH 4,6). Koncentracija svih analiziranih komponenti u dobijenom rastvoru je 500 ng/mL. Rastvori se čuvaju na ledu.

#### ***Priprema radnog rastvora standarda AT i AT-L***

Prenese se po 1 mL rastvora AT i AT-L koncentracije 5 µg/mL u jedan normalni sud od 10 mL i dopuni do oznake sa 100 mM NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO puferom (pH 4,6). 1 mL dobijenog rastvora se prenese u normalni sud od 10 mL i razblaži istim puferom do oznake. Koncentracija AT i AT-L u pripremljenom rastvoru je 50 ng/mL. Rastvori se čuvaju na ledu da bi se sprečila interkonverzija laktona u kiseline i obrnuto.

#### ***Priprema radnog rastvora standarda oOH-AT i pOH-AT***

Prenese se po 1 mL rastvora oOH-AT i pOH-AT koncentracije 5 µg/mL u jedan normalni sud od 10 mL i dopuni do oznake sa 100 mM NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO puferom (pH 4,6). Prenese se 1 mL dobijenog rastvora u normalni sud od 10 mL i razblaži istim puferom

do oznake. Koncentracija oOH-AT i pOH-AT u pripremljenom rastvoru je 50 ng/mL. Rastvori se čuvaju na ledu da bi se sprečila interkonverzija laktona u kiseline i obrnuto.

#### ***Priprema radnog rastvora internog standarda***

Prene se 200 µL pripremljenog rastvora koncentracije 5 µg/mL u normalni sud od 10 mL i dopuni do oznake sa 100 mM NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO puferom (pH 4,6). Koncentracija dobijenog rastvora je 100 ng/mL.

#### ***Priprema rastvora standarda za procenu linearnosti LC-MS/MS metode***

Za procenu linearnosti metode korišćena je metoda internog standarda (analiziran je odnos površina pikova rastvora ispitivanih supstanci i internog standarda). Kalibracione krive su konstruisane primenom linearne regresione analize, a svaka tačka je dobijena kao rezultat tri injektovanja odgovarajućih rastvora. Za konstrukciju kalibracione krive korišćeno je ukupno 8 tj. 9 rastvora: po 6 rastvora pOH-AT i oOH-AT različite koncentracije, 7 rastvora AT i AT-L rastvora rastućih koncentracija standarda, blanko uzorak (koji ne sadrži analizirane supstance i IS) i nulti uzorak (koji ne sadrži analizirane supstance, ali sadrži IS).

Kalibracione krive atorvastatina i atorvastatin laktona su dobijene merenjem rastvora standarda koncentracije: 0,1; 0,2; 0,5; 1; 5; 10 i 20 ng/mL. Za konstrukciju kalibracione krive *o*-hidroksiatorvastatina i *p*-hidroksiatorvastatina pripremaju se rastvori standarda sledećih koncentracija: 0,5; 1; 5; 10; 15 i 20 ng/mL. U svim pripremljenim rastvorima koncentracija internog standarda je ista i iznosi 5 ng/mL.

Rastvori za procenu linearnosti atorvastatina i atorvastatin-laktona se pripremaju prema Tabeli 3.

**Tabela 3.** Priprema rastvora za procenu linearnosti atorvastatina i atorvastatin-laktona

Koncentracija AT i AT-L (ng/mL)	Zapremina ( $\mu$ L)			
	blanko plazme	radnog rastvora IS	radnog rastvora standarda AT i AT-L	100 mM $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ pufera (pH 4,6)
blanko	500	-	-	500
nulti	500	50	-	450
0,1	500	50	2	448
0,2	500	50	4	446
0,5	500	50	10	440
1	500	50	20	430
5	500	50	100	350
10	500	50	200	250
20	500	50	400	50

Rastvori za procenu linearnosti *o*-hidroksiatorvastatina i *p*-hidroksiatorvastatina se pripremaju prema Tabeli 4.

**Tabela 4.** Priprema rastvora za procenu linearnosti *o*-hidroksiatorvastatina i *p*-hidroksiatorvastatina

Koncentracija oOH-AT i pOH-AT (ng/mL)	Zapremina ( $\mu$ L)			
	blanko plazme	radnog rastvora IS	radnog rastvora standarda oOH- AT i pOH-AT	100 mM $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ pufera (pH 4,6)
blanko	500	-	-	500
nulti	500	50	-	450
0,5	500	50	10	440
1	500	50	20	430
5	500	50	100	350
10	500	50	200	250
15	500	50	300	150
20	500	50	400	50



Zapremina svakog od pripremljenih rastvora je 1 mL.

**Priprema rastvora standarda za proveru kvaliteta LC-MS/MS metode (QC)**

Za proveru tačnosti i preciznosti metode, stabilnosti i efikasnosti metode ekstrakcije iz biološkog materijala korišćeni su standardni rastvori (*Quality Control Samples*, QC). Prema međunarodnoj regulativi (138, 139) ovi rastvori se pripremaju u četiri različite koncentracije. QC1 je najniži nivo koji odgovara donjem limitu kvantifikacije (LLOQ), QC2 sadrži koncentracije bliske LLOQ tj. maksimalno 3 puta veće od LLOQ, QC3 koji odgovara koncentraciji na polovini opsega kalibracione krive i QC4 koji odgovara koncentraciji 75 % od gornje tačke na kalibracionoj krivi. Shema pripreme QC rastvora je prikazana u Tabelama 5 i 6.

**Tabela 5.** Priprema QC rastvora atorvastatina i atorvastatin-laktona

Koncentracija AT i AT-L (ng/mL)	Zapremina (µL)			
	blanko plazme	radnog rastvora IS	radnog rastvora standarda AT i AT-L	100 mM NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO pufera (pH 4,6)
QC1 (0,1)	500	50	2	448
QC2 (0,3)	500	50	6	444
QC3 (10)	500	50	200	250
QC4 (15)	500	50	300	150

**Tabela 6.** Priprema QC rastvora *o*-hidroksiatorvastatina i *p*-hidroksiatorvastatina

Koncentracija oOH-AT i pOH-AT (ng/mL)	Zapremina (µL)			
	blanko plazme	radnog rastvora IS	radnog rastvora standarda <i>o</i> OH- AT i <i>p</i> OH-AT	100 mM NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO pufera (pH 4,6)
QC1 (0,5)	500	50	10	440
QC2 (1)	500	50	20	430
QC3 (10)	500	50	200	250
QC4 (15)	500	50	300	150

### ***Priprema uzoraka plazme pacova opterećenih standardima za HPLC analizu***

Odmeri se 100 µL smeše u kojoj je koncentracija svih analita 500 ng/mL, prenese u ependorf i doda 900 µL blanko plazme pacova (koji nisu bili na terapiji). Uzorci plazme pacova opterećeni standardima, za HPLC analizu se dalje pripremaju primenom metode čvrsto-tečne ekstrakcije. Pre nanošenja na kertridž u 1 mL smeše rastvora standarda i blanko plazme se doda 1 mL 100 mM pufera  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$  (pH 4,6), a zatim centrifugira na 1600 x g, 5 minuta. Dobijeni supernatant se koristi za izvođenje čvrsto-tečne ekstrakcije.

### ***Priprema uzorka plazme pacova za LC-MS/MS analizu***

Prenese se 500 µL plazme pacova koji je bio na terapiji atorvastatinom u staklenu kivetu. Doda se 50 µL radnog rastvora IS i 450 µL 100 mM  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$  pH 4,6. Dobijeni uzorak se centrifugira na 1600 x g, 5 minuta. Izdvojeni supernatant se koristi za čvrsto-tečnu ekstrakciju (SPE).

## **3.1.4. Priprema uzoraka plazme pacova primenom metode čvrsto-tečne ekstrakcije (SPE)**

### ***Uslovi izvođenja SPE***

Primenjena SPE metoda za HPLC i LC-MS/MS metode se razlikuje u izabranim kertridžima i organskim rastvaračima. Za izvođenje HPLC metode korišćena je ekstrakcija metanolom, dok je za LC-MS/MS metodu korišćen acetonitril.

#### ***Kertridži:***

- C18 BakerBond SPE, veličina kertridža 1 mL, punjen sa 100 mg oktadecilsilanom (HPLC metoda)
- OASIS® HLB SPE, veličina kertridža 1 mL, punjen sa 30 mg OASIS® HLB polimernog sorbensa (LC-MS/MS metoda)

#### ***Rastvor za kondicioniranje SPE kertridža:***

2 mL metanola (acetonitrila)

2 mL vode

*Rastvor za ispiranje SPE kertridža:*

1 mL vode

1 mL smeše metanola (acetonitrila) i vode (5:95, v/v)

*Rastvor za eluiranje:*

1 mL smeše metanol (acetonitril) : 100 mM  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$  pH 4,6 (95:5, v/v)

*Temperatura:* sobna (~ 20 °C)

*Zapremina uzorka za SPE:* 2 mL (HPLC) / 1 mL (LC-MS/MS)

### ***Postupak***

Kertridži za SPE se postavljaju na komoru za čvrsto-tečnu ekstrakciju i komora poveže sa vakuum pumpom. Kertridži se kondicioniraju propuštanjem 2 mL metanola/ acetonitrila (u porcijama po 1 mL) i 2 mL vode (u porcijama po 1 mL). Na kondicionirane kertridže se nanose pripremljeni uzorci plazme pacova opterećeni standardima (za procenu linearnosti ili QC uzorci) ili uzorci plazme pacova koji su bili na terapiji atorvastatinom. Supernatanti koji se nanose na kertridže se polako propuštaju da bi vezivanje za sorbens bilo efikasnije. Nakon propuštanja pripremljenih rastvora, kertridži se ispiraju sa 1 mL vode, 1 mL smeše metanola (acetonitrila) i vode (5:95, v/v). Analizirane supstance se eluiraju sa kertridža smešom 1 mL metanola (acetonitrila) : 100 mM  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$  pH 4,6 (95:5, v/v), u čiste kivete.

Za analizu HPLC metodom dobijeni ekstrakt se uparava do suva u struji azota. Pre injeckovanja u HPLC sistem suvi ostatak se rekonstituiše u 500 µL mobilne faze.

Za analizu LC-MS/MS metodom dobijeni ekstrakti se filtriraju kroz membranske filtre i prenose u staklene vialne.

### 3.1.5. Hromatografska analiza – HPLC metoda

#### *Hromatografski uslovi*

*Kolona:* ZORBAX Eclipse Plus C18 Analytical (4,6 mm x 250 mm, 5  $\mu$ m prečnik čestica)

*Talasna dužina detekcije:*  $\lambda = 254$  nm

Na osnovu preliminarnih istraživanja definisani su faktorski nivoi ispitivanih nezavisno promenljivih veličina (Tabela 7). Prema matrici eksperimenata za puni  $2^3$  faktorski dizajn (Tabela 8), pripremljene su mobilne faze koje se sastoje od različitog odnosa acetonitrila i 0,1 % glacijalne sirćetne kiseline. U matrici eksperimenata navedeni su rasponi temperature kolone i protoka mobilne faze koji su korišćeni kao varijable u okviru punog  $2^3$  faktorskog dizajna.

**Tabela 7.** Nivoi ispitivanih varijabli

Ispitivane varijable	Nivoi ispitivanih varijabli		
	-1	0	1
x1 (ACN, %)	60	65	70
x2 (temperatura, °C)	30	35	40
x3 (protok, mL/min)	0,8	1	1,2

**Tabela 8.** Matrica eksperimenta za puni 2<sup>3</sup> faktorski dizajn

No	Nivoi ispitivanih varijabli		
	x1 (ACN, %)	x2 (temperatura, °C)	x3 (protok, mL/min)
1	0	0	0
2	0	-1	0
3	1	-1	1
4	-1	0	0
5	0	0	-1
6	+1	-1	-1
7	-1	+1	-1
8	-1	-1	-1
9	-1	-1	+1
10	+1	+1	+1
11	0	+1	0
12	-1	+1	+1
13	+1	0	0
14	+1	+1	-1
15	0	0	+1

Kao odgovori sistema posmatrani su: retenciono vreme prvog pika (Rt pOH-AT), retenciono vreme poslednjeg pika (Rt AT-L), simetrija pika sva četiri jedinjenja (Sim pOH-AT, Sim oOH-AT, Sim AT i Sim AT-L) i relativno retenciono vreme prvog pika (RRt pOH-AT). Izvršena je detaljna hemometrijska analiza ispitivanih varijabli.

### ***Postupak***

Pre izvođenja eksperimenta, podešavaju se parametri HPLC sistema za odgovarajući eksperiment (adekvatna mobilna faza, temperatura kolone, talasna dužina i protok) i

sistem ispira mobilnom fazom do postizanja stabilne bazne linije tj. dok se ne postigne stanje u kome se ne javlja variranje pritiska. Pripremljeni rastvor za optimizaciju metode (3.1.3.) injiciran je u sistem mikrolitarskim špricem.

### **3.1.6. Hromatografska analiza – LC-MS/MS metoda**

#### ***Hromatografski uslovi***

*Kolona:* ZORBAX Eclipse C18 Analytical, 4,6 mm × 100 mm, 3,5 μm prečnik čestica

*Mobilna faza:* acetonitril : 0,1 % CH<sub>3</sub>COOH, gradijentna promena odnosa zapremina tokom vremena (Tabela 9)

*Temperatura kolone:* 25 °C

*Temperatura autosamplera:* 4 °C

*Protok:* 400 μL/min

*Zapremina injiciranja:* 20 μL

#### ***Postupak***

HPLC sistem, koji je podešen prema navedenim hromatografskim uslovima, ispiran je mobilnom fazom (početni odnos acetonitrila i 0,1 % CH<sub>3</sub>COOH) do postizanja stabilne bazne linije tj. dok vrednost standardne devijacija pritiska u sistemu ne bude manja od 0,2. Viala sa ekstrahovanim rastvorima se postavljaju u autosampler i ostave na čekanju sve dok se ne postigne željena temperatura autosamplera.

### **3.1.7. MS/MS analiza**

#### ***Optimizacija MS parametara***

Rastvor pripremljen za optimizaciju SPE-LC-MS/MS metode (prema propisu u poglavlju 3.1.3.) se injicira direktno u izvor jona. Uređaj se podesi da sam optimizuje uslove za svaku od analiziranih komponenti i interni standard.

## ***Uslovi rada MS sistema***

*Tip jonizacije:* ESI (elektron sprej jonizacija)

*Izabrani mod rada:* pozitivni

*Kolizioni gas:* argon

*Napon u detektoru:* 5500 V

*Temperatura u izvoru:* 250 °C

*Temperatura u kapilari:* 250 °C

*Pritisak kružnog gasa nosača:* 10 U

*Pritisak pravolinijskog gasa nosača:* 40 U

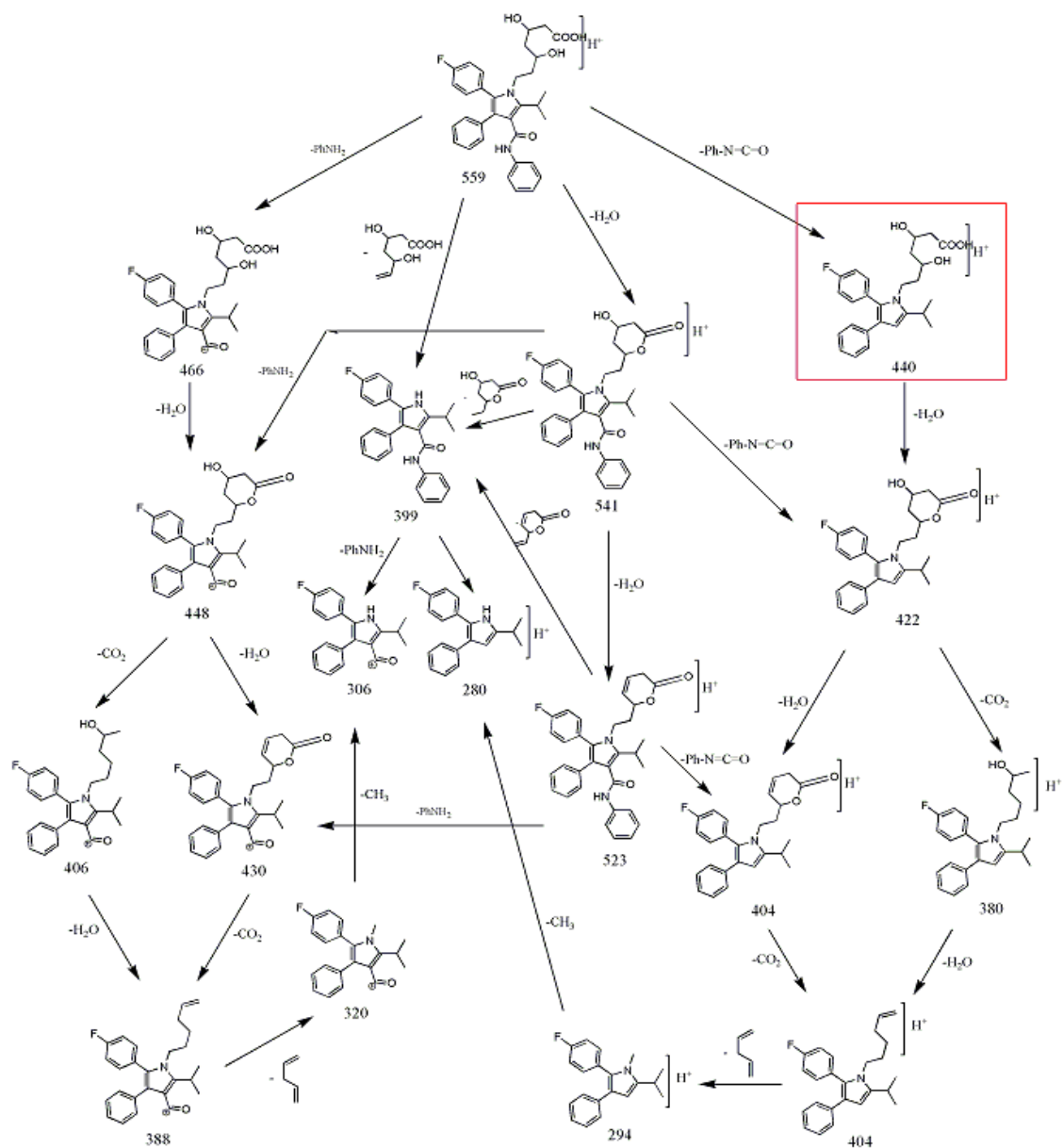
*Napon na kapilari:* 35

*Napon na tubi:* 78

*'Skimmer' napon:* -6

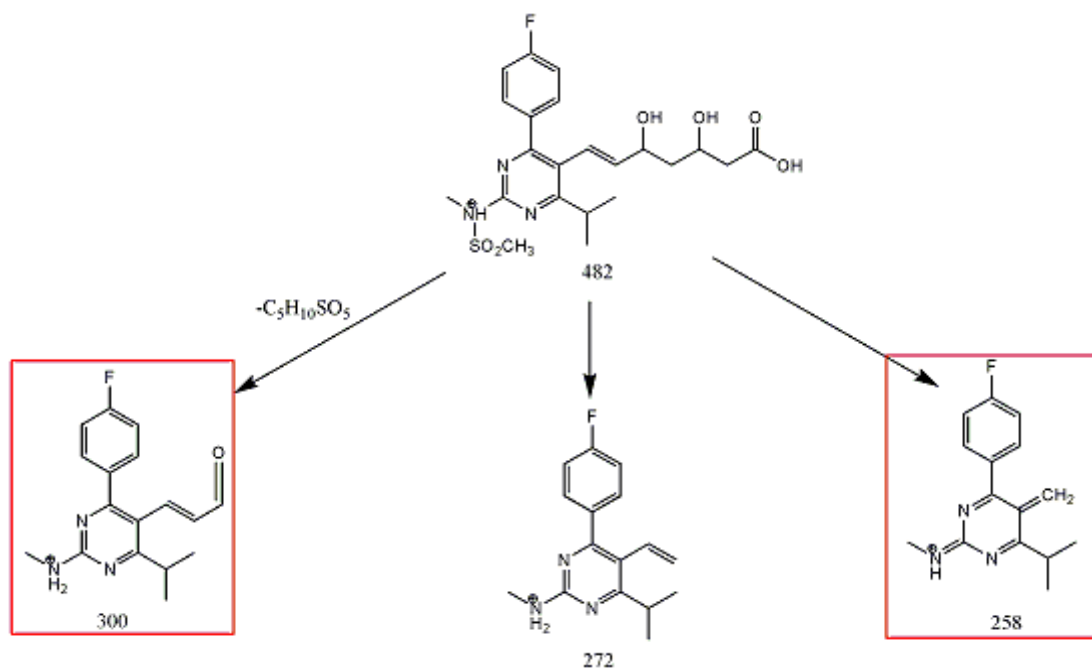
## ***Postupak***

Korišćena je metoda masene spektrometrije sa elektron sprej jonizacijom, u pozitivnom modu i SRM (*Selected Reaction Monitoring*) način rada. Prvi kvadropol je korišćen za izolovanje molekulskog jona  $[M+H]^+$ , drugi kvadropol (koliziona ćelija) za fragmentaciju, dok je treći kvadropol korišćen za detekciju fragmenata. Uređaj je podešen da prati sledeće SRM prelaze: (m/z, Q1 → Q3, energija kolizije) za AT (m/z, 558,9 → 439,52; 22 eV); AT-L (m/z, 540,8 → 447,6; 19 eV); za oOH-AT i pOH-AT je praćen isti fragment (m/z, 574,86 → 439,65; 20 eV) i IS (m/z, 481,75, izabrano je praćenje kombinacije dva fragmenta 257,73, 31 eV i 299,74; 35 eV). Fragmenti koji su praćeni u analizi AT i IS su označeni na Slikama 21. i 22. Struktura fragmenata koji su praćeni kod metabolita atorvastatina je pretpostavljena na osnovu razlike u masi između molekulskog jona i jona fragmenta i sličnosti sa strukturom atorvastatina (Sl. 23).

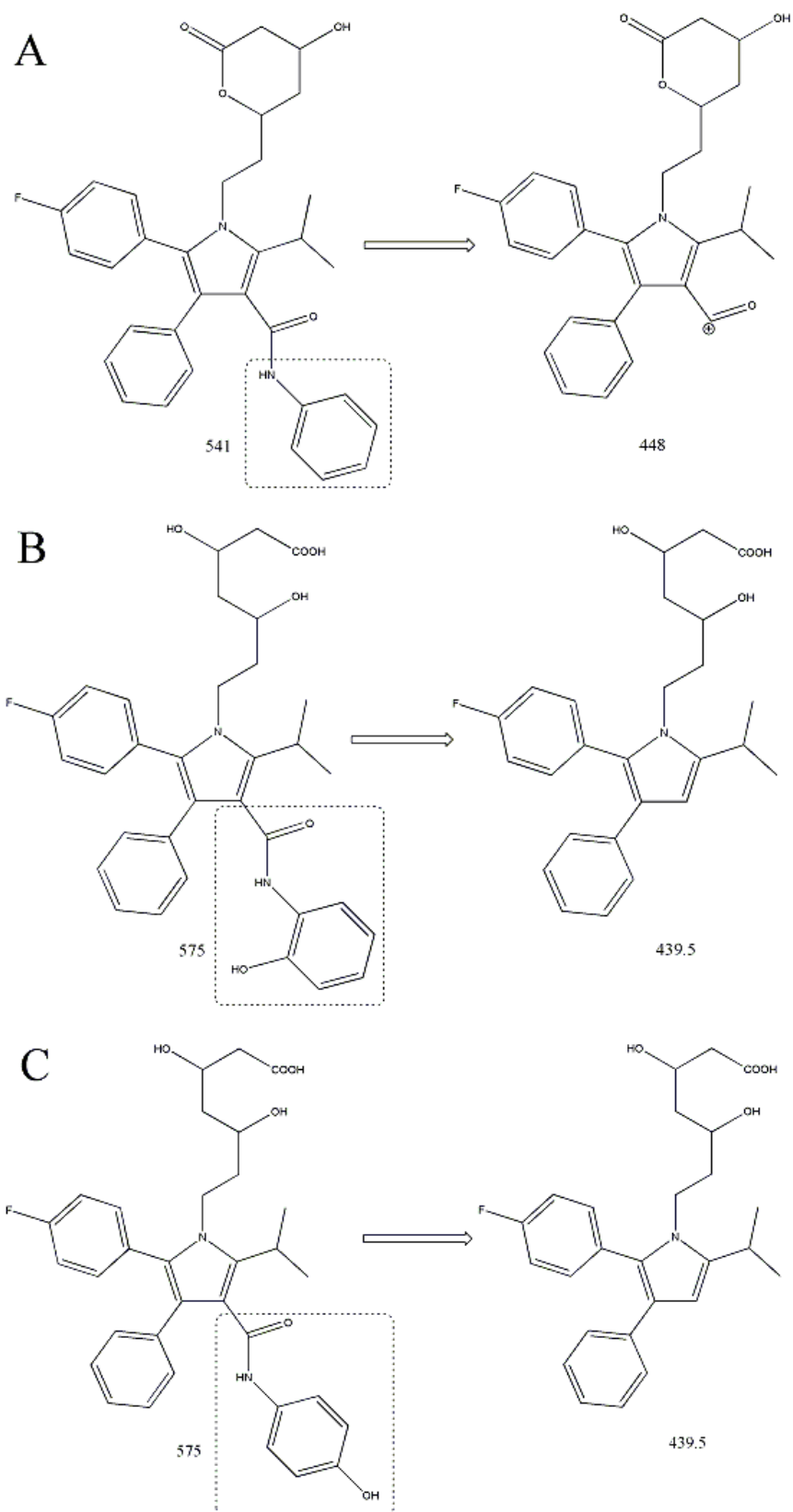


**Slika 21.** Mehanizam nastajanja MS/MS fragmenata atorvastatina (odabrani fragment za LC-MS/MS analizu je označen)





**Slika 22.** Mehanizam nastajanja glavnih MS/MS fragmenata rosvastatina (odabrani fragment za LC-MS/MS analizu je označen)



**Slika 23.** Pretpostavljeni fragmenti: a) atorvastatin-laktona, b) *o*-hidroksiatorvastatina i c) *p*-hidroksiatorvastatina

## **3.2. ISPITIVANJE OSNOVNIH BIOHEMIJSKIH PARAMETARA I PARAMETARA OKSIDATIVNOG STRESA I ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE**

### **3.2.1. Plan eksperimenta**

#### **3.2.1.1. Eksperimentalne životinje**

U istraživanju je korišćeno 60 albino pacova soja *Wistar*, muškog pola (farma Vojno-medicinske akademije, Beograd, Srbija). Na početku eksperimenta pacovi su bili 2 meseca stari, telesne mase 150 do 190 g. Pacovi su odgajani u vivarijumu Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

#### **3.2.1.2. Standardi i hemikalije**

Atorvastatin (Nobel Ilaç, Istanbul, Turska)

Biljne kapi na bazi artičoke (*Tinctura Cynarae*) (Institut za proučavanje lekovitog bilja „Josif Pančić”, Beograd, Srbija)

0,9 % natrijum-hlorid, rastvor za infuziju (Zdravlje A.D., Leskovac, Srbija)

Heparin® (heparin-natrijum 5000 i.j./1 mL) (Galenika, Beograd Srbija)

Cinarin (Sigma Aldrich, Dorset, Velika Britanija)

Hlorogenska kiselina (Sigma Aldrich, Velika Britanija)

Holesterol (Sigma Aldrich, Dorset, Velika Britanija)

Natrijum-holat (Sigma Aldrich, Dorset, Velika Britanija)

Suncokretovo ulje (Dijamant A.D., Zrenjanin, Srbija)

Fosforna kiselina,  $H_3PO_4$ , R (J.T. Baker, Deventer, Holandija)

Acetonitril (Sigma Aldrich, Dorset, Velika Britanija)

Metanol (Sigma Aldrich, Dorset, Velika Britanija)

Natrijum-hidrogenfosfat,  $Na_2HPO_4$ , anhidrovani (Merck, Darmstadt, Nemačka)

Natrijum-dihidrogenfosfat,  $NaH_2PO_4 \times H_2O$  (Merck, Darmstadt, Nemačka)

Kalijum-hlorid (Merck, Darmstadt, Nemačka)

10 % puferovani, neutralni rastvor formalina (Sigma Aldrich, Dorset, Velika Britanija)

Parafin (Sigma Aldrich, Dorset, Velika Britanija)

### **3.2.1.3. Materijal, oprema i kompjuterski programi**

**Analitička vaga:** Mettler (Greifensee, Švajcarska)

**Analitička vaga:** Adventurer™ (Ohaus Corporation, Pine Brook, SAD)

**Sonda za peroralno tretiranje pacova** (Instech Laboratories Inc., Plymouth Meeting, Pensilvanija, SAD)

**Vorteks mešalica:** EV-102 (Tehtnica, Železnik, Slovenija)

**pH metar sa kombinovanom pH elektrodom:** PHM 240 Meter Lab (Radiometer Analytical, Lyon, Francuska)

**Centrifuga:** Eppendorf Centrifuge 5417R (Eppendorf, Nemačka)

**Homogenizator tkiva:** Thomas teflon pestle (Arthur T. Thomas Company, Philadelphia, PA, SAD)

**Kolona za tečnu hromatografiju:** ZORBAX Eclipse Plus C18 Analytical (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) (Agilent, Santa Clara, CA, SAD)

**Automatska pipeta:** 100 – 1000 µL (Socorex®, Isba S.A., Švajcarska)

**Automatska pipeta:** 10 – 100 µL (Socorex®, Isba S.A., Švajcarska)

#### ***Kompjuterski programi***

Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, SAD)

PASW® Statistic version 18 (Chicago, Illinois, SAD)

### **3.2.1.4. Ishrana pacova**

#### ***Standardna ishrana***

Standardna, komercijalna ishrana za pacove u obliku proteinskih briketa (Veterinarski zavod, Subotica, Srbija).

### ***Ishrana pacova sa povećanim sadržajem masti***

Ishrana pacova sa povećanim sadržajem masti (aterogena ishrana; AI) je pripremljena dodavanjem: holesterola (2 % u odnosu na ukupnu masu standardne hrane koju jedan pacov dobija), natrijum-holata (1 %) i suncokretovog ulja (3 %) komercijalnoj, briketiranoj hrani. Za 48 životinja koje su na hrani sa povećanim sadržajem masti treba odmeriti 24 g holesterola, 12 g natrijum-holata i 36 g suncokretovog ulja za svaki dan eksperimenta. Smesa ovih sastojaka se dodaje ukupnoj masi od 1200 g proteinskih briketa. Da bi se lipidne komponente ravnomerno raspodelile potrebno je intenzivno promešati sastojke.

Za 6 životinja u kavezu odmeravano je ukupno 144 g adekvatne hrane (24 g po jednom pacovu) svakog dana.

#### **3.2.1.5. Kvantifikacija cinarina i hlorogenske kiseline u ekstraktu lista artičoke**

Biljni preparat korišćen u eksperimentu je komercijalna tinktura lista artičoke (Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić”, Beograd, Srbija). Za pripremu ove tinkture kao droga se koristi osušena primarna rozeta artičoke. Preparat je tinktura, što znači da se od jednog dela biljke dobija pet delova ekstrakta. Metoda ekstrakcije je jednostruka perkolacija u toku 24 h, nakon čega se ekstrakt sakuplja, ostavi da odleži tri dana i filtrira. Ekstrakcija se izvodi sa smešom etanola i vode (38:62, m/m).

Obzirom da proizvođač nije dao podatke o hemijskom sastavu tinkture, sadržaj cinarina i hlorogenske kiseline je određen HPLC metodom opisanom u monografiji Ph.Eur. 7.0 Artichoke Leaf (*Cynarae folium*).

HPLC sistem korišćen u eksperimentu je opisan u poglavlju 3.1.2. Hromatografsko razdvajanje je izvršeno na ZORBAX Eclipse Plus C18 Analytical koloni (4,6 mm x 250 mm, 5 µm; Agilent, Santa Clara, CA, SAD), gradijentnim eluiranjem mobilne faze A (fosforna kiselina R : voda R (0,5 : 99,5 v/v)) i mobilne faze B (fosforna kiselina R :

acetonitril R (0,5 : 99,5 v/v)). Primenjeni gradijent je prikazan u Tabeli 9. Protok mobilne faze je 1,2 mL/min, temperatura kolone 40 °C, UV detekcija na 330 nm.

**Tabela 9.** Odnos mobilne faze A i mobilne faze B (v:v) korišćen za kvantifikaciju cinarina i hlorogenske kiseline

t	%A	%B
0	92	8
1	92	8
20	75	25
33	75	25
35	0	100
40	92	8

Referentni rastvori cinarina i hlorogenske kiseline se pripremaju tako što se odmeri 5 mg standarda, prenese u normalni sud od 50 mL i dopuni metanolom. 2,5 mL rastvora se prenese u normalni sud od 10 mL i dopuni metanolom do oznake. Koncentracija cinarina i hlorogenske kiseline u pripremljenim rastvorima je 0,025 mg/mL. Uzorak tinkture za HPLC analizu se priprema tako što se 1 mL tinkture prenese u normalni sud od 10 mL i dopuni smešom vode i metanola (50:50, v/v) do oznake. 1 mL ovako pripremljenog rastvora se dalje prenese u normalni sud od 5 mL i dopuni istom smešom do oznake.

Određen sadržaj cinarina i hlorogenske kiseline u korišćenoj tinkturi je isti, i iznosi 0,2 %.

### 3.2.1.6. Priprema rastvora

#### *Priprema rastvora atorvastatin-kalcijuma*

Doza atorvastatina za tretman pacova je izračunata proporcionalno dozi koju uzima odrastao čovek prosečne telesne mase. Uzeto je da odrastao čovek telesne mase 70 kg uzima 80 mg atorvastatina dnevno. Preračunom se dobija da ova doza odgovara 1,15 mg/kg telesne mase (TM) atorvastatina. Radi jednostavnijeg doziranja sondom za

peroralno tretiranje pacova korišćen je rastvor atorvastatina u fiziološkom rastvoru koji je pripreman svakog dana, *ex tempore*, za jedan kavez. Svaka životinja je dobijala 0,5 mL rastvora atorvastatina; za 6 životinja koje žive u jednom kavezu potrebno je pripremiti ukupno 3 mL rastvora. Obzirom da su se tokom eksperimenta životinje intenzivno gojile, koncentracija rastvora je preračunavana na početku svake nedelje, nakon merenja pacova.

#### ***Priprema razblaženja ekstrakta lista artičoke***

Biljne kapi artičoke se primenjuju u dozi od 90 kapi dnevno (tri puta dnevno po 30 kapi). Doziranje je preračunato na osnovu preporučene dnevne doze za odrasle osobe. Odrasli čovek prosečne telesne mase 70 kg dnevno uzima ukupno 90 kapi ekstrakta lista artičoke, što odgovara 1,29 kapi po kg TM životinja. Obzirom na mogući gubitak dela doze prilikom primene i zbog jednostavnosti merenja uzeta je aproksimacija i krajnja doza ekstrakta lista artičoke je 0,1 mL/kg TM. Količina rastvora ELA za tretiranje pacova je preračunavana jednom nedeljno, u zavisnosti od prosečne mase pacova. Radi jednostavnijeg doziranja sondom, određeno je da će svaka životinja dobiti ukupno 0,5 mL ELA razblaženog fiziološkim rastvorom. Razblaženi ekstrakt je pripreman svakog dana, *ex tempore*, za jedan kavez.

#### ***Priprema rastvora koji sadrži ELA i atorvastatin***

Za pripremu smeše rastvora uzeti su podaci korišćeni za izračunavanje potrebne mase atorvastatina i potrebne zapremine ekstrakta lista artičoke. Svaka životinja je primala ukupno 0,5 mL rastvora koji odgovara 1,15 mg/kg TM atorvastatina i 0,1 mL/kg TM ELA. Potrebne količine ELA i AT su iznova izračunavane svake nedelje, nakon merenja životinja.

#### ***Priprema rastvora 0,1 M fosfatnog pufera (pH 7,4) koji sadrži 1,15 % KCl***

Odmeri se 3,1 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  i 10,9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , prenese u normalni sud od 1000 mL i dopuni destilovanom vodom do oznake. pH vrednost dobijenog pufera je 7,4.

Odmeri se 1,15 g KCl, prenese u normalni sud od 100 mL i dopuni pripremljenim fosfatnim puferom do oznake.

### 3.2.1.7. Izvođenje eksperimenta

Životinje su držane u kavezima standardnih dimenzija, po 6 u jednom. Za prostirku je korišćena sterilna drvena šuška, debljine 2-3 cm, koja je menjana svaki dan. U prostoriji u kojoj su boravile životinje zoohigijenski i mikroklimatski uslovi su odgovarali propisanim standardima (12 h/12 h svetlo/tama, 30 do 70 % vlažnost vazduha, 22 do 25 °C temperatura prostorije). Životinje su imale slobodan pristup vodi tokom celog perioda ispitivanja (*ad libitum*). Eksperimentalne procedure su izvođene prema Direktivi Evropske Unije (*The European Council Directive of November 24, 1986; 86/609/EEC*) i u skladu sa Pravilnikom za rad sa eksperimentalnim životinjama Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Za rad sa eksperimentalnim životinjama dobijena je dozvola Etičke komisije za rad sa eksperimentalnim životinjama Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj dozvole 5/10, izdata 03.11.2010.).

Životinje su podeljene u 5 grupa koje su bile na različitoj ishrani i/ili terapiji. Svaku grupu je činilo po 12 pacova. Tokom prve nedelje eksperimenta sve životinje su bile na normalnoj, briketiranoj smeši za ishranu laboratorijskih životinja, standardnog higijenskog i sirovinskog sastava. Nakon ovog vremena, jedna grupa životinja je ostala na standardnoj ishrani (SI) do kraja eksperimenta, a preostale četiri grupe su do kraja eksperimenta bile na ishrani sa povećanim sadržajem masti (AI - standardna ishrana kojoj je dodato suncokretovo ulje, holesterol i natrijum-holat prema propisu opisanom u poglavlju 3.2.1.4.). Kod tri grupe koje su bile na ishrani obogaćenoj mastima je započeta terapija nakon pet nedelja eksperimenta: jedna grupa je tretirana atorvastatinom (AI+AT), druga kombinacijom atorvastatina i ELA (AI+AT+ELA), a treća samo ekstraktom lista artičoke (AI+ELA). Po 6 pacova iz svake grupe je žrtvovano osam nedelja od početka eksperimenta (pacovi su primali terapiju tri nedelje), a preostalih 6 iz svake grupe je žrtvovano 11 nedelja od početka eksperimenta (pacovi su primali terapiju šest nedelja). Detaljan plan eksperimenta je prikazan u Tabeli 10.



**Tabela 10.** Plan izvođenja eksperimenta na pacovima

Grupa	Redni broj životinja	Plan ishrane i terapije			
		I nedelja	II - V nedelja	VI - VIII nedelja	IX - XI nedelja
SIa	1 - 6	standardna hrana	standardna hrana	standardna hrana	-
SIb	7 - 12	standardna hrana	standardna hrana	standardna hrana	standardna hrana
AIa	13 - 18	standardna hrana	hrana sa povećanim sadržajem masti	hrana sa povećanim sadržajem masti	-
AIb	19 - 24	standardna hrana	hrana sa povećanim sadržajem masti	hrana sa povećanim sadržajem masti	hrana sa povećanim sadržajem masti
AI+AT a	25 - 30	standardna hrana	hrana sa povećanim sadržajem masti	hrana sa povećanim sadržajem masti + atorvastatin	-
AI+AT b	31 - 36	standardna hrana	hrana sa povećanim sadržajem masti	hrana sa povećanim sadržajem masti + atorvastatin	hrana sa povećanim sadržajem masti + atorvastatin
AI+AT+ELA a	37 - 42	standardna hrana	hrana sa povećanim sadržajem masti	hrana sa povećanim sadržajem masti + atorvastatin + artičoka	-
AI+AT+ELA b	43 - 48	standardna hrana	hrana sa povećanim sadržajem masti	hrana sa povećanim sadržajem masti + atorvastatin + artičoka	hrana sa povećanim sadržajem masti + atorvastatin + artičoka
AI+ELA a	49 - 54	standardna hrana	hrana sa povećanim sadržajem masti	hrana sa povećanim sadržajem masti + artičoka	-
AI+ELA b	55 - 60	standardna hrana	hrana sa povećanim sadržajem masti	hrana sa povećanim sadržajem masti + artičoka	hrana sa povećanim sadržajem masti + artičoka

Dan pre žrtvovanja životinjama je ukinut pristup hrani i vodi. Na početku eksperimenta životinje su uvedene u anesteziju primenom rastuće koncentracije ugljen-dioksida. Uzorci krvi su uzeti direktno iz srca pacova. U cilju dobijanja uzoraka plazme krv je sakupljana u epruvete u kojima se nalazila odgovarajuća količinu antikoagulansa, rastvora heparin-natrijuma. Heparinizovana plazma je centrifugirana pri brzini 1500 x g,

15 minuta. Bistri supernatant je odvojen, alikvotiran i čuvan u zamrzivaču, na -80 °C do izvođenja analiza.

### ***Priprema hemolizata***

Za dobijanje hemolizata korišćeni su isti uzorci pune krvi. Uzorci su više puta ispirani sa petostrukom zapreminom hladnog fiziološkog rastvora i centrifugirani na 2000 x g, 10 minuta. Dobijeni supernatant i gornji sloj eritrocita su odvojeni vakuum pumpom. Postupak se ponavlja tri puta. Hemolizat se priprema tako što se 1 mL sedimentovanih ćelija pipetira u 2 mL destilovane vode. Dobijena suspenzija se izmeša nekoliko puta i centrifugiranjem se odvoji stroma od bistrog centrifugata (supernatant je u ovom slučaju hemolizat). Pripremljen hemolizat je čuvan u zamrzivaču, na -80 °C do izvođenja eksperimenta.

### ***Priprema tkiva jetre za histohemijsku analizu i homogenizacija***

Nakon uzimanja krvi iz srca, odvaja se jetra pacova, koja se zatim ispira fiziološkim rastvorom, prosuši i meri. Levi lateralni lobus jetre se prenese u penicilinske bočice koje sadrže 10 % puferovani neutralni rastvor formalina i uzorci čuvaju do dalje histopatološke analize. Primenom homogenizatora ostatak tkiva jetre se homogenizuje sa devet puta većom zapreminom 0,1 M fosfatnog pufera (pH 7,4) koji sadrži 1,15 % KCl. Dobijeni homogenat jetre se podeli u porcije koje su trenutno zamrznu u tečnom azotu, nakon čega se čuvaju u zamrzivaču, na -80 °C do dalje analize.

### ***Odvajanje uzoraka trbušne aorte***

Donji delovi trbušne aorte se fiksiraju rastvorom formalina, potapaju u parafin i čuvaju do dalje analize.

### **3.2.2. Metode određivanja osnovnih biohemijskih i lipidnih parametara**

Osnovni biohemijski i lipidni parametri koji su određivani u plazmi eksperimentalnih životinja su: *alanin-aminotransferaza* (ALT), *aspartat-aminotransferaza* (AST), ukupni proteini (TP), glukoza (GLU), ukupni holesterol (uHOL), trigliceridi (TG), HDL-holesterol (HDL), LDL-holesterol (LDL) i nonHDL holesterol.

Koncentracije osnovnih biohemijskih parametara (ALT, AST, TP i GLU), kao i ukupnog holesterola i triglicerida su određene na analizatoru ILAB 300+ (Instrumentation Laboratory, Milano, Italija) primenom automatizovanih enzimskih metoda i reagenasa proizvođača Bioanalytica (Beograd, Srbija). Za određivanje HDL korišćena je ista enzimska metoda kao i za ukupan holesterol uz prethodnu precipitaciju plazme fosfovolframovom kiselinom u prisustvu magnezijumovih jona. Koncentracija LDL je izračunata preko Friedewaldove formule (140), direktnim testom za LDL (Biomerie, Pariz, Francuska). Koncentracija nonHDL je izračunata matematički, oduzimanjem vrednosti dobijenih za HDL od koncentracije ukupnog holesterola.

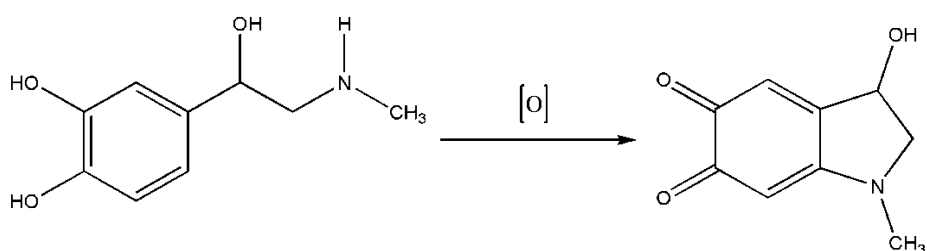
### **3.2.3. Metode određivanja koncentracije markera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite**

Markeri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite su određivani u plazmi, hemolizatu eritrocita i tkivu jetre.

Markeri koji su određivani u plazmi su: ukupna aktivnost enzima *superoksid-dizmutaze* (SOD) i *paraoksonaze 1* (PON1), koncentracija malondialdehida (MDA), redukovanog glutationa (GSH) i ukupnih sulfhidrilnih grupa kao i prooksidativno-antioksidativni balans (PAB). U hemolizatu eritrocita određivana je ukupna aktivnost SOD i koncentracije MDA, GSH i SH grupa. U homogenatu tkiva jetre određivane su koncentracije MDA i GSH.

### 3.2.3.1. Metoda određivanja ukupne aktivnosti *superoksid-dizmutaze*

Aktivnost enzima *superoksid-dizmutaze* u plazmi i hemolizatu eritrocita pacova je određena po modifikovanoj metodi koju su dali Misra i Fridovich (141) i koja je implementirana na analizator ILAB 300+. Opisana metoda se zasniva na sposobnosti enzima SOD da inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina u baznoj sredini (pH 10,2) (Sl. 24). U kiseloj sredini adrenalin je stabilan, a do autooksidacije može doći usled prisustva teških metala u tragovima (mogu biti prisutni u tragovima u reagensima). Aktivnost SOD u uzorku se izračunava kao procenat inhibicije autooksidacije adrenalina. Meri se apsorbancija nastalog proizvoda autooksidacije adrenalina ružičaste boje (adrenohrom) na talasnoj dužini 480 nm, u prisustvu SOD (analiza) i bez prisustva SOD (kontrola).



Slika 24. Oksidacija adrenalina do adrenohroma

#### *Reagensi i hemikalije*

**Etilendiaminotetrasirćetna kiselina** (EDTA, dinatrijumova so, dihidrat) (Merck, Darmstadt, Nemačka)

**L-adrenalin** (Sigma Aldrich, Dorset, Velika Britanija)

**Hlorovodonična kiselina 37 %** (Zorka, Šabac, Srbija)

**Karbonatni pufer**, 0,05 M, pH 10,2, kome je dodat 1 mmol/L EDTA (pravi se *ex tempore*)

**Hlorovodonična kiselina**, 15 mmol/L

**Osnovni rastvor adrenalina**, 10 mmol/L, rastvoren u 15 mmol/L HCl (pravi se *ex tempore*)

## ***Uzorak***

Plazma, hemolizat

## ***Priprema rastvora***

Priprema rastvora je prikazana u Tabeli 11.

**Tabela 11.** Priprema rastvora za određivanje ukupne aktivnosti *superoksid-dizmutaze*

U epruvete pipetirati (μL):	Kontrola	Analizirani uzorak plazme / hemolizata
Plazma, hemolizat eritrocita	-	10
Karbonatni pufer	700	690
Osnovni rastvor adrenalina	50	50

Reakcija započinje dodavanjem adrenalina u reakcionu smešu. Metoda se izvodi automatski, pomoću analizatora ILAB 300+.

## ***Izračunavanje***

Relativna jedinica aktivnosti SOD se definiše kao ona aktivnost enzima koja dovodi do 50 % inhibicije autooksidacije adrenalina pod određenim uslovima. Bira se koncentracija adrenalina koja će u kontrolnom uzorku izazvati promenu apsorbancije od 0,025 u minuti. Utvrđeno je da pri ovoj vrednosti promene apsorbancije u minuti SOD postiže najveći procenat inhibicije autooksidacije adrenalina. Polazi se od koncentracije adrenalina od 10 mmol/L, a zatim se rastvor razblažuje sve dok se ne postigne  $\Delta A/\text{min}$  od 0,025. Obzirom na definiciju relativne jedinice aktivnosti enzima SOD, jedinična aktivnost dovodi do 50 % - nog smanjenja apsorbancije, odnosno,  $\Delta A/\text{min}$  je u takvom uzorku 0,0125.

Aktivnost SOD u relativnim jedinicama se izračunava preko sledeće proporcije:

$$0,0125 : 1U = [ 0,025 - (\Delta A_{\text{analize}}/\text{min}) ] : X$$

gde je X – jedinica aktivnosti.

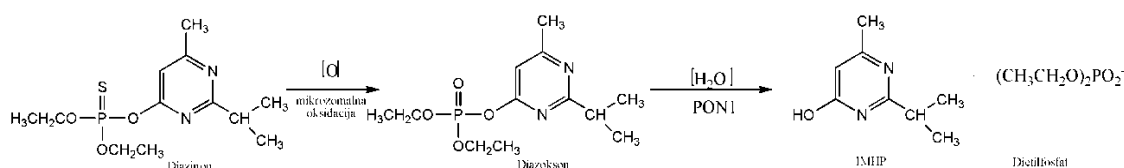
Da bi se izračunala aktivnost primenjuje se sledeći obrazac:

$$\text{SOD, IU/L} = X \times 75000$$

75000 – faktor razblaženja uzorka preveden u litre

### 3.2.3.2. Metoda određivanja aktivnosti *paraoksonaze 1*

Aktivnost enzima *paraoksonaze 1* (PON1) je određena kao aktivnost prema nefiziološkom supstratu diazoksonu (diazoksonazna, DZOazna aktivnost), primenom spektrofotometrijske kinetičke metode koju su opisali Richter i Furlong (142). Za određivanje diazoksonazne aktivnosti korišćen je spektrofotometar UV/VIS Ultrospec III (Pharmacia LKB, Cambridge, UK) i heparinizirana plazma kao uzorak. Reakcija se zasniva na delovanju *PON1* enzima iz plazme na supstrat diazokson pri čemu dolazi do konverzije diazoksona do 2-izopropil-4-metil-6-hidroksipirimidina (IMHP) (Sl. 25). Brzina promene se prati kinetički na talasnoj dužini 270 nm, na kojoj je karakteristični apsorpcioni maksimum za IMHP.



Slika 25. DZOazna aktivnost PON1

Promena aktivnosti se prati tokom tri minuta i izračunava se promena apsorbancije u minuti ( $\Delta A/\text{min}$ ). Spektrofotometar je podešen tako da selektuje samo linearni deo reakcije koji se koristi za izračunavanje  $\Delta A/\text{min}$ . Diazoksonazna aktivnost se određuje na 23 °C i na pH = 8,5, uz upotrebu 1 mmol/L TRIS-HCl pufera i u prisustvu NaCl (solju stimulirana enzimaska aktivnost *PON1*). Zbog visokih aktivnosti prema supstratu, odnosno velike brzine reakcije nastajanja IMHP potrebno je da spektrofotometar ima dobru temperaturnu kontrolu kivete (ambijentalna temperatura, takođe, treba da se održava ispod 23 °C). Diazoksonazna aktivnost *PON1* se izražava kao IU/L.

## *Reagensi i hemikalije*

**Diazokson** (O,O-dietil-O-(2-izopropil-6-metil-4-pirimidinil)-fosfat; Chem Service, West Chester, PA, USA)

**Tris** (trishidroksimetilaminometan, 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol; Acros Organics, Geel, Belgija)

**Radni pufer** - Odmeri se 116 g NaCl i prenese u normalni sud od 1 L koji sadrži oko 800 mL destilovane vode, 100 mL 1 mol/L Tris-HCl pufera pH 8,5 i 2 mL 1 mol/L CaCl<sub>2</sub>. Normalni sud se dopuni destilovanom vodom do oznake. Dobijene koncentracije su: 2 mol/L NaCl; 0,1 M Tris-HCl pH 8,5 i 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>. Rastvore čuvati na sobnoj temperaturi.

**Pufer za razblaživanje** – U normalni sud od 1 L preneti 10 mL 1 mol/L Tris-HCl pufera pH 8,5 i 2 mL 1 mol/L CaCl<sub>2</sub> i dopuniti destilovanom vodom do oznake. Dobijene koncentracije su: 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8,5 i 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>.

**Zasićen rastvor NaOH** – Pripremiti rastvor NaOH minimalne koncentracije 2 mol/L i koristiti ga za dekontaminaciju korišćenog posuđa i razgradnju preostalog diazoksona pre odlivanja.

**Diazokson supstrat 1 mmol/L** - Preneti automatskom pipetom 2,8 µL diazoksona u normalni sud od 10 mL i dopuniti radnim puferom do oznake. Zatvoriti normalni sud i snažno promućkati nekoliko puta, pažljivo iznad sudopere. Čuvati u plastičnim, neprozirnim bočicama, dobro zatvorenim, u zamrzivaču, na -20 °C. Dekontaminacija se izvodi rastvorom jake baze (NaOH). Tokom rada nositi zaštitne laboratorijske naočare i masku.

## *Aparati*

**UV/VIS spektrofotometar sa termostatom kivetom:** UV-1800, Shimadzu, Nishinokyo-Kuwabara-cho, Japan

**pH metar:** WTW, Weilheim, Nemačka

**Automatske pipete**

## ***Uzorak***

Plazma

## ***Izvođenje reakcije***

Uzorci plazme se razblaže puferom za razblaživanje u odnosu 1:20. U epruvete se odmeri po 50  $\mu\text{L}$  razblažene plazme, doda 500  $\mu\text{L}$  rastvora diazoksona, promeša, sipa u kivetu i aktivira početak merenja na spektrofotometru. Na UV/VIS spektrofotometru se podesi način rada (kinetički), vreme čitanja (3 minuta), temperatura (23 °C) i talasna dužina (270 nm).

## ***Izračunavanje DZOazne aktivnosti***

Enzimaska aktivnost se izražava u broju  $\mu\text{mol}$  proizvoda koji nastane u minuti u jednom litru rastvora.

Prema Lambert-Beerovom zakonu:

$$A = \varepsilon \times l \text{cm} \times c$$

gde su:

A - apsorbancija

$\varepsilon$  - molarni apsorpcioni koeficijent izražen u L/mol/cm (molarni apsorpcioni koeficijent IMHP na pH 8,5 je 3000 L/mol/cm)

l cm – dužina optičkog puta

Iz osnovne formule se izvodi sledeća formula:

$$c = \frac{\Delta A / \text{min}}{\varepsilon \times l \text{cm} \times 10^{-6}} \times \frac{V_{\text{uk}}}{V_{\text{uz}}} = \frac{\Delta A / \text{min} \times 10^{-6}}{3000 \times \text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1} \times 1 \text{cm}} \times \frac{0,55}{0,05} \times 20$$

gde su:



$10^{-6}$  - faktor kojim se mol prevodi u  $\mu\text{mol}$ ;

20 - faktor inicijalnog razblaženja seruma (1:100)

$V_{\text{uk}}$  - ukupna zapremina u epruveti (0,5 mL supstratni reagens + 0,05 mL uzorak = 0,55 mL)

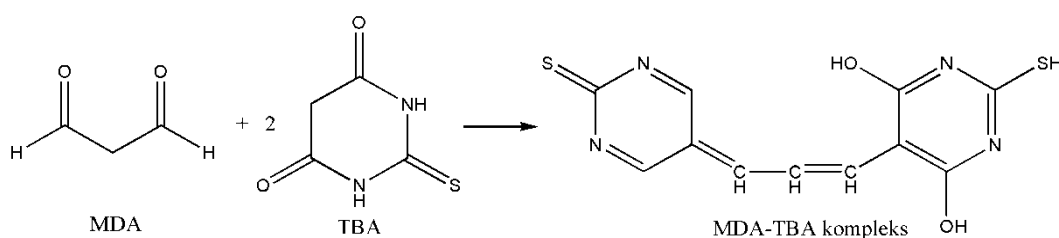
$V_{\text{uz}}$  - zapremina uzorka (0,05 mL)

Krajnja formula za izračunavanje je:

$\Delta A/\text{min} \times 73\,333 = \mu\text{mol IMHP po min u litri rastvora} = \text{IU/L PON1 aktivnosti}$ .

### 3.2.3.3. Metoda određivanja koncentracije malondialdehida

Malondialdehid je proizvod lipidne peroksidacije koji se često koristi kao osetljiv biomarker za merenje nivoa oksidativnog stresa. Koncentracija MDA je određivana u plazmi, hemolizatu eritrocita i tkivu jetre. Spektrofotometrijska metoda određivanja se zasniva na reakciji krajnjeg proizvoda peroksidacije lipida sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) (143) pri čemu nastaje obojeni kompleks koji pokazuje maksimum apsorpcije na 535 nm (Slika 26).



**Slika 26.** Mehanizam reakcije MDA sa TBA

#### *Reagensi i hemikalije*

**Trihlorsirćetna kiselina** (Lach-Ner, Neratovice, Češka)

**Tiobarbiturna kiselina** (Sigma-Aldrich, Seelze, Nemačka)

**Hlorovodonična kiselina 37 %** (Zorka, Šabac, Srbija)

**TRIS** (Acros Organics, Geel, Belgija)

**Malondialdehid standard, MDA (4,17 M)** (Acros Organics, Geel, Belgija)

### **Priprema rastvora**

**TBA reagens** – Odmeri se 92  $\mu\text{L}$  trihlorsirćetne kiseline, 374,8 g tiobarbiturne kiseline i 20,53 mL koncentrovane hlorovodonične kiseline i prenese u normalni sud od 1000 mL. Doda se oko 500 mL vode i dobro promućka dok se ne dobije bistar rastvor. Normalni sud se dopuni destilovanom vodom do oznake. Koncentracije u dobijenom reagensu su: 0,917 mmol/L trihlorsirćetne kiseline, 2,6 mol/L tiobarbiturne kiseline i 0,25 mol/L hlorovodonične kiseline. Reagens se čuva u frižideru, na +4 °C.

**TRIS-Cl pufer** – Odmeri se 121,1 g TRIS baze, prenese u normalni sud od 1000 mL i doda oko 800 mL destilovane vode. pH dobijenog rastvora se podesi na 7,4 koncentrovanom hlorovodoničnom kiselinom. Normalni sud se dopuni do oznake destilovanom vodom.

### **Osnovni standard MDA, 1 mmol/L**

Rastvor standarda MDA koncentracije 1 mmol/L se priprema tako što se odmeri 25  $\mu\text{L}$  koncentrovanog rastvora standarda (4,17 M), prenese u normalni sud od 100 mL i dopuni vodom do oznake (STOCK I). 100  $\mu\text{L}$  ovog rastvora se prenese u ependorf i dopuni vodom do 1 mL čime se dobija rastvor čija je koncentracija 10  $\mu\text{mol/L}$  (STOCK II). Od STOCK II rastvora se razblaživanjem pravi serija rastvora rastuće koncentracije u opsegu od 1 do 10  $\mu\text{mol/L}$  prema Tabeli 12.

**Tabela 12.** Priprema rastvora za konstrukciju kalibracione krive za određivanje koncentracije malondialdehida

V ( $\mu\text{L}$ )	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>	S <sub>8</sub>	S <sub>9</sub>	S <sub>10</sub>
MDA	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Pufer	990	980	970	960	950	940	930	920	910	900

### **Uzorak**

Plazma, hemolizat eritrocita, homogenat tkiva jetre.

### ***Eksperimentalni postupak i izračunavanje***

Za izračunavanje koncentracije MDA konstruiše se kalibraciona kriva merenjem apsorbcije rastvora različitih koncentracija koji se pripremaju razblaživanjem osnovnog rastvora standarda MDA (Tabela 12).

Priprema uzoraka za analizu je prikazana u Tabeli 13.

**Tabela 13.** Priprema uzoraka za određivanje koncentracije MDA

U epruvete pipetirati (μL):	Slepa proba	Standardni rastvori MDA	Analizirani uzorak plazme / hemolizata / homogenata
plazma/hemolizat/homogenat	-	-	300
TRIS-Cl pufer	300	-	-
Standardni rastvor MDA	-	300	-
TBA reagens	600	600	600

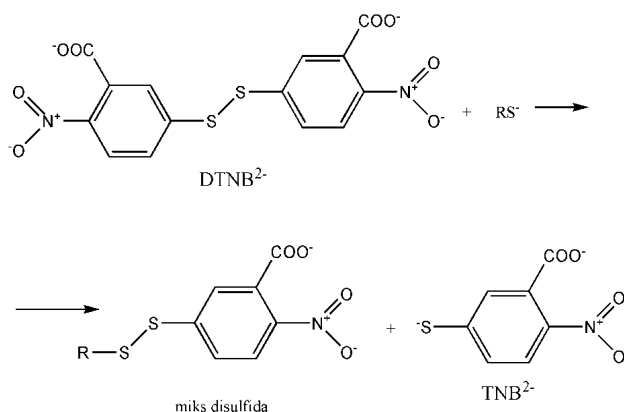
Reakcione smeše se promešaju na vortex mešalici i inkubiraju na 100 °C, u vodenom kupatilu 5 minuta. Nakon hlađenja na ledu, rastvori se centrifugiraju na +4 °C, 10 minuta pri brzini obrtaja 10000 x g. Apsorbancija se meri na 535 nm.

Na osnovu izmerenih apsorbcija rastvora standarda konstruisana je kalibraciona kriva:  $y = 0,0042 + 0,0512x$  ( $r = 0,999753$ ) sa koje se očitava koncentracija MDA.

#### **3.2.3.4. Metoda određivanja koncentracije redukovano glutaciona**

Redukovani glutation (GSH) vezuje slobodne radikale koji nastaju u oksidativnim procesima u organizmu i neutrališe ih. Određivanje redukovano glutaciona se zasniva na reakciji SH grupa glutaciona sa 2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzoevom kiselinom (DTNB)

(Sl. 27). Pre dodavanja reagensa iz uzorka se moraju ukloniti proteini, taloženjem sa 5 % sulfosalicilnom kiselinom. Apsorbancija nastalog *p*-nitrofenolnog anjona se meri na 412 nm (144). Koncentracija GSH se izračunava metodom standardne krive, korišćenjem serije razblaženih rastvora redukovano glutationa u 5 % sulfosalicilnoj kiselini (standard).



**Slika 27.** Redukcija Ellman-ovog reagensa slobodnim sulfhidrilnim grupama

### **Reagensi i hemikalije**

**Sulfosalicilna kiselina** (2-hidroksi-5-sulfobenzoeva kiselina; Sigma-Aldrich, Seelze, Nemačka)

**Natrijum-hidrogenofosfat**, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, anhidrovani (Merck, Darmstadt, Nemačka)

**DTNB** (2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzoeva kiselina) (Sigma-Aldrich, Seelze, Nemačka)

**5 % sulfosalicilna kiselina** - u normalni sud od 50 mL prenese se 2,5 g sulfosalicilne kiseline, rastvori u destilovanoj vodi i dopuni vodom do oznake.

**0,3 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** – u normalni sud od 100 mL prenese se 5,346 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, rastvori u destilovanoj vodi i dopuni vodom do oznake.

**Rastvor 0,5 mmol/L DTNB** se priprema *ex tempore*. Prenese se 0,198 g supstance u normalni sud od 10 mL, rastvori u fosfatnom puferu pH 7 i dopuni puferom do oznake. 1 mL pripremljenog rastvora se prenese u normalni sud od 100 mL i dopuni fosfatnim puferom pH 7 do oznake. Rastvor se uvije u foliju i čuva u frižideru najviše 1 dan.

**Stock rastvor redukovano glutationa 0,2 mmol/L**, se priprema tako što se prenese 0,00615 g supstance u normalni sud od 100 mL, rastvori u destilovanoj vodi i dopuni

vodom do oznake. Od pripremljenog stock rastvora priprema se serija razblaženih rastvora glutationa u 5 % sulfosalicilnoj kiselini koncentracije od 3,125 do 50  $\mu\text{mol/L}$ . Rastvori se čuvaju zaštićeni od svetlosti.

### ***Uzorak***

Plazma, hemolizat eritrocita, homogenat tkiva jetre.

### ***Ekperimentalni postupak***

U ependorfu zapremine 1000  $\mu\text{L}$  prenese se 400  $\mu\text{L}$  uzorka i 400  $\mu\text{L}$  5 % sulfosalicilne kiseline (SSA), dobro izmeša na vorteksu i centrifugira na +4 °C, 10 minuta, pri brzini obrtaja 10000 x g. Ukoliko je potrebno, centrifugiranje se ponovi (5 min na 10000 x g). 300  $\mu\text{L}$  supernatanta se prenese u čistu ependorfu i dalje postupa prema postupku koji je opisan u Tabeli 14.

**Tabela 14.** Postupak za pripremu uzoraka za određivanje redukovanog glutationa

U epruvete pipetirati ( $\mu\text{L}$ ):	Slepa proba	Analizirani uzorak plazme / hemolizata /	Standardni rastvor GSH
0,3 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	950	800	800
0,5 mM DTNB	100	100	100
5% SSA	150	/	/
Supernatant	/	300	/
Standardni rastvor GSH	/	/	300

Dobijenu reakcionu smešu dobro promešati, inkubirati 25 min u mraku, na sobnoj temperaturi, a zatim meriti apsorbanciju na 412 nm, prema slepoj probi reagensa.

## *Aparati*

**UV/VIS spektrofotometar sa termostatiranom kivetom:** UV-1800, Shimadzu, Nishinokyo-Kuwabara-cho, Japan

**Vorteks mešalica:** VELP Scientifica, Milano, Italija

**Automatske pipete**

### **3.2.3.5. Metoda određivanja koncentracije ukupnih sulfhidrilnih grupa**

Za određivanje koncentracije ukupnih sulfhidrilnih grupa (SH) korišćena je Ellman-ova metoda (145) koja se zasniva na reakciji 2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzoeve kiseline (DTNB) sa alifatičnim tiolima u baznoj sredini (pH 9). U ovoj reakciji (Sl. 27) iz jednog mola izreagovanog tiola nastaje 1 mol anjona tionitrobenzoeve kiseline (TNB<sup>2-</sup>). U baznoj sredini u kojoj se vrši reakcija, nastali anjon je žuto obojen, i pokazuje maksimalnu apsorbanciju na 412 nm.

## *Reagensi i hemikalije*

**Dikalijum-hidrogenfosfat, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)

**Etilendiaminotetrasirćetna kiselina** (EDTA, dinatrijumova so, dihidrat) (Carlo Erba, Milano, Italija)

**2,2'-dinitro-5,5'-ditio-dibenzoeva kiselina** (DTNB) (Merck, Darmstadt, Nemačka)

**Fosfatni pufer pH 9** se priprema tako što se odmeri 3,484 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> i 0,083 g tetranatrijum-EDTA, prenese u normalni sud od 100 mL i dopuni vodom do oznake. pH-metrom se proveriti pH vrednost pripremljenog rastvora. Ako odstupa od pH 9, podesi se koncentrovanom fosforom kiselinom ili 0,1 M rastvorom KOH.

**Fosfatni pufer 50 mmol/L, pH 7** se priprema tako što se u odvojene normalne sudove od 100 mL odmeri 0,680 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> i 0,871 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Normalni sudovi se dopune vodom do oznake. Rastvor K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> se prenese u čašu i postepenim dodavanjem rastvora KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> podesi se pH rastvora na 7.

**DTNB reagens** (10 mmol/L, rastvoren u 50 mmol/L fosfatnom puferu pH 7) se priprema u normalnom sudu od 10 mL, *ex tempore*, rastvaranjem 0,04 g DTNB u

fosfatnom puferu pH 7 na magnetnoj mešalici. Normalni sud se dopuni istim puferom do oznake. Koncentracija dobijenog rastvora je 10 mmol/L.

### *Aparati*

**UV/VIS spektrofotometar sa termostatiranom kivetom:** UV-1800, Shimadzu, Nishinokyo-Kuwabara-cho, Japan

**Vorteks mešalica:** VELP Scientifica, Milano, Italija

### **Automatske pipete**

### *Uzorak*

Plazma, hemolizat eritrocita

### *Eksperimentalni postupak*

Za određivanje koncentracije ukupnih sulfhidrilnih grupa potrebno je pripremiti analizirani uzorak i slepu probu. Procedura za pripremu uzorka je prikazana u Tabeli 15.

**Tabela 15.** Procedura za pripremu uzorka za određivanje koncentracije ukupnih sulfhidrilnih grupa

U epruvete pipetirati (μL):	Slepa proba	Analizirani uzorak plazme / hemolizata
Pufer	950	900
Plazma / hemolizat	-	50
DTNB reagens	20	20

Dobijeni rastvori se promešaju na vorteks mešalici, inkubiraju 25 minuta na 25 °C zaštićeni od svetlosti, a zatim se izmere vrednosti apsorbancije u odnosu na pripremljenu slepu probu.

### ***Izračunavanje***

Koncentracija ukupnog sadržaja SH grupa u plazmi izračunava se preko molarnog ekstinkcionog koeficijenta *p*-nitrotiola na 412 nm, koji za date uslove ima vrednost od  $13600 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

$$\text{SH grupe, mmol/L} = \frac{A_A}{\varepsilon} \times \frac{V_{uk}}{V_{uz}} \times 1000$$

gde su

$$\varepsilon = 13\,600 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

$V_{uk}$  - ukupna zapremina (0,97 mL)

$V_{uz}$  - zapremina uzorka (0,05 mL)

### **3.2.3.6. Metoda određivanja prooksidativno-antioksidativnog balansa**

Prooksidativno-antioksidativni balans se određuje pomoću metode koju su opisali Alamdari i saradnici (146), uz određene modifikacije. PAB testom se određuje koncentracija vodonik-peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) u antioksidativnom okruženju. Obzirom da se i vodonik-peroksid i antioksidansi (mokraćna kiselina) nalaze u istoj sredini, hromogen koji se koristi u reakciji (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin; TMB) reaguje istovremeno i sa oksidansima i sa antioksidansima (Sl. 28). Reakcija  $\text{H}_2\text{O}_2$  i hromogena je enzimski katalizovana enzimom *peroksidazom*, pri čemu oksidacijom TMB-a nastaje intenzivno plavo obojeni proizvod. Za razliku od ove reakcije, reakcija mokraćne kiseline i hromogena je nekatalizovana, a rezultat reakcije je redukovani TMB katjon, bezbojni proizvod. Intenziteti obojenja standardnih rastvora su srazmerni odnosu dodatih količina  $\text{H}_2\text{O}_2$  i mokraćne kiseline. Kapacitet prisutnih antioksidanasa se kalibriše prema mokraćnoj kiselini i izražava u  $\mu\text{mol/L}$  mokraćne kiseline, a kapacitet prooksidanasa se kalibriše prema  $\text{H}_2\text{O}_2$  i izražava u  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Za konstruisanje standardne krive koriste se rastvori  $\text{H}_2\text{O}_2$  i mokraćne kiseline u različitim odnosima, tako da na početku dominira mokraćna kiselina a na kraju  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ove dve komponente su izabrane za





**TMB katjon** – Odmeri se pipetom 1 mL TMB I rastvora, prenese u normalni sud od 50 mL i doda acetatni pufer (0,05 M, pH 4,5). U dobijeni rastvor se doda 175  $\mu$ L sveže pripremljenog hloramina T (100 mmol/L), dobro promeša i inkubira 1 sat na 37 °C. Rastvor se priprema zaštićen od svetlosti (na tamnom mestu) uz stalno mešanje. Nakon inkubacije, u 50 mL rastvora TMB katjona doda se 25 U enzima *peroksidaze*. Dobijeni rastvor se pažljivo promeša, podeli u zapremine od 1 mL i čuva u zamrzivaču na -20 °C.

**TMB II rastvor** se priprema u normalnom sudu od 10 mL, razblaživanjem 200  $\mu$ L TMB I rastvora acetatnim puferom (0,05 M, pH 5,6). Ovako pripremljen rastvor se koristi odmah ili u roku od 2 dana, pri čemu se čuva u zamrzivaču, na temperaturi od 4 °C.

**Radni rastvor** se priprema u staklenoj epruveti tako što se u 10 mL TMB II rastvora doda 1 mL rastvora TMB katjona. Dobijeni rastvor se na tamnom mestu meša na sobnoj temperaturi 6 minuta. Ovako pripremljen radni rastvor se koristi odmah.

**Standardni rastvori** se pripremaju mešanjem različitih odnosa (0 – 100 %) 1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sa 6 mmol/L mokraćnom kiselinom (rastvorenom u 10 mM NaOH). Priprema standardnih rastvora prikazana je u Tabeli 16.

**Tabela 16.** Priprema standardnih rastvora za PAB test mešanjem rastvora mokraćne kiseline i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u različitim odnosima

V ( $\mu$ L)	S1	S2	S3	S4	S5
Mokraćna kiselina	100	75	50	25	0
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0	25	50	75	100

### ***Uzorak***

Plazma

### ***Postupak***

Metoda je spektrofotometrijska, reakcija se izvodi na ELISA ploči a za očitavanje apsorbancija se koristi ELISA čitač (Pharmacia LKB, Wien, Austria).

U svaki od 96 bazena ploče pomeša se po 10  $\mu\text{L}$  uzorka, standardnog rastvora i slepe probe (destilovana voda) sa 180  $\mu\text{L}$  *radnog rastvora* i inkubira 12 minuta na 37 °C, na tamnom mestu. Nakon inkubacije, reakcija se prekida dodatkom 40  $\mu\text{L}$  2 mol/L hlorovodonične kiseline, pri čemu se dobijena plava boja prevodi u žutu. Apsorbancija se meri odmah na ELISA čitaču, na 450 nm.

Na osnovu izmerenih apsorbancija standardnih rastvora konstruiše se kalibraciona kriva iz koje se očitavaju koncentracije uzoraka.

Vrednosti PAB-a se izražavaju u arbitrarnim jedinicama - HK (hidrogen-peroksid komplementarne jedinice), koje predstavljaju procenat  $\text{H}_2\text{O}_2$  u standardnim rastvorima pomnožen sa 6.

### **3.3. ISPITIVANJE DEBLJINE ZIDA TRBUŠNE AORTE I MORFOLOGIJE JETRE**

#### **3.3.1. Metoda određivanja debljine zida trbušne aorte**

Debljina zida donjih delova trbušne aorte koji su nakon odvajanja od eksperimentalne životinje fiksirani formaldehidom i potopljeni u parafin određena je mikroskopski. Uzorci aorte su poprečno isečeni u 5 µm široke cilindrične delove i rehidrirani. Da bi se ćelije zida aorte razlikovale od ćelija okolnog mišićnog tkiva i drugih ekstracelularnih komponenti uzorci su bojeni Azan-trihrom metodom. Obojeni delovi su analizirani mikroskopski (DMLB svetlosni mikroskop, Leica Microsystems, Mannheim, Germany), a debljina zida trbušne aorte je određena primenom Image J sfovera (NIH, Bethesda, Maryland, USA), slučajnim izborom deset položaja na uzorku svake životinje.

#### ***Reagensi i hemikalije***

AZAN trihrom kit za bojenje (Gennova, Sevilja, Španija)

#### **3.3.2. Metoda određivanja morfologije jetre**

Morfologija tkiva jetre je analizirana primenom svetlosnog mikroskopa (DMLB svetlosni mikroskop, Leica Microsystems, Mannheim, Germany). Levi, bočni režanj jetre je čuvan u 10 % puferovanom, neutralnom rastvoru formalina do analize. Pre analize, čuvani reznjevi su isečeni (tri dela po pacovu). Primenom hematoksilin i eozin (H&E) metode bojenja (147) obojeni su poprečni preseki debljine 5 µm, zatim skenirani i analizirani. Analizirano je najmanje 10 polja po jednom rezu, a zatim uzeta srednja vrednost.

### *Reagensi i hemikalije*

Hematoksin i eozin (H&E) kit za bojenje (Merck, Darmstadt, Nemačka)

## **4. REZULTATI I DISKUSIJA**

## **4.1. REZULTATI OPTIMIZACIJE HPLC METODE**

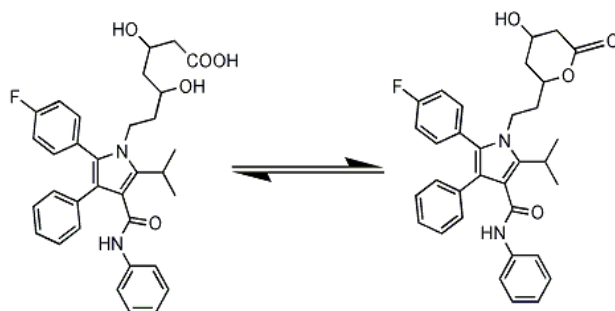
Najčešće korišćena analitička metoda za određivanje atorvastatina i njegovih aktivnih i neaktivnih metabolita u biološkom materijalu je tečna hromatografija spregnuta sa masenom spektrometrijom (118, 121, 148-150). LC-MS/MS je metoda izbora jer je osetljiva i omogućava određivanje veoma niskih koncentracija leka i metabolita u biološkom materijalu (red veličine ng/mL). Zbog mogućnosti praćenja samo određenih jona, primenom ove metode eliminišu se moguće interferencije koje mogu poticati od ostalih komponenti u biološkom materijalu. Druga često korišćena metoda je metoda visoko-efikasne tečne hromatografije (HPLC) sa UV ili elektrohemijском detekcijom. Metoda HPLC je manje osetljiva, duže traje ali su ovi uređaji značajno jeftiniji od LC-MS/MS instrumenata i dostupni većini analitičkih laboratorija. Pregledom literature nisu nađeni podaci o primeni HPLC metode za određivanje metabolita atorvastatina, pa je jedan od ciljeva rada bio optimizacija HPLC metode koja bi bila dovoljno dobra alternativa LC-MS/MS metodi.

### **4.1.1. Optimizacija metode čvrsto-tečne ekstrakcije**

Kako se metaboliti atorvastatina određuju u plazmi pacova (biološkom materijalu), pre unošenje uzorka u HPLC uređaj nepohodno je prečistiti uzorak. U ovom radu je korišćena metoda čvrsto-tečne ekstrakcije jer je jednostavna, omogućava rad sa više uzoraka u isto vreme i daje veoma čiste ekstrakte.

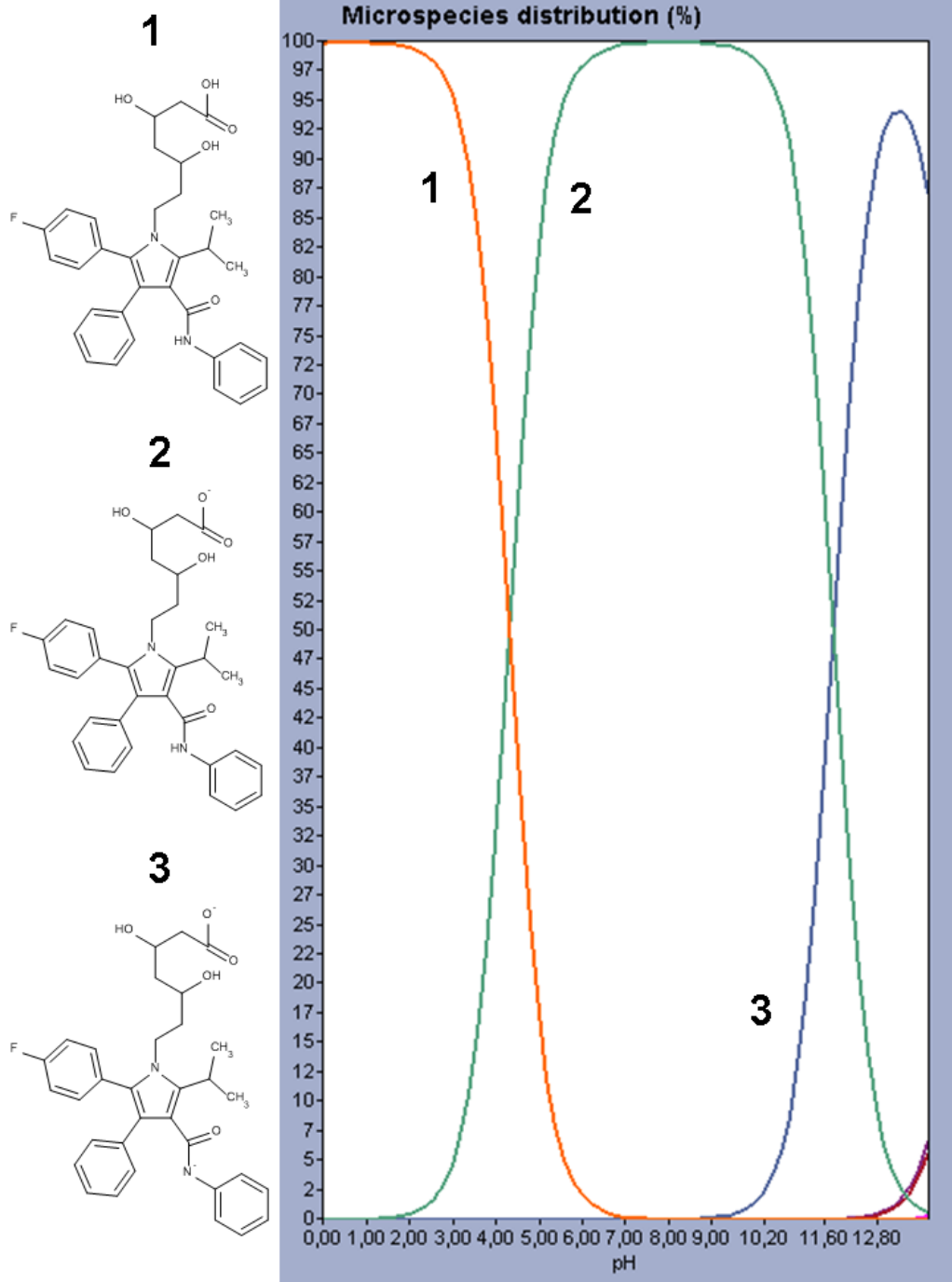
Plazma je viskozан biološki materijal koji se sastoji od oko 90 % vode, 8 % proteina, 1 % organskih kiselina i 1 % soli. Zbog velike viskoznosti, uzorci plazme se moraju razblažiti pre nanošenja na kertridž. Za razblaživanje uzoraka plazme odabran je 100 mM  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$  pufer čiji je pH podešen na 4,6 glacijalnom sirćetnom kiselinom. U eksperimentalnom radu nije korišćen fosfatni pufer koji je uobičajen za HPLC metode jer se ovako razblaženi uzorci ne mogu kasnije koristiti za detekciju masenim spektrometrom (LC-MS/MS metoda).

pH vrednost pufera koji je korišćen za razblaživanje uzoraka plazme je određen u skladu sa fizičko-hemijskim osobinama ispitivanih jedinjenja, distribucijom jonizovanih oblika i stabilnosti. Atorvastatin je hemijski derivat 7-supstisuane-3,5-dihidroksiheptanske kiseline. Bočni, ugljovodonični niz heptanske kiseline u prostoru zauzima konformacioni oblik u kome rastojanje hidroksilne grupe na položaju 5 i karboksilne grupe nije veliko tako da može doći do intramolekulske ciklizacije i nastanka odgovarajućeg  $\delta$ -laktona (Sl. 29). Interkonverzija oksikiseline i laktona (atorvastatina, *o*-hidroksiatorvastatina i *p*-hidroksiatorvastatina) može dovesti do lažno negativnih i/ili lažno pozitivnih rezultata i mora se sprečiti. Na Slikama 30., 31., 32. i 33. je prikazana raspodela jonskih oblika atorvastatina i analiziranih metabolita u celom opsegu pH vrednosti.

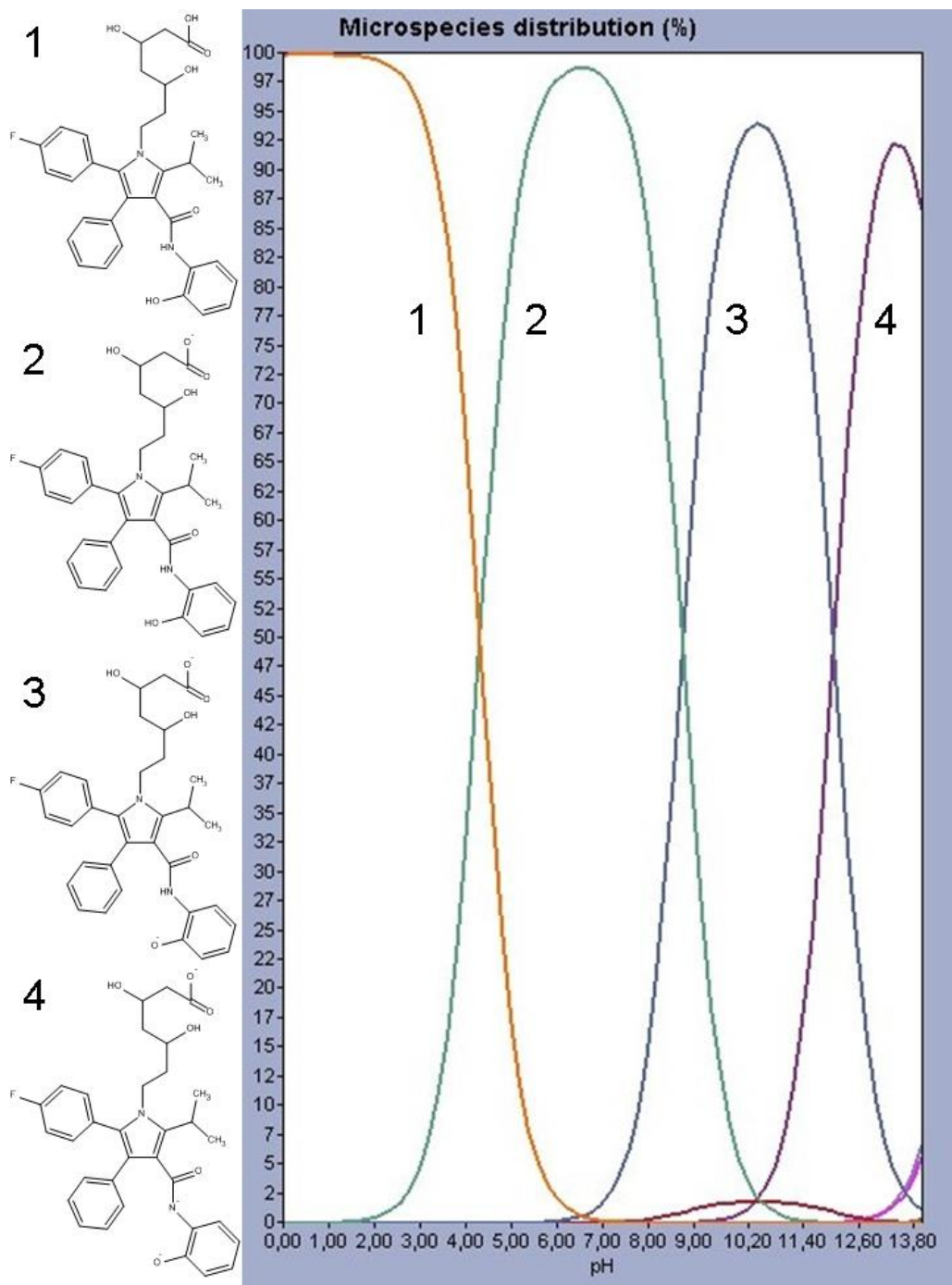


**Slika 29.** Građenje i hidroliza atorvastatin-laktona

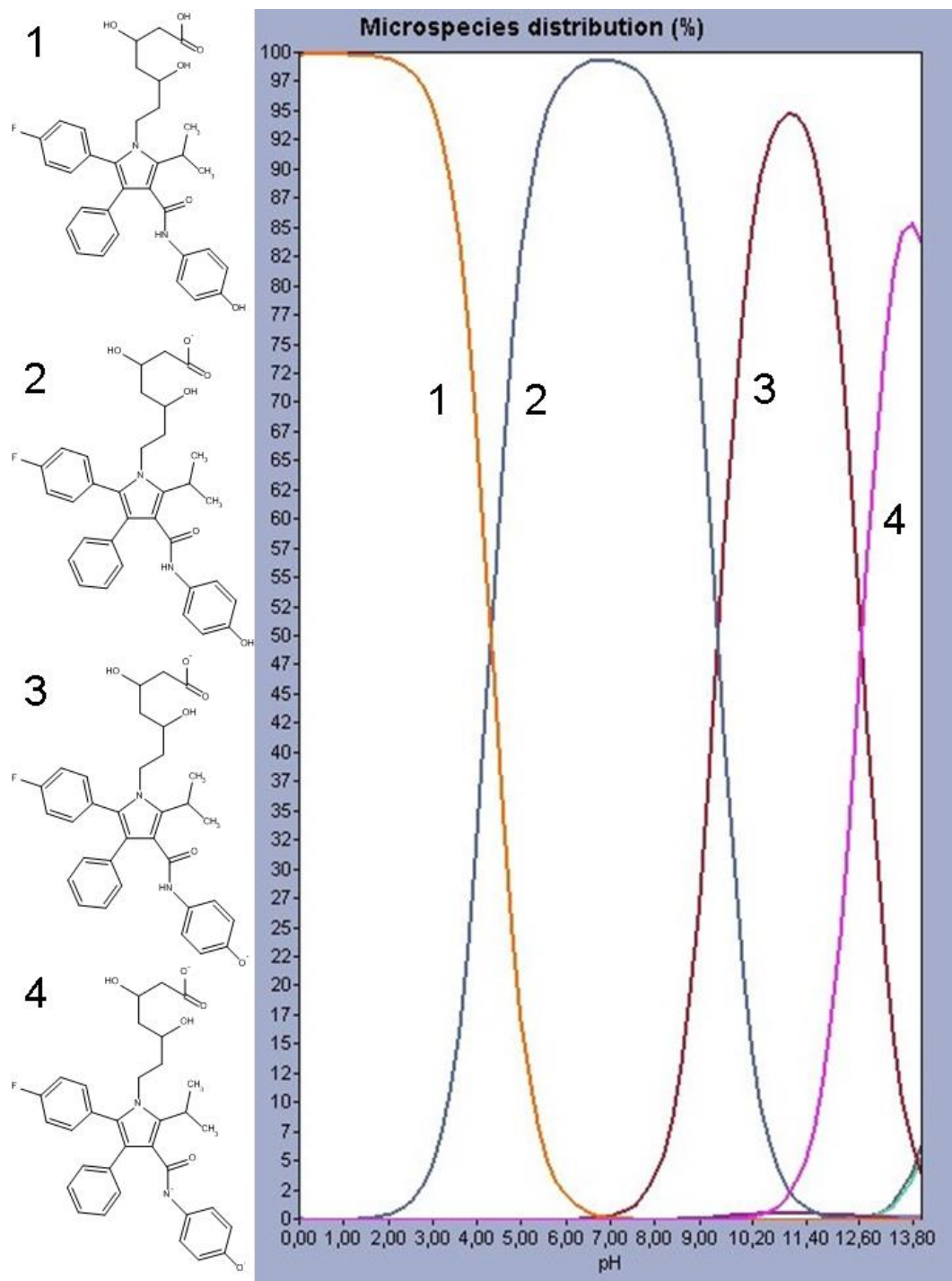




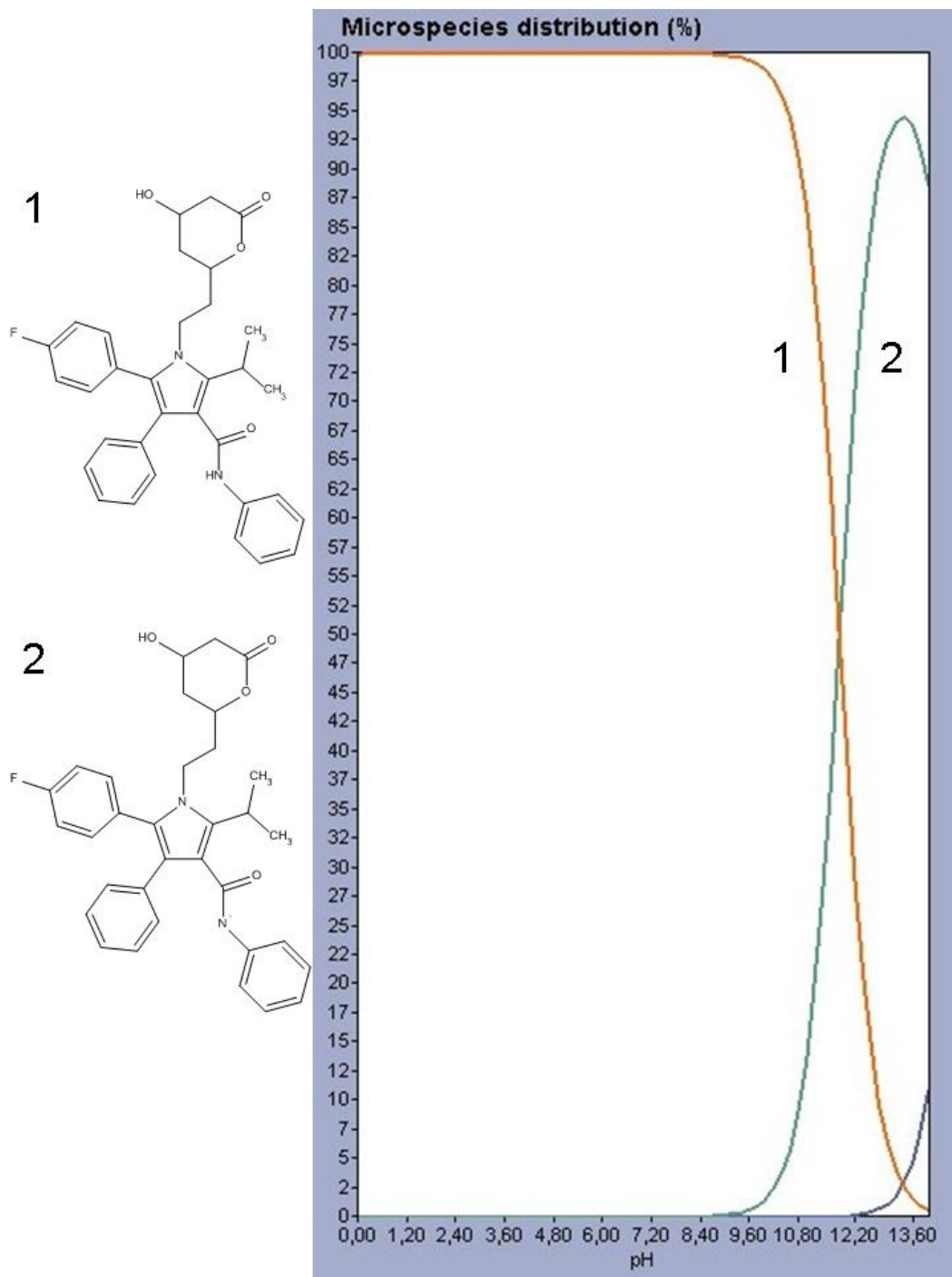
**Slika 30.** Distribucija jonizacionih oblika atorvastatina



Slika 31. Distribucija jonizacionih oblika *ortho*-hidroksiatorvastatina



**Slika 32.** Distribucija jonizacionih oblika *para*-hidroksiatorvastatina



**Slika 33.** Distribucija jonizacionih oblika atorvastatin-laktona

Kiseline su stabilnije od laktona i spontana intramolekulska ciklizacija se ne odvija lako u rastvorima (117, 151, 152). Laktone su nestabilni i u baznoj i u kiselj sredini, a njihova nestabilnost raste sa porastom temperature (117). Prema podacima iz literature, optimalna pH vrednost na kojoj će interkonverzija kiselina u laktone biti minimalna je između 4 i 6 (151). Za pripremu rastvora za optimizaciju HPLC i LC-MS/MS metode,

radnih rastvora standarda atorvastatina i metabolita, radnog rastvora internog standarda, rastvora za procenu linearnosti i kontrolu kvaliteta LC-MS/MS metode, kao i za pripremu uzoraka plazme pacova koji su bili na terapiji atorvastatinom (3.1.3.) izabran je pufer čiji je pH 4,6 tj. u oblasti u kojoj je minimalna interkonverzija. Obzirom da je pH plazme oko 7,4 (7,35-7,45), isti pufer se dodaje i uzorcima plazme pre ekstrakcije u cilju povećanja stabilnosti svih analiziranih komponenti. Uzorak plazme se meša sa odabranim puferom u odnosu 1: 1 (1 mL odmrznutog uzorka plazme se meša sa 1 mL 0,1 M pufera  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ , pH 4,6). Da bi se interkonverzija dodatno smanjila, uzorci se čuvaju na ledu.

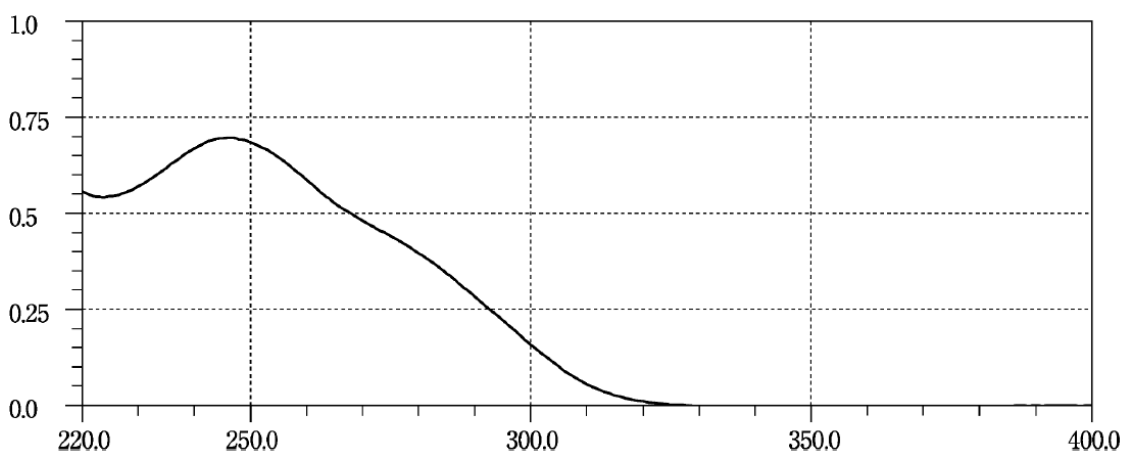
U cilju oslobađanja uzorka od nastalog precipitata, pre izvođenja SPE dobijena smeša se centrifugira na 1600 x g, 5 minuta.

Priprema uzoraka plazme primenom metode čvrsto-tečne ekstrakcije je opisana u poglavlju 3.1.4. Nizak udeo metanola prisutan u rastvoru za ispiranje treba da ukloni eventualne nečistoće prisutne u veoma niskim koncentracijama. Ova količina metanola je mala i ne utiče na eluiranje analiziranih supstanci sa kertridža. Nakon ispiranja, kertridži se suše propuštanjem vazduha tokom 2 minuta čime se onemogućava razblaživanje eluata zaostalim rastvorom za ispiranje. Mala količina dodatog pufera u rastvoru za eluiranje povećava rastvorljivost i stabilnost supstanci koje se eluiraju.

Za izvođenje čvrsto-tečne ekstrakcije korišćeni su C18 BakerBond kertridži (veličina kertridža 1 mL, punjeni sa 100 mg oktadecilsilana). Probni eksperimenti su izvođeni upotrebom acetonitrila umesto metanola pri čemu su dobijene neznatno veće Recovery vrednosti. Međutim, korišćenjem acetonitrila značajno se ekstrahuju endogene komponente koje se na hromatogramu eliraju na sličnom Rt kao i pik pOH-AT što otežava analizu i tumačenje hromatograma. Upotrebom metanola dobijena je stabilna bazna linija sa manje pikova koji odgovaraju ekstrahovanim endogenim jedinjenjima.

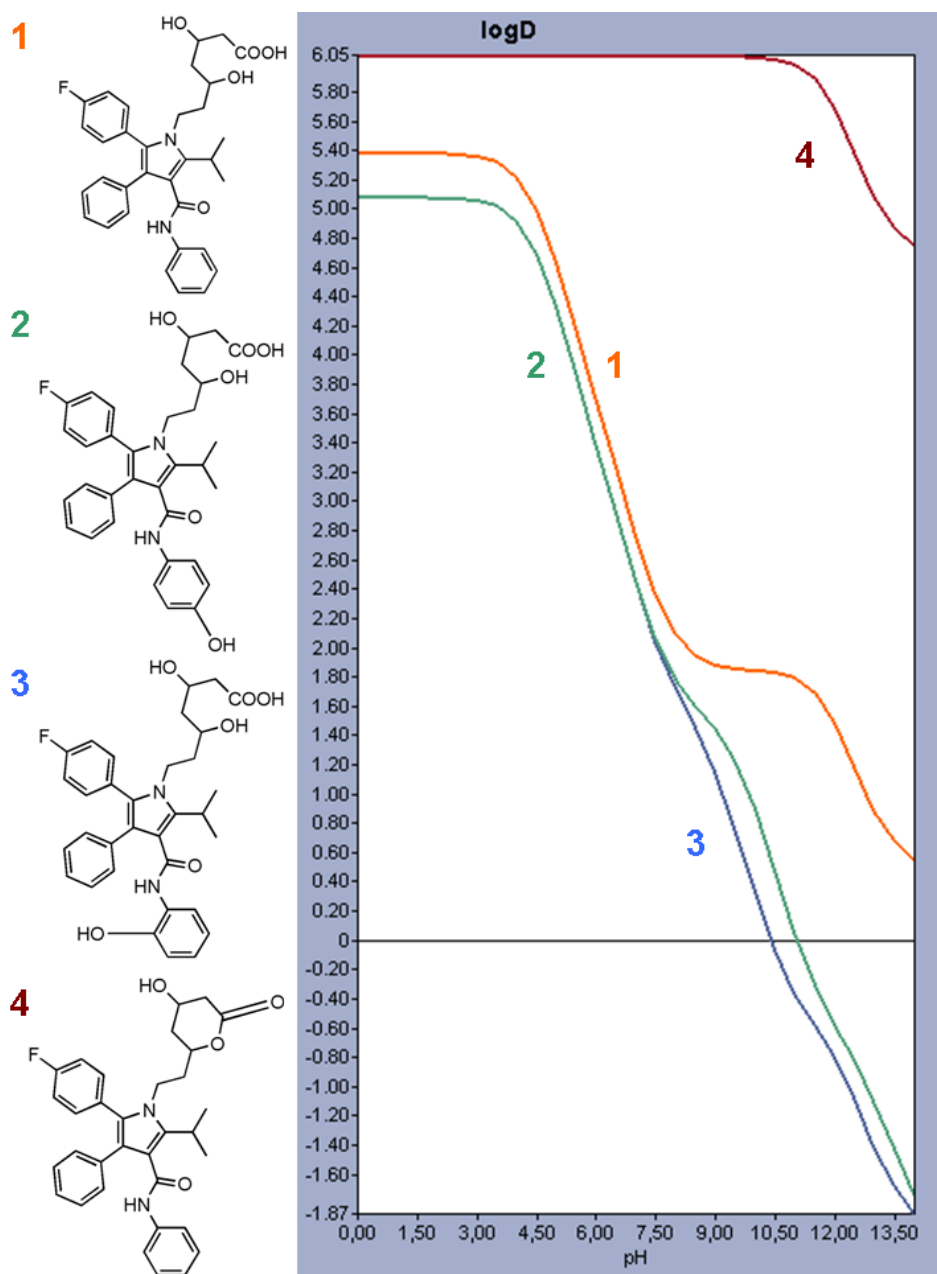
### 4.1.2. Optimizacija HPLC metode

Prisustvo aromatičnih prstenova (fenil i pirol) u strukturi analiziranih jedinjenja ukazuje da je određivanje RP-HPLC metodom sa UV detekcijom moguće. UV spektar atorvastatin-kalcijuma je prikazan na Slici 34. Odabrana je detekcija na talasnoj dužini maksimalne apsorbancije, 254 nm. Obzirom da aktivni metaboliti atorvastatina imaju veoma sličnu hemijsku strukturu, odabrana je ista talasna dužina.



**Slika 34.** UV spektar atorvastatin-kalcijuma

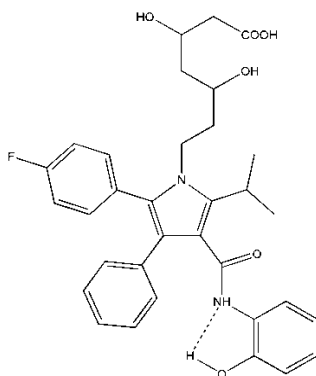
Razdvajanje atorvastatina i metabolita je postignuto reverzno-faznom hromatografskom metodom, na C18 koloni. Izbor stacionarne faze koja će se koristiti u HPLC metodi je izvršen u skladu sa vrednosti logP i logD ispitivanih jedinjenja. Na Slici 35. prikazan je uporedni profil pH zavisne lipofilnosti atorvastatina i sva tri praćena metabolita. Atorvastatin, oOH-AT i pOH-AT su kiseline i njihova lipofilnost se smanjuje porastom pH vrednosti rastvora. Na vrednosti pH 4,6 na kojoj je interkonverzija kiselina-lakton mala, lipofilnost ovih jedinjenja je zadovoljavajuća i omogućava izvođenje eksperimenta. Atorvastatin lakton je neutralno jedinjenje sa lipofilnim osobinama u celom opsegu pH. Za HPLC analizu odabrana je kolona ZORBAX Eclipse Plus C18 Analytical (4,6 mm x 250 mm, 5 µm prečnik čestica). Iako postoje i druge pogodne kolone, izabrana je hromatografska kolona punjena silikagelom sa dodatim ugljovodoničnim lancima od 18 C atoma jer je na njoj postignuto dobro razdvajanje analiziranih jedinjenja. Osim navedenog, ove kolone su komercijalno dostupne u različitim dužinama, prečnicima i veličini čestica kojima su napunjene.



**Slika 35.** Uporedni profil pH zavisne lipofilnosti atorvastatina (1), *p*-hidroksiatorvastatina (2), *o*-hidroksiatorvastatina (3) i atorvastatin-laktona (4)

Korišćenjem programa MarvinSketch 6.1 izračunate su vrednosti logP: oOH-AT i pOH-AT (5,08); AT (5,39); AT-L (6,05). Na osnovu hemijske strukture i izračunate lipofilnosti može se predvideti redosled eluiranja ispitivanih jedinjenja tokom analize koja se vrši na nepolarnoj stacionarnoj i uz korišćenje polarne mobilne faze. Atorvastatin-lakton je najlipofilnije jedinjenje i poslednji se eluira sa kolone. Iako *orto*-hidroksiatorvastatin i *para*-hidroksiatorvastatin imaju istu logP vrednost zbog čega bi se

moglo očekivati da se eluiraju na istom retencionom vremenu („preklapanje“ pikova) analiza je pokazala da je pOH-AT polarniji, brže se eluira i ima kraće retenciono vreme. Zbog prisustva OH grupe u *orto* položaju u odnosu na amid, oOH-AT gradi intramolekulsku vodoničnu vezu (Sl. 36), lipofilniji je i duže se zadržava na koloni. Lipofilnost AT je veća od lipofilnosti njegovih hidroksi metabolita i manja od lipofilnosti AT-L što određuje njegovo zadržavanje na koloni i položaj pika na hromatogramu (pik se nalazi između hidroksi metabolita i laktona, shodno dobijenim logP vrednostima).



**Slika 36.** Intramolekulska vodonična veza u strukturi *ortho*-hidroksiatorvastatina

#### 4.1.2.1. Screening dizajn

Kako bi broj varijabli koje će biti ispitivane bio što manji i da bi se izbegli kompleksni modeli velike varijabilnosti korišćen je  $2^3$  pun faktorski dizajn sa centralnom tačkom (153) u kombinaciji sa metodologijom površine odgovora (*Response Surface Methodology*) (154). Svi eksperimenti izvedeni su nasumično i svaki je ponovljen tri puta u cilju izračunavanja standardne greške.

Odgovori koji su praćeni su: retenciono vreme prvog pika ( $R_t$  pOH-AT), retenciono vreme poslednjeg pika ( $R_t$  AT-L), simetrija pika sva četiri jedinjenja (Sim pOH-AT, Sim oOH-AT, Sim AT i Sim AT-L) i relativno retenciono vreme prvog pika (RRt pOH-AT). Retenciono vreme prvog pika ( $R_t$  pOH-AT) je izabrano kao odgovor koji će se pratiti jer su probni eksperimenti pokazali da se pOH-AT eluira zajedno sa mobilnom fazom i endogenim komponentama što zahteva optimizaciju metode. Kao jedan od posmatranih odgovora izabrano je  $R_t$  atorvastatin-laktona, najmanje polarne



komponente koja se poslednja eluira i čijom optimizacijom se može ograničiti ukupno vreme trajanja analize. Temperatura kolone, sastav i protok mobilne faze utiču na retenciju jedinjenja i dužinu trajanja hromatografskog razdvajanja pa su izabrani kao varijable čiji je uticaj ispitivan u okviru punog  $2^3$  faktorskog dizajna ( $x_1$  - sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi,  $x_2$  - temperatura kolone i  $x_3$  - protok mobilne faze). Ispitivane varijable, kao i njihovi domeni su prikazani u Tabeli 1., a matrica eksperimenata za pun faktorski dizajn je prikazana u Tabeli 2. (poglavlje 3.1.5.). Faktor rezolucije nije uzet u razmatranje jer su probni eksperimenti pokazali da je razdvajanje analita bilo zadovoljavajuće ( $R_s > 2$ ).

Na osnovu dobijenih odgovora izračunati su parametri modela i procenjeni efekti koji, podeljeni sa procenjenom standardnom greškom daju standardizovane efekte. Na osnovu eksperimentalne greške i apsolutnih vrednosti standardizovanih efekata procenjena je statistička značajnost ispitivanih varijabli primenom ANOVA analize i odgovarajuće p-vrednosti. Za sve posmatrane odgovore dobijene su p-vrednosti manje od 0,05, što ukazuje na njihovu značajnost, pa su svi dalje posmatrani i u optimizacionom dizajnu.

#### **4.1.2.2. Optimizacioni dizajn**

Optimalni hromatografski uslovi su procenjeni *face centered* centralnim kompozitnim dizajnom primenom Derringer-ove funkcije poželjnih odgovora. Ovaj tip dizajna je izabran jer je fleksibilan i visoko efikasan. Ukupan broj eksperimenata kod *face centered* centralnog kompozicionog dizajna je definisan jednačinom  $2^k + 2k + n$ , gde je  $k$  broj praćenih varijabli (izabrano  $k = 3$ ), a  $n$  je broj ponavljanja centralne tačke (izabrano  $n = 6$ ). Centralna tačka je ponovljena 6 puta u cilju procene eksperimentalne greške.

Eksperimenti su izvođeni nasumično, da bi se minimizovao efekat varijabli koje nisu praćene. U Tabeli 17. su prikazani izvedeni eksperimenti i dobijeni odgovori.

**Tabela 17.** *Face-centered* centralni kompozitni dizajn i eksperimentalno dobijeni rezultati

Nivoi varijabli			Odgovori sistema						
$x_1$ (%)	$x_2$ (°C)	$x_3$ (mL/min)	Rt pOH-AT	Rt AT-L	Sim pOH-AT	Sim oOH-AT	Sim AT	Sim AT-L	RRt pOH-AT
65	35	1	2,851	6,982	1,183	1,122	1,132	1,102	1,102
65	35	1	2,856	7,089	1,146	1,098	1,107	1,121	1,126
65	30	1	3,158	7,445	0,753	0,779	0,872	0,979	1,213
65	35	1	2,874	7,251	1,128	1,168	1,232	1,246	1,207
65	35	1	3,214	7,861	1,047	1,119	1,206	1,123	1,143
70	30	1,2	2,905	7,652	0,441	0,503	0,427	0,913	0,556
60	35	1	2,134	7,128	1,148	1,204	0,986	0,998	1,162
65	35	0,8	2,302	7,636	0,897	0,962	1,165	0,946	1,237
65	35	1	2,826	7,241	1,147	1,201	1,136	1,121	1,145
70	30	0,8	2,342	8,359	0,595	0,436	0,661	0,626	1,362
60	40	0,8	1,764	6,352	0,432	0,553	0,614	0,661	1,245
60	30	0,8	2,089	6,452	0,559	0,651	0,801	0,867	1,268
60	30	1,2	2,453	7,753	0,982	0,812	0,806	0,995	0,585
70	40	1,2	1,472	6,152	1,284	0,993	0,898	0,962	0,565
65	40	1	1,976	6,573	1,112	1,085	0,903	1,011	1,082
60	40	1,2	2,543	8,459	1,052	1,021	0,984	0,924	0,581
70	35	1	1,752	6,561	1,064	1,011	1,006	0,922	1,151
65	35	1	2,847	7,139	1,152	1,117	1,127	1,098	1,142
70	40	0,8	0,472	6,083	1,109	0,595	0,685	0,538	1,365
65	35	1,2	3,367	8,124	1,203	1,206	1,167	1,121	0,536

$x_1$  – sadržaj ACN u mobilnoj fazi,  $x_2$  – temperatura kolone,  $x_3$  – protok mobilne faze, Rt – retenciono vreme, Sim – simetrija pika analita, RRt – relativno retenciono vreme

Površina odgovora se može opisati kvadratnim matematičkim modelom za tri nezavisne varijable prema sledećoj jednačini:

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j \leq k} b_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

gde su:

y – posmatrani odgovor (Rt pOH-AT, Rt AT-L...) koji se modeluje

b – regresioni koeficijent

x<sub>i</sub>, x<sub>j</sub> – varijable.

Izračunati koeficijenti modela odgovora i dobijene p-vrednosti su prikazane u Tabeli 18.

U cilju dobijanja realističnijeg modela, rezultati kod kojih su p-vrednosti bile veće od 0,05 (nivo pouzdanosti 95 %) su izbačene iz modela procesom *'eliminacije unazad'*.

**Tabela 18.** Modeli odgovora sa p-vrednostima i statističkim parametrima ( $R^2$ ) dobijenim ANOVA analizom

	$b_0$	$b_1$	$b_2$	$b_3$	$b_{12}$	$b_{13}$	$b_{23}$	$b_{11}$	$b_{22}$	$b_{33}$	$R^2$	$R^2$ korigovano
Rt pOH- AT	2,840 0,0001 <sup>a</sup>	-0,200 0,0043	-0,470 0,0001	0,380 0,0001	-0,380 0,0001	-0,053 0,4182	0,110 0,1175	-0,790 0,0001	-0,170 0,1429	-0,099 0,3732	0,9665	0,9363
Rt AT-L	7,270 0,0001	-0,130 0,1042	-0,400 0,0003	0,330 0,0014	-0,550 0,0001	-0,510 0,0001	0,200 0,0397	-0,440 0,0121	-0,270 0,0862	0,600 0,0018	0,9409	0,8878
Sim pOH- AT	1,140 0,0001	0,032 0,0834	0,170 0,0001	0,140 0,0001	0,180 0,0001	-0,130 0,0001	0,066 0,0054	-0,033 0,3236	-0,210 0,0001	-0,089 0,0187	0,9794	0,9608
Sim oOH- AT	1,160 0,0001	-0,070 0,0013	0,110 0,0001	0,130 0,0001	0,067 0,0036	-0,020 0,2755	0,080 0,0012	-0,086 0,0180	-0,260 0,0001	-0,110 0,0048	0,9799	0,9618
Sim AT	1,160 0,0001	-0,051 0,0130	0,052 0,0126	0,036 0,0632	0,063 0,0079	-0,049 0,0266	0,100 0,0003	-0,160 0,0006	-0,270 0,0001	- (0,7937)	0,9698	0,9426
Sim AT-L	1,120 0,0001	-0,048 0,0165	-0,028 0,1222	0,130 0,0001	0,030 0,1448	0,040 0,0593	0,034 0,1007	-0,140 0,0013	-0,110 0,0077	-0,068 0,0600	0,9546	0,9138
RRt pOH- AT	1,140 0,0001	0,016 0,2247	-0,015 0,2593	-0,370 0,0001	0,005 0,7284	-0,032 0,0391	0,003 0,8235	0,026 0,2831	0,017 0,4718	-0,240 0,0001	0,9907	0,9823

<sup>a</sup> p-vrednost

Obzirom da odstupanja modela koji opisuje relativno retenciono vreme pOH-AT nisu bila konstantna, predložena je matematička transformacija modela za ovaj odgovor. Za ovu svrhu je primenjena *Box Cox* opcija kojom je pronađena najpovoljnija matematička transformacija koja se može primeniti na ovaj odgovor. Kao rezultat, predložena je primena recipročne vrednosti kvadratnog korena (sa  $\lambda = -0,5$ ). Dobijeni statistički podaci su prikazani u Tabeli 19.

Procena predloženih matematičkih modela je izvršena na osnovu koeficijenta korelacije,  $R^2$ . Uočeno je da koeficijent korelacije zavisi od broja varijabli, odnosno, da vrednost opada kada se neka varijabla ukloni iz regresionog modela. Zbog toga je posmatran korigovani koeficijent korelacije koji u obzir uzima i broj izabраниh promenljivih. Dobijeni rezultati za korigovane koeficijente korelacije su u prihvatljivim granicama ( $R^2 \geq 0,80$ ), čime je potvrđeno dobro slaganje eksperimentalnih rezultata i rezultata predviđenih modelom.

Svi redukovani modeli imaju p-vrednost manju od 0,05, što ukazuje na njihovu značajnost. 'Adekvatna preciznost' u Tabeli 19. predstavlja odnos signal / šum, tj. odgovor / devijacija odgovora i poželjno je da ima vrednost veću od 4. Takav rezultat ukazuje da je signal adekvatan tj. da je model značajan. Relativna standardna devijacija (RSD) je mera reproduktivnosti modela i treba da bude manja od 10 % (154) kod reproduktivnih modela.

**Tabela 19.** Redukovani modeli odgovora i statistički podaci dobijeni ANOVA analizom (nakon 'eliminacije unazad')

Odgovor	Redukovani modeli odgovora*	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> korigovano	R <sup>2</sup> predviđeno	Adekvatna preciznost	RSD (%)
Rt pOH-AT	$2,83 - 0,02x_1 - 0,47x_2 + 0,38x_3 - 0,38x_1x_2 - 0,83x_1^2$	0,9454	0,9258	0,8786	26,388	7,88
Rt AT-L	$7,23 - 0,40x_2 + 0,33x_3 - 0,55x_1x_2 - 0,051x_1x_3 + 0,20x_2x_3 - 0,54x_1^2 + 0,50x_3^2$	0,9007	0,8428	0,7602	12,984	3,88
Sim pOH-AT	$1,13 + 0,17x_2 + 0,14x_3 + 0,18x_1x_2 - 0,13x_1x_3 + 0,066x_2x_3 - 0,22x_2^2 - 0,1x_3^2$	0,9695	0,9517	0,8050	22,114	6,01
Sim oOH-AT	$1,16 - 0,07x_1 + 0,11x_2 + 0,13x_3 + 0,067x_1x_2 + 0,08x_2x_3 - 0,056x_1^2 - 0,26x_2^2 - 0,11x_3^2$	0,9772	0,9606	0,9108	22,759	5,47
Sim AT	$1,16 - 0,051x_1 + 0,052x_2 + 0,063x_1x_2 - 0,049x_1x_3 + 0,1x_2x_3 - 0,16x_1^2 - 0,27x_2^2$	0,9564	0,9310	0,7508	19,841	6,25
Sim AT-L	$1,11 + 0,13x_3 - 0,17x_1^2 - 0,13x_2^2$	0,8370	0,8064	0,7443	15,555	8,27
RRt pOH-AT**	$0,94 - 1,5x10^{-3}x_1 + 5,4x10^{-3}x_2 + 0,23x_3 + 3x10^{-3}x_1x_2 + 0,015x_1x_3 - 1,68x10^{-3}x_2x_3 - 0,016x_1^2 - 0,11x_2^2 + 0,19x_3^2$	0,9960	0,9925	0,9806	45,543	1,59

\* - u tabelu su uključeni koeficijenti kod kojih je p-vrednost manja od 0,05; varijable su u kodiranim vrednostima

\*\* - izvedena matematička transformacija u recipročnu vrednost kvadratnog korena

Stepen uticaja promenljivih veličina na posmatrani odgovor određen je apsolutnim vrednostima koeficijenta (što je veća apsolutna vrednost koeficijenta koji stoji pored oznake varijable u jednačinama, veći je i uticaj te varijable). Pozitivan predznak koeficijenta ukazuje na proporcionalan odnos između posmatranog odgovora i varijable, a negativan predznak ukazuje na obrnuto proporcionalan odnos (porastom vrednosti varijable, odgovor opada). U Tabeli 19. se uočava da različite nezavisno promenljive veličine imaju različit uticaj na posmatrane odgovore. Sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi ( $x_1$ ) ima najveći uticaj na retenciju *para*-hidroksiatorvastatina i *orto*-hidroksiatorvastatina kao i simetriju pika atorvastatin-laktona. Na simetriju pikova atorvastatina i hidroksi-metabolita najviše utiče temperatura kolone ( $x_2$ ), a na relativno retenciono vreme pOH-AT najveći uticaj ima protok mobilne faze ( $x_3$ ). Uticaj varijabli na posmatrane odgovore nije uvek identičan (koeficijenti različitog predznaka), pa tako povećanje udela acetonitrila u mobilnoj fazi smanjuje retenciono vreme AT-L (-0,54), što je povoljan efekat, ali istovremeno smanjuje simetriju pikova oOH-AT (-0,086) i AT (-0,16) što nije prihvatljivo. Obzirom da odabrane varijable ne utiču na posmatrane odgovore na isti način, neophodna je dodatna metoda optimizacije.

Derringer-ova funkcija poželjnih odgovora (155, 156) je metoda kojom se vrši istovremena optimizacija više nezavisno promenljivih veličina prema većem broju posmatranih odgovora. Funkcije poželjnih odgovora transformišu različite karakteristike sistema u jedan jedinstveni cilj (transformišu merne karakteristike predviđenih odgovora sistema,  $\hat{y}$ , u bezdimenzionalnu skalu). Individualna funkcija poželjnih odgovora ( $d_i$ ) daje informacije o tome kako kombinacije faktorskih nivoa zadovoljavaju postavljeni cilj za svaki od posmatranih odgovora dok je globalna funkcija poželjnih odgovora (D) (137) mera koja određuje u kom stepenu kombinacije faktorskih nivoa zadovoljavaju postavljene ciljeve za sve odgovore. Postoji nekoliko načina izračunavanja funkcije poželjnih odgovora, u zavisnosti od toga da li svaki od n odgovora treba biti maksimiziran ili minimiziran ili ima ciljnu vrednost. Ako odgovor treba biti maksimiziran, vrednost  $d_i$  se definiše jednačinom:

$$d_i = \left( \frac{\hat{y} - y_{\min}}{y_{\max} - y_{\min}} \right)^{w_i}, y_{\min} \leq \hat{y} \leq y_{\max} \dots$$

$$d_i = 1, \hat{y} > y_{\max}; d_i = 0, \hat{y} < y_{\min}$$

Gde su:

$y_{\min}, y_{\max}$  – najniže i najviše vrednosti dobijene za odgovor i

$w_i$  – *weight*

Individualna funkcija poželjnih odgovora,  $d_i$ , se kreće od 0 (nepoželjan odgovor) do 1 (najpoželjniji odgovor). U oba slučaja,  $d_i$  će varirati nelinearno dok se približava poželjnoj vrednosti. Vrednost  $w_i$  (*weight*) dodeljuje istraživač i ona se može kretati od 0,1 do 10. Ova vrednost određuje izgled funkcije  $d_i$  (linearna, konkavna, konveksna), a time i način na koji se dolazi do najprihvatljivijih rešenja tokom optimizacije. Kada je vrednost  $w_i$  veća od 1 kao prihvatljivi odgovori se uzimaju oni koji su bliže postavljenom cilju, a kada je  $w_i$  manje od 1, prihvataju se i oni odgovori koji ne ispunjavaju u potpunosti postavljeni cilj. Kada je vrednost  $w_i = 1$ , funkcija je linearna (157, 158). U ovom radu odabrana vrednost  $w_i$  je 1, za sve posmatrane odgovore.

Globalna funkcija poželjnih odgovora ( $D$ ) se definiše individualnim funkcijama poželjnih odgovora ( $d_i$ ). Postoji nekoliko načina za njeno izražavanje, a u radu je korišćena jednačina koja  $D$  definiše kao težinsku geometrijsku sredinu različitih  $d_i$  vrednosti:

$$D = \left( d_1^{p_1} x d_2^{p_2} x \dots x d_n^{p_n} \right)^{1/n}$$

gde je:

$n$  – broj odgovora

$p_n$  – 'weight' odgovora

Vrednost  $p_n$  predstavlja relativan značaj svake od individualnih funkcija poželjnih odgovora,  $d_i$ , tj. relativnu težinu. U većini kompjuterskih programa ova vrednost se označava kao *importance*. Vrednost  $p_i$  dodeljuje istraživač i ona se kreće od 0,1 (najmanje značajno) do 10 (najznačajnije).

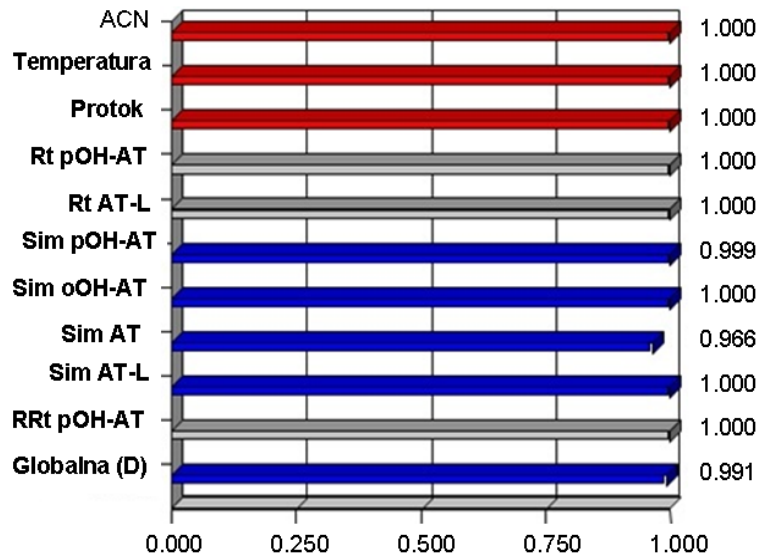


Vrednost  $D$  bliska jedinici znači da je kombinacija različitih kriterijuma optimalna, dok vrednost  $D$  jednaka 0 ukazuje na krajnje nepoželjne odgovore. Ako se bilo koji od posmatranih odgovora ili varijabli nađe izvan opsega poželjnosti, globalna funkcija dobija vrednost 0. Ciljevi optimizacije za svaki od posmatranih odgovora su prikazani u Tabeli 20.

**Tabela 20.** Ciljevi multikriterijumske optimizacije pojedinačnih posmatranih odgovora

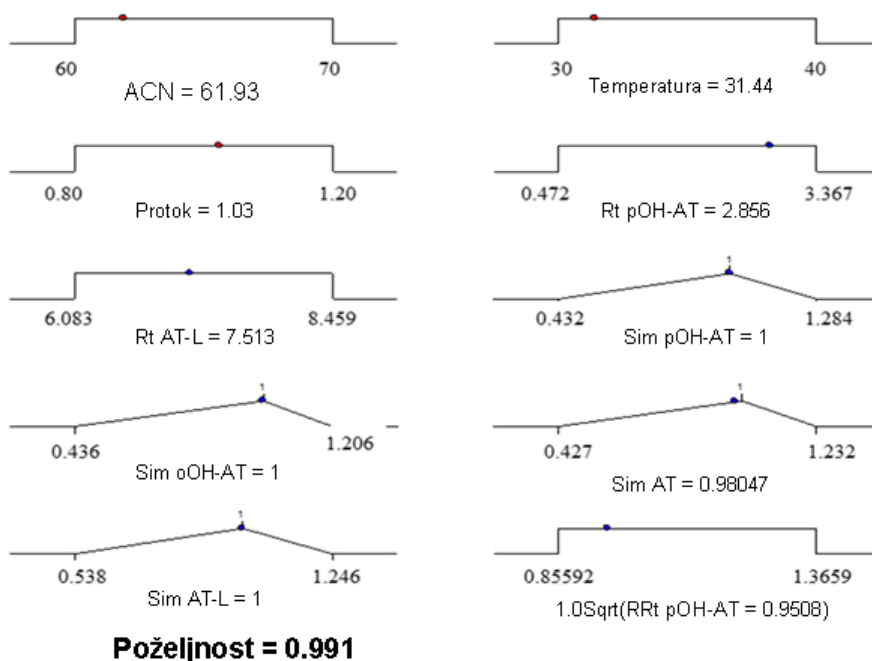
Odgovor	Cilj	Weight	Donja granica	Gornja granica	Importance
Acetonitril	opseg	1	60	70	3
Temperatura	opseg	1	30	40	3
Protok	opseg	1	0,8	1,2	3
Rt pOH-AT	opseg	1	0,472	3,367	3
Rt AT-L	ciljna vrednost 7	1	6,083	8,459	4
Sim pOH-AT	ciljna vrednost 1	1	0,432	1,284	3
Sim oOH-AT	ciljna vrednost 1	1	0,436	1,206	3
Sim AT	ciljna vrednost 1	1	0,427	1,232	3
Sim AT-L	ciljna vrednost 1	1	0,538	1,246	3
RRt pOH-AT	opseg	1	0,856	1,366	3

Proces optimizacije je izveden sa definisanim uslovima i ograničenjima. Na Slici 37. prikazane su individualne funkcije poželjnih odgovora ( $d_i$ ) svakog od posmatranih odgovora i izračunata težinska geometrijska sredina koja predstavlja globalnu funkciju poželjnih odgovora ( $D = 0,991$ ).



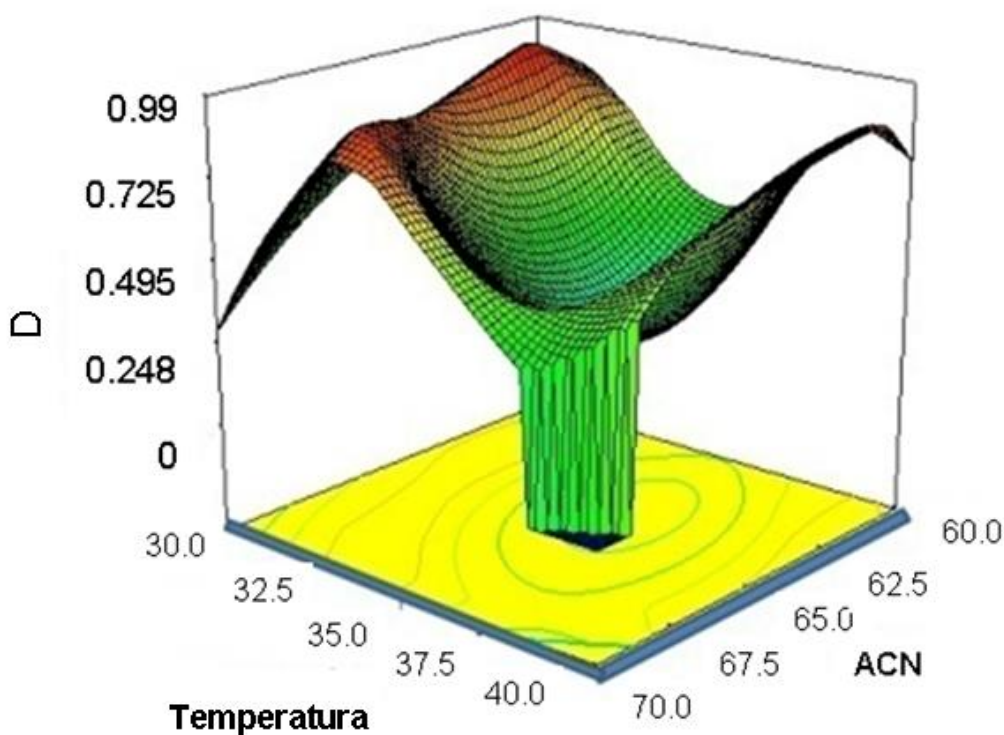
**Slika 37.** Individualne funkcije poželjnih odgovora ( $d_i$ ) različitih odgovora sistema

Izračunavanje funkcije poželjnih odgovora je izvedeno primenom programa Design-Expert® 7.0. a dobijeni rezultati su grafički prikazani (Sl 38). Na slici je prikazan linearan oblik svake od pojedničanih funkcija, što je u skladu sa odabranim vrednostima  $w_i = 1$ .

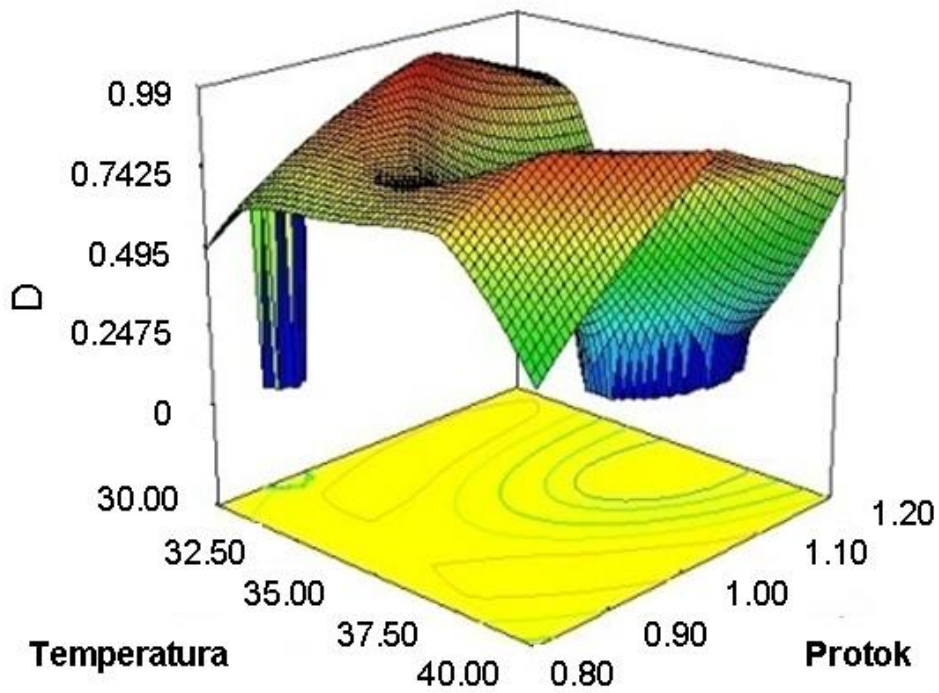


**Slika 38.** Grafički prikaz ograničenja prihvaćenih prilikom izračunavanja globalne funkcije poželjnih odgovora i dobijeni optimalni uslovi

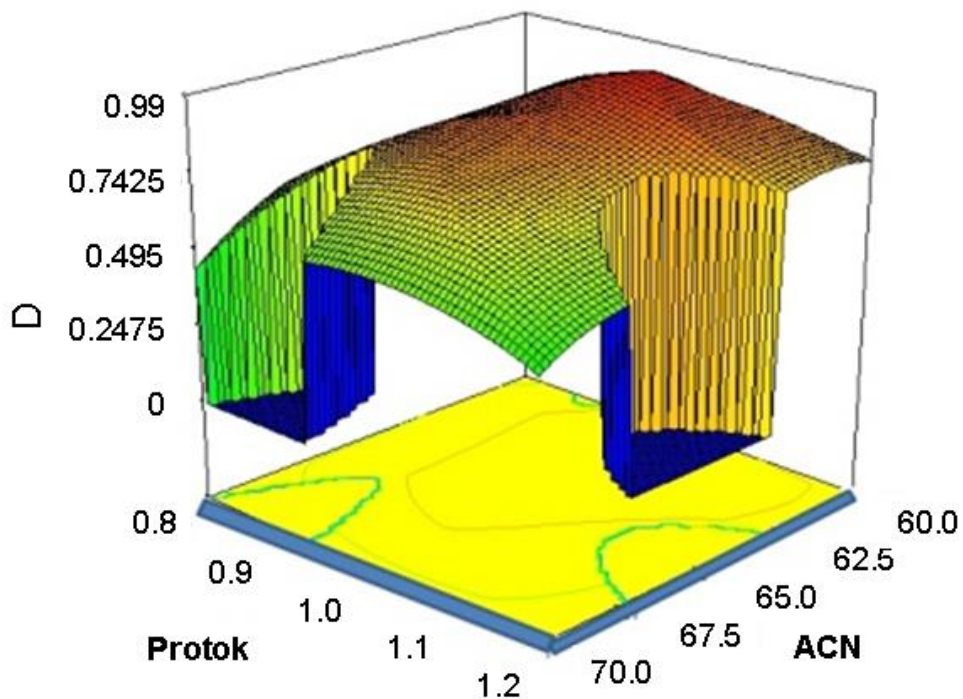
Vizuelizacija zavisnosti posmatranih odgovora od promene ispitivanih varijabli i brz odabir pravih optimalnih uslova omogućilo je konstruisanje 3D dijagrama. Dobijeni 3D dijagrami prikazani su na Slikama 39., 40. i 41., na kojima se mogu uočiti optimalni hromatografski uslovi, uticaj svake od ispitivanih varijabli kao i njihova interakcija na posmatrane odgovore. Na svakom od dijagrama prikazana je interakcija dve varijable, dok je za treću varijablu odabrana konstantna, optimalna vrednost.



**Slika 39.** Dijagram 3D globalne funkcije poželjnih odgovora  $D = f(\text{temperatura, \%ACN})$ ; protok mobilne faze 1,03 mL/min



**Slika 40.** Dijagram 3D globalne funkcije poželjnih odgovora  $D = f$  (temperatura, protok); sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi 61,93 %

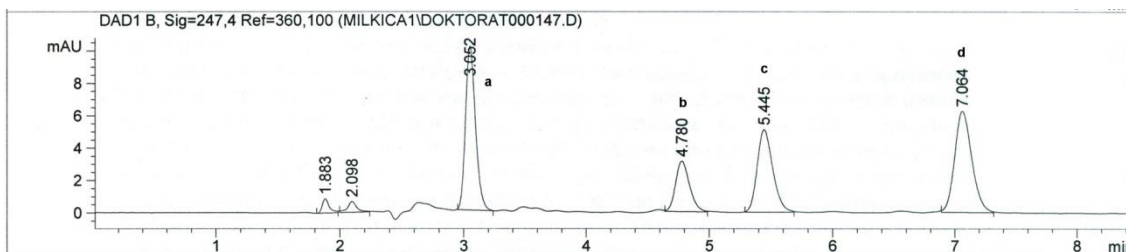


**Slika 41.** Dijagram 3D globalne funkcije poželjnih odgovora  $D = f$  (protok, % ACN); temperatura kolone  $T = 31,44 \text{ } ^\circ\text{C}$

Koordinate koje odgovaraju maksimumima prikazanih funkcija su izabrane kao najbolji hromatografski uslovi. Vrednosti ispitivanih varijabli koje daju najvišu vrednost globalne funkcije poželjnih odgovora su bile: 61,93 % acetonitrila, temperatura kolone 31,44 °C i protok mobilne faze 1,03 mL/min.

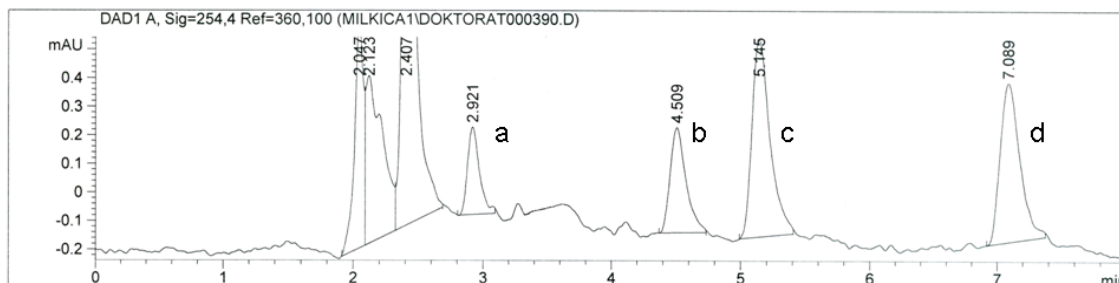
### 4.1.3. Primena optimizovane HPLC metode

RP-HPLC metoda je primenjena za određivanje *p*OH-AT, *o*OH-AT, AT i AT-L. Na Slici 42. je prikazan hromatogram smeše rastvora standarda koncentracije 500 ng/mL.



**Slika 42.** Hromatogram rastvora standarda *p*-hidroksiatorvastatina (a), *o*-hidroksiatorvastatina (b), atorvastatina (c) i atorvastatin-laktona (d) dobijen pri optimalnim eksperimentalnim uslovima

Na Slici 43. prikazan je hromatogram rastvora uzorka plazme eksperimentalnih životinja koji je opterećen navedenim standardima u koncentraciji od po 50 ng/mL. Na prikazanom hromatogramu se uočavaju dobro razdvojeni pikovi svih analiziranih supstanci.



**Slika 43.** Hromatogram rastvora uzorka plazme opterećenog standardima *p*-hidroksiatorvastatina (a), *o*-hidroksiatorvastatina (b), atorvastatina (c) i atorvastatin-laktona (d) pri optimalnim eksperimentalnim uslovima

Optimizacijom metode postignuto je dobro razdvajanje analiziranih supstanci u uzorcima standardnih rastvora kao i u uzorcima plazme eksperimentalnih životinja. Glavno ograničenje u primeni RP-HPLC metode u daljem eksperimentalnom radu su bile niske koncentracije atorvastatina i metabolita u pripremljenim uzorcima plazme (red veličine ng/mL ili manje), koje su često bile ispod limita detekcije. Drugi problem su predstavljale male količine ekstrahovanih endogenih komponenti od kojih su neke pokazivale apsorpciju u UV oblasti i interferenciju sa pikovima bazne linije. Zaključeno je da predložena HPLC metoda iako optimizovana, ima ograničenja koja potiču od detektora (ne pokazuje dovoljnu osetljivost), pa je u daljem radu korišćena metoda tačne hromatografije koja je povezana sa masenim detektorom. Maseni detektor omogućava selektivno praćenje zadanog produkta koji nastaje iz odgovarajućeg prekursora i ne detektuje ostale jone, eventualno prisutne u uzorku, čime je osetljivost metode značajno povećana. Korišćen je HPLC uređaj spregnut sa masenim detektorom koji koristi manji protok mobilne faze pa je razblaženje uzorka manje, što dodatno povećava osetljivost metode.

Dobijeni rezultati optimizacije eksperimentalnih uslova RP-HPLC metode su transferisani na LC-MS/MS uređaj. Za LC-MS/MS analizu korišćena je kraća hromatografska kolona da bi se kompenzovalo duže trajanje analize do kog bi došlo zbog značajno manjeg protoka (400  $\mu$ L/min umesto 1000  $\mu$ L/min). Da bi se trajanje analize dodatno skratilo umesto izokratskog korišćeno je gradijentno eluiranje. Izabrana metoda je validirana a dobijeni rezultati su prikazani u poglavlju 4.2.

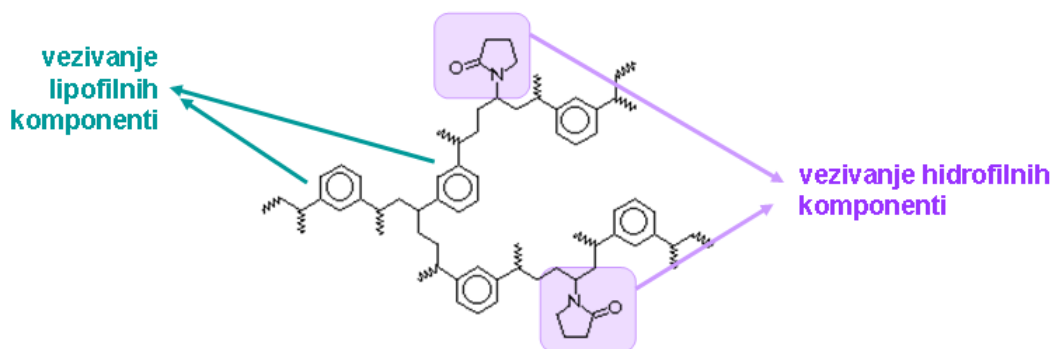
## **4.2. REZULTATI OPTIMIZACIJE I VALIDACIJE LC-MS/MS METODE**

### **4.2.1. Priprema uzoraka za LC-MS/MS analizu**

Tokom preliminarnih istraživanja uzorci plazme eksperimentalnih životinja su pripremani metodom precipitacije proteina. LC-MS/MS analizom uzoraka koji su dobijeni na ovaj način ustanovljeno je da sadrže male količine analiziranih jedinjenja, koje vremenom opadaju. Prema literaturnim podacima (159) precipitacija proteina dovodi do najvećeg stepena supresije jona i najjačeg efekta matriksa i nije pogodna za pripremu uzoraka za metodu masene spektrometrije. Metoda SPE daje čiste uzorke, visoku efikasnost ekstrakcije, minimalnu supresiju jona i uticaj matriksa.

Priprema uzoraka za ekstrakciju opisana je u poglavlju 3.1.3.

Metoda čvrsto-tečne ekstrakcije opisana u poglavlju 4.1.1. je modifikovana tako što su zamenjeni kertridži i rastvarač za eluiranje. C18 kertridži su zamenjeni sa OASIS® HLB kertridžima (Sl. 44) koji su punjeni posebnim sorbensom pogodnim za vezivanje i hidrofilnih i lipofilnih supstanci. Prednost OASIS® HLB kertridža je što se tokom rada mogu osušiti, bez gubitka efikasnosti, za razliku od C18 kertridža koji se tokom kondicioniranja i eluiranja moraju održavati vlažnim. Acetonitril je izabran kao komponenta rastvora za eluiranje jer se njegovim korišćenjem dobijaju veće Recovery vrednosti (poglavlje 4.1.1.).



**Slika 44.** Hemijska struktura sorbensa u OASIS® HLB SPE kertridžima

U cilju efikasnog ekstrahovanja, izvršeno je eluiranje tri puta sa po 500  $\mu\text{L}$  pripremljenog eluenta. Svaki od dobijenih eluata je zasebno injiciran u LC-MS/MS sistem. Iz dobijenih površina odgovora zaključeno je da se najveći deo ekstrahovanih supstanci nalazi u prvih 500  $\mu\text{L}$  eluata. Značajna količina supstanci je prisutna u drugim 500  $\mu\text{L}$ , dok u trećoj porciji eluata nema zaostalih supstanci. Iz navedenih razloga analizirane supstance su kvantitativno eluirane sa SPE kertridža ukupnom zapreminom od 1 mL. Dobijeni eluati su direktno preneti u viala za LC-MS/MS i analizirani. Efikasnost procesa ekstrakcije je procenjena na osnovu Recovery vrednosti. Primenjenom SPE metodom dobijeni su sledeći rezultati: 57,75 % (AT), 69,48 % (oOH-AT), 64,26 % (pOH-AT) i 75,07 % (AT-L).

#### 4.2.2. Rezultati optimizacije LC-MS/MS metode

LC-MS/MS eksperimenti su rađeni na kolonama dužine 250 mm, 150 mm i 100 mm. Cilj eksperimenata je bio da se postigne dobro razdvajanje oOH-AT i pOH-AT u što kraćem vremenu. Izabrana je kolona Zorbax Eclipse C18 Analytical, 4,6 x 100 mm (veličina čestica 3,5  $\mu\text{m}$ ) na kojoj je postignuto zadovoljavajuće razdvajanje, uz kraće vreme trajanja analize.

Za izvođenje LC-MS/MS metode primenjeni su uslovi dobijeni optimizacijom HPLC metode (61,93 % acetonitrila u mobilnoj fazi, temperatura kolone 31,44 °C) (4.1.2). Da bi se povećala efikasnost metode i skratilo vreme analize, izvedena su preliminarna istraživanja u okviru kojih je menjan odnos komponenata u mobilnoj fazi. Zaključeno je



da se pri udelu acetonitrila od 61,93 % eluiraju polarnije komponente, tj. oOH-AT, pOH-AT i IS. Da bi se ubrzalo eluiranje lipofilnijih komponenti (AT i AT-L), nakon 5 minuta analize povećan je udeo acetonitrila na 80 %. Izabranim gradijentom (Tabela 21) je postignuto dobro razdvajanje i skraćeno vreme trajanja analize na 8 minuta. U vreme trajanja analize uključeno je i vreme potrebno da se odnos mobilnih faza i pritisak u sistemu vrate na početne uslove.

**Tabela 21.** Odnos mobilne faze A i mobilne faze B (v:v) korišćen za razdvajanje analiziranih komponenti

t	% A	% B
0	65	35
4	65	35
4,5	80	20
7	80	20
7,05	65	35
8	65	35

Retenciona vremena ispitivanih jedinjenja su: 2,65 min (pOH-AT), 3,97 min (oOH-AT), 4,48 min (AT) i 6,25 min (AT-L). U cilju ispitivanja optimalnih eksperimentalnih uslova korišćen je različit protok mobilne faze: 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  i 400  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Izvedeni eksperimenti su pokazali da pri nižem protoku mobilne faze vreme analize se produžava, pa je za dalji rad izabran protok 400  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Eksperimenti su izvođeni na temperaturi kolone koja je podešena na sobnu (25 °C) jer je vreme trajanja analize kratko (manje od 10 min), a time i zadržavanje analita na koloni (temperatura kolone neće uticati na njihovu stabilnost). Za rad je korišćen autosampler koji je termostatiran na 4 °C. Pod ovakvim uslovima uzorci su stabilni nekoliko sati.

### 4.2.3. Izvođenje MS/MS analize

Za analizu atorvastatina i metabolita izabrana je elektrosprej jonizacija (ESI) u pozitivnom modu. ESI metoda pripada tzv. „*soft*“ metodama koje karakteriše blaga

jonizacija kojom nastaju uglavnom molekularni joni. Ova metoda se lako povezuje sa HPLC sistemom, funkcioniše pri nižim protocima i najbolja je za analizu većine polarnih i umereno polarnih jedinjenja. ESI može raditi i u pozitivnom i u negativnom modu, a izbor moda zavisi od hemijske strukture analiziranih jedinjenja. Jedinjenja koja sadrže samo kisele grupe se moraju analizirati u negativnom modu, dok se jedinjenja koja sadrže samo bazne grupe (npr. amine) analiziraju isključivo u pozitivnom modu. Hemijske strukture koje sadrže i kisele grupe (npr.  $-\text{COOH}$  ili fenole) i bazne (funktionalne grupe sa azotom) mogu se analizirati i u pozitivnom i u negativnom modu. Atorvastatin, praćeni metaboliti i izabrani interni standard se mogu analizirati u oba moda. Pretraživanjem literature zaključeno je da je negativni mod retko izbor za analizu atorvastatina u biološkom materijalu (122). Sva analizirana jedinjenja (uključujući i interni standard - rosuvastatin) imaju po dva (rosuvastatin tri) azota u strukturi čime je olakšano protonovanje ovih položaja. Probnim eksperimentima je potvrđeno da se postiže veća osetljivost radom u pozitivnom modu što su potvrdili i drugi autori (117, 120). Obzirom da je ESI blaga jonizaciona tehnika dominantan prekursorski jon koji nastaje je  $[\text{M}+\text{H}]^+$  tj. protonovani molekularni jon.

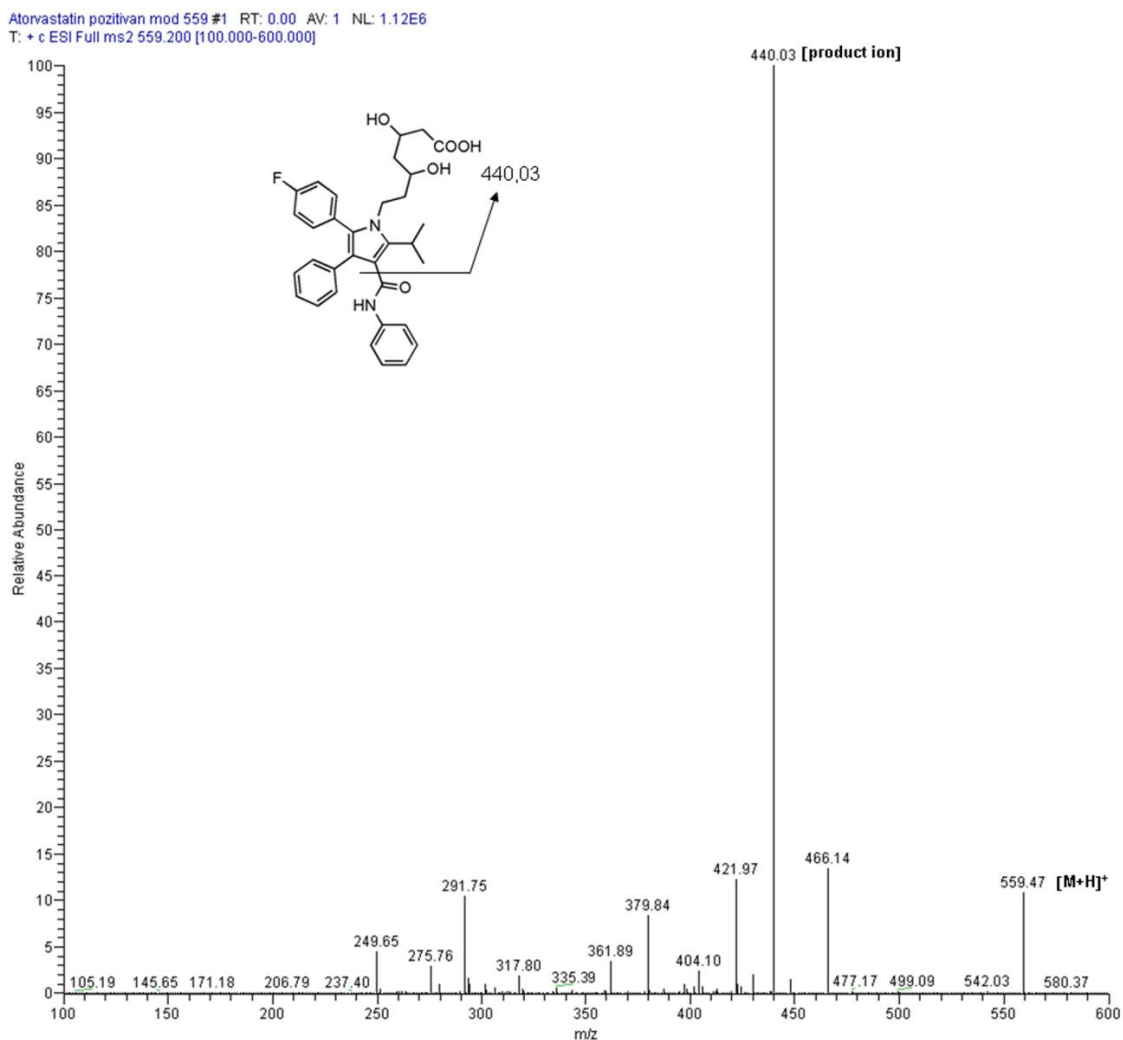
Detekcija je izvršena praćenjem izabranih reakcija tj. SRM (*Selected Reaction Monitoring*) tehnikom. *Selected Reaction Monitoring* tehnika se postiže primenom trostrukog kvadropola. Prvi kvadropol (Q1) je podešen da propušta prekursorski jon, drugi (Q2) se koristi kao kolizijska ćelija koja izvodi fragmentaciju izabranog jona dok treći kvadropol služi za propuštanje odabranog produkta jona. Prednost SRM tehnike je velika specifičnost pa se ova metoda najčešće koristi za kvantifikovanje više analita u kompleksnim mešavina.

Za optimizaciju MS uslova korišćen je rastvor svake od analiziranih komponenti i internog standarda koncentracije 50 ng/mL (3.1.3.). Pripremljeni rastvor se injektuje direktno u izvor jona pomoću 'T dela'. Uređaj sam optimizuje uslove kao što su: napon u detektoru, temperatura izvora, temperatura kapilare, pritisak azota. Temperatura i parametri gasa u izvoru su optimizovani od strane analitičara sa ciljem da se poveća osetljivost metode za određivanje pOT-AT koji je prisutan u najnižoj koncentraciji u plazmi. Mogući putevi fragmentacije AT i IS su prikazani na Slikama 20. i 21. (na slici

su obeleženi fragmenti koji su praćeni). Pretpostavljena struktura fragmenata oOH-AT, pOH-AT i ATO-L su prikazani na Slici 23.

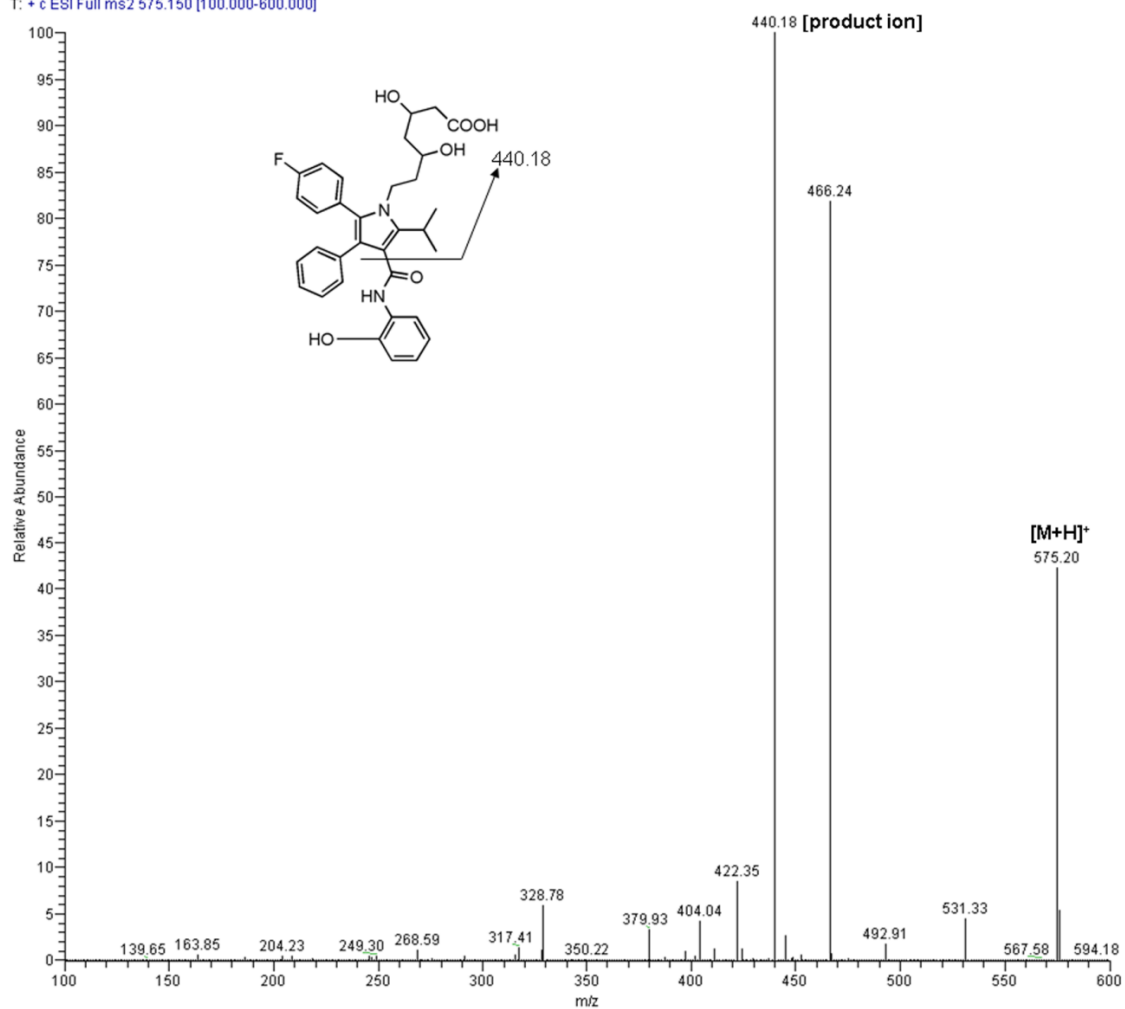
Rezultati optimizacije pokazuju da se fragmentacija oOH-AT i pOH-AT odvija na isti način, tj. oba metabolita daju iste fragmente zbog čega bi moglo doći do „preklapanja“ signala. Da bi se izbeglo „preklapanje“ neophodno je da oOH-AT i pOH-AT budu hromatografski dobro razdvojeni.

ESI+ maseni spektri produkt jona AT, metabolita i IS su prikazani na Slikama 45-49.



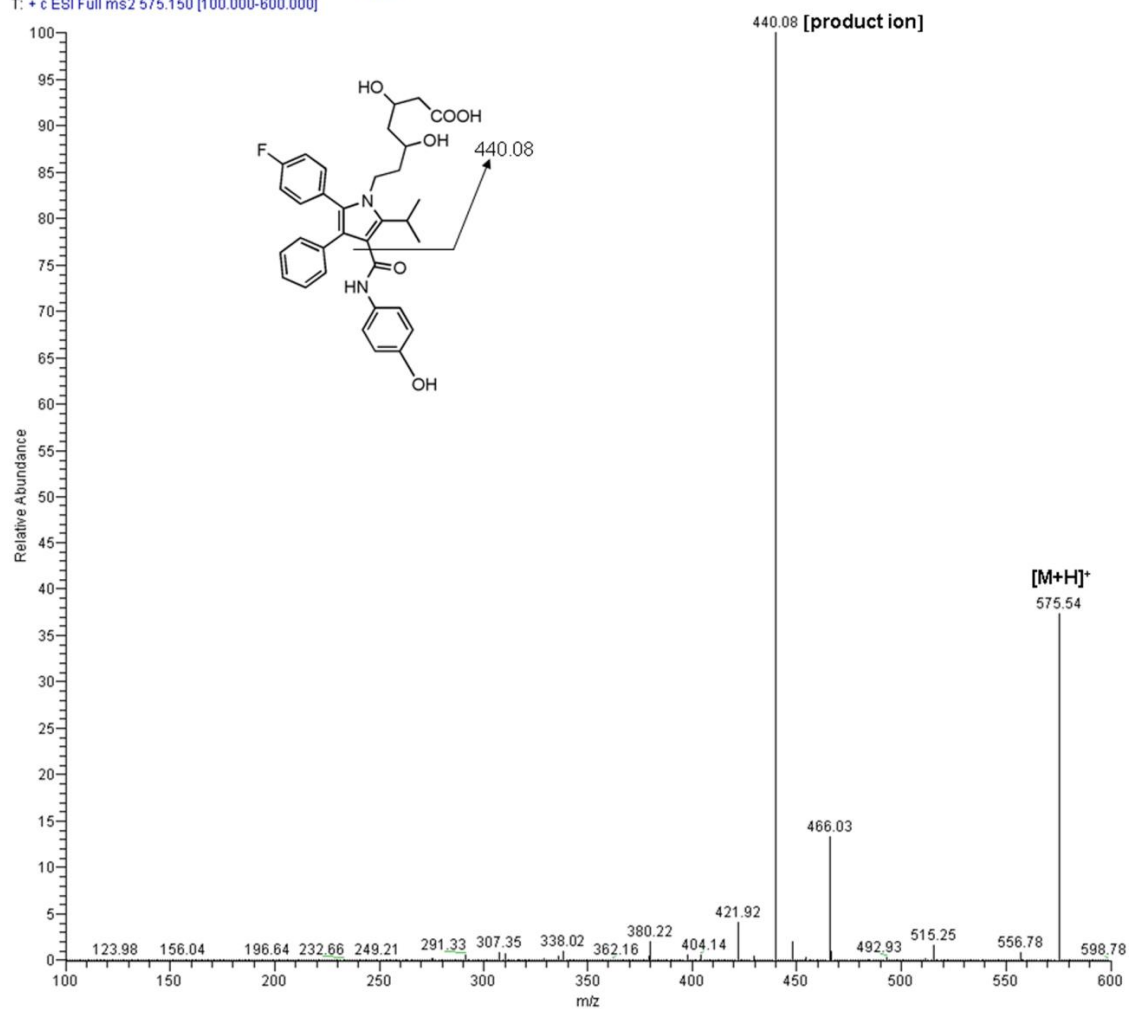
Slika 45. ESI+ maseni spektar produkt jona atorvastatina

OOHAT pozitivan mod 575 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.33E4  
T: + c ESI Full ms2 575.150 [100.000-600.000]



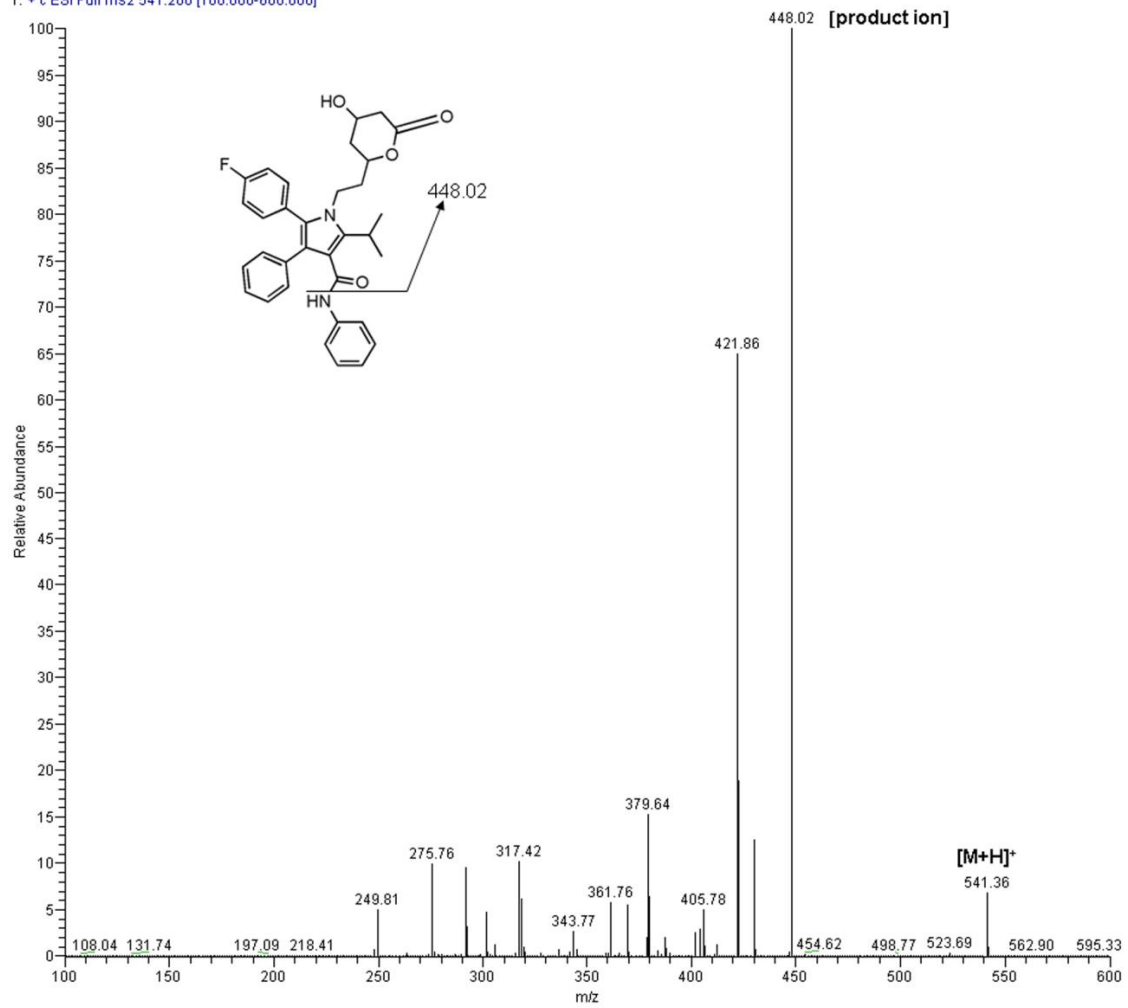
Slika 46. ESI+ maseni spektar produkt jona *orto*-hidroksiatorvastatina

POHAT pozitivan mod 575 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 2.35E5  
T: + c ESI Full ms2 575.150 [100.000-600.000]



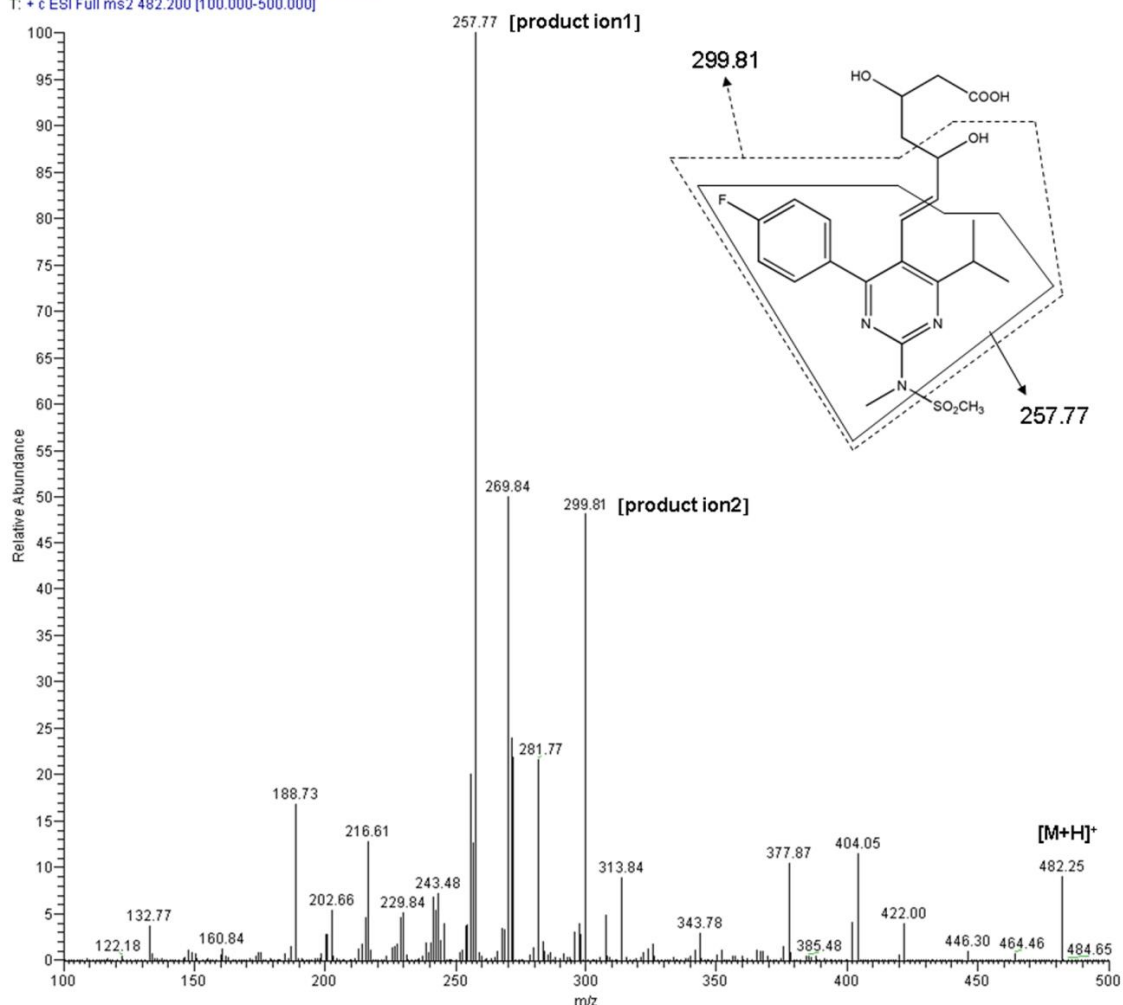
Slika 47. ESI+ maseni spektar produkt jona *para*-hidroksiatorvastatina

LAKTON pozitivan mod 541 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 7.17E5  
T: + c ESI Full ms2 541.200 [100.000-600.000]



Slika 48. ESI+ maseni spektar produkt jona atorvastatin-laktona

ISS pozitivan mod 482 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 8.12E5  
T: + c ESI Full ms2 482.200 [100.000-500.000]



Slika 49. ESI+ maseni spektar produkt jona rosvastatina

Masena detekcija je izvršena na četiri zasebna kanala pri čemu je svaki kanal odgovarao izabranom SRM prelazu ( $m/z$ , Q1  $\rightarrow$  Q3, energija kolizije). *Orto*-hidroksi i *para*-hidroksiatorvastatin se prate na istom kanalu ( $m/z$ , 574,86  $\rightarrow$  439,65; 20 eV). Ova promena  $m/z$  odnosa odgovara gubitku 2-hidroksifenilkarbamoil odnosno 4-hidroksifenilkarbamoil grupe sa položaja 3 pirola. Na drugom kanalu se prati atorvastatin ( $m/z$ , 558,9  $\rightarrow$  439,52; 22 eV) tj. fragment koji nastaje gubitkom fenilkarbamoil grupe sa položaja 3 pirola. Atorvastatin-laktone ( $m/z$ , 540,8  $\rightarrow$  447,6; 19 eV) podleže hidrolizi laktone tj. nastali fragment ne sadrži fenilamino grupu. Kod IS se beleži signal kojim nastaju dva definisana fragmenta ( $m/z$ , 481,75  $\rightarrow$  257,73; 31 eV i 299,74; 35 eV) što odgovara odvajanju metilsulfonil grupe (kod oba fragmenta) i niza od 4, odnosno 6 C atoma sa položaja 5 pirimidina.

#### 4.2.4. Validacija LC-MS/MS metode

Optimizovana SPE-LC-MS/MS metoda je validirana prema vodičima Evropske agencije za lekove (*European Medicines Agency*, EMEA) (138) i Američke agencije za hranu i lekove (*Food and Drug Administration*, FDA) (139). Osnovni parametri validacije bioanalitičkih metoda prema FDA vodiču su: selektivnost, kalibraciona kriva, donji limit kvantifikacije (*lower limit of quantification*, LLOQ), tačnost, preciznost, stabilnost i *Recovery*. Pored ovih, EMEA kao parametre validacije propisuje i: kontaminaciju tekućeg uzorka uzorkom koji mu je prethodio (*carry over*), integritet pri razblaživanju, uticaj matriksa i stabilnost. Poslednja tri parametra FDA navodi kao ispitivanja koja bi trebalo izvršiti tokom validacije bez konkretnih kriterijuma za prihvatanje ili odbijanje. Kvantifikacija je izvršena na osnovu odnosa površine pika analiziranog jedinjenja i površine pika internog standarda.

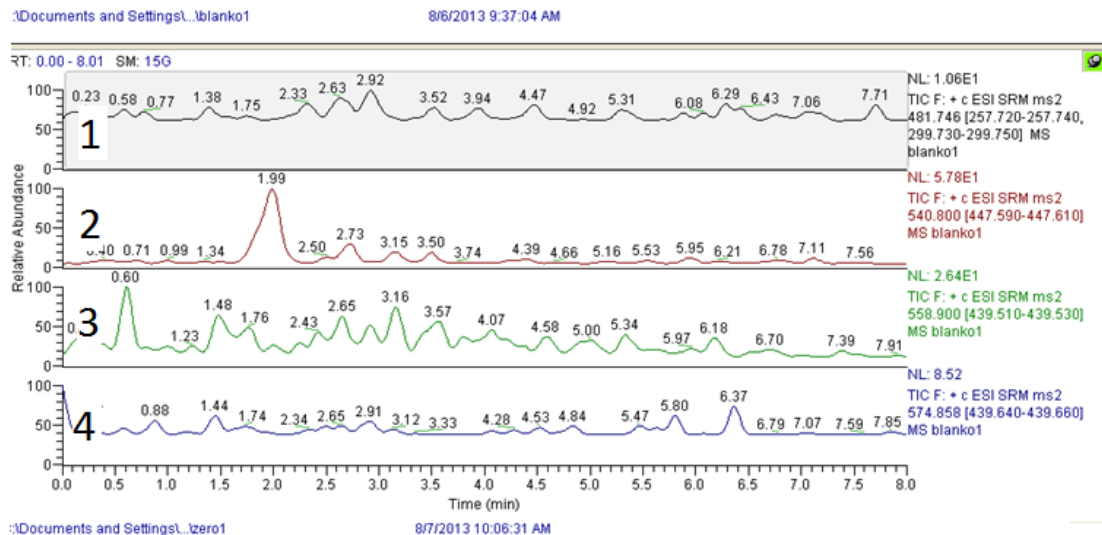
##### 4.2.4.1. Selektivnost

Selektivnost metode je procenjena poređenjem hromatograma šest zasebnih uzoraka plazme dobijenih od šest eksperimentalnih životinja koje nisu bile na terapiji (blanko uzorak) sa hromatogramom uzorka (LLOQ rastvor) u kom su koncentracije analiziranih jedinjenja najmanje koje se mogu kvantifikovati. Uzorci plazme životinja koje nisu bile na terapiji se pripremaju na isti način kao i uzorci plazme životinja na terapiji. Na dobijenim hromatogramima se prate potencijalne interferencije analiziranih jedinjenja i supstanci normalno prisutnih u plazmi. Površine koje eventualno postoje na retencionim vremenima koja odgovaraju AT, metabolitima i IS u blanko uzorku mogu biti maksimalno 20 % od površina istih jedinjenja u LLOQ rastvoru.

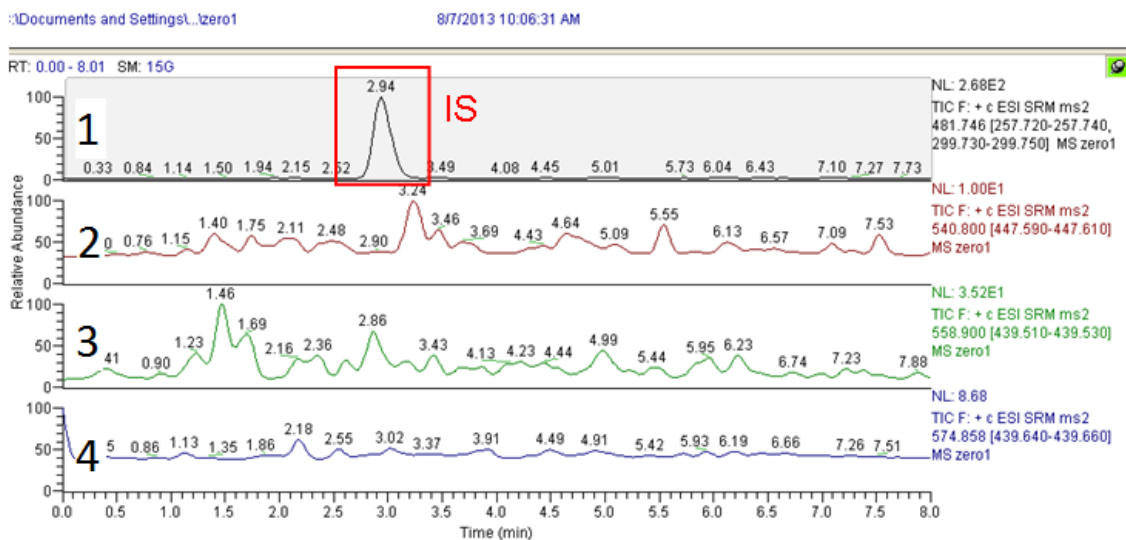
Na hromatogramu blanko uzorka (Sl. 50) nisu uočeni interferirajući pikovi na retencionim vremenima koja odgovaraju analiziranim jedinjenjima (2,65 min (pOH-AT), 3,97 min (oOH-AT), 4,48 min (AT) i 6,25 min (AT-L)), te se može zaključiti da je predložena LC-MS/MS metoda selektivna. Na Slici 51. je prikazan hromatogram 'nultog' ('zero') uzorka koji sadrži samo interni standard, bez analita. Na ovom



hromatogramu se, također, ne uočavaju nikakve interferencije na retencionim vremenima i kanalima koji odgovaraju atorvastatinu i ispitivanim metabolitima.



**Slika 50.** LC-MS/MS hromatogram blanko uzorka plazme (brojevima su obeleženi kanali koji odgovaraju: 1 – IS, 2 – AT-L, 3 – AT, 4 – oOH-AT i pOH-AT)



**Slika 51.** LC-MS/MS hromatogram 'nultog' uzorka plazme (brojevima su obeleženi kanali koji odgovaraju: 1 – IS, 2 – AT-L, 3 – AT, 4 – oOH-AT i pOH-AT)

#### 4.2.4.2. Linearnost

Za ispitivanje linearnosti metode konstruiše se kalibraciona kriva koja predstavlja zavisnost odnosa površine pika ispitivanog jedinjenja i površine pika internog standarda, i poznate koncentracije analita. Standardni rastvori za konstrukciju kalibracione krive se prave u istom biološkom matriksu kao i uzorci za koje je metoda namenjena tako što se matriks optereti poznatom koncentracijom analita i internog standarda. Metoda se smatra linearnom ako koncentracije izračunate na osnovu dobijenih odgovora kalibracionih standarda odstupaju maksimalno  $\pm 15\%$  od nominalne koncentracije standarda (osim u LLOQ gde je dozvoljeno odstupanje  $\pm 20\%$ ). Najmanje 75 % kalibracionih standarda mora ispunjavati ovaj zahtev. Rastvori za procenu linearnosti metode pripremljeni su prema propisu datom u poglavlju 3.1.3. Opseg koncentracija, kao i parametri značajni za procenu linearnosti metode prikazani su u Tabeli 22.

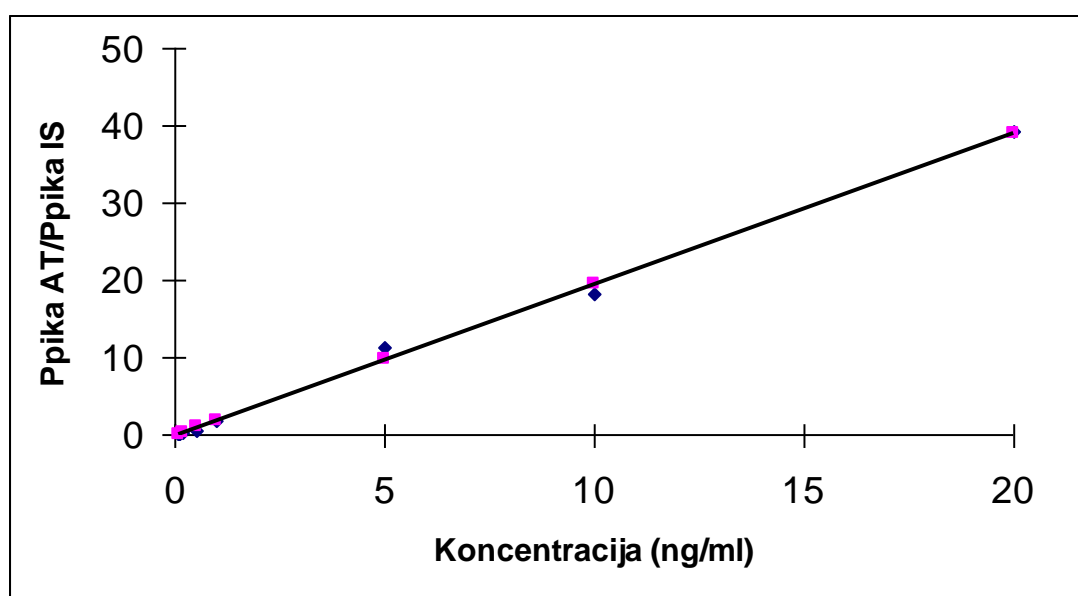
**Tabela 22.** Rezultati regresione analize za atorvastatin i praćene metabolite

Parametar	Atorvastatin	<i>o</i> -hidroksi atorvastatin	<i>p</i> -hidroksi atorvastatin	Atorvastatin-lakton
<b>Opseg koncentracija (ng / mL)</b>	0,1 - 20	0,5 - 20	0,5 - 20	0,1 - 20
<b><math>y = ax + b</math></b>	$y = 1,9478x - 0,0670$	$y = 0,3545x - 0,2443$	$y = 0,2380x - 0,1998$	$y = 1,6274x - 0,1257$
<b><math>r^*</math></b>	0,9982	0,9963	0,9978	0,9993
<b><math>t_b^{**}</math></b>	0,15	1,87	1,75	0,53
* - koeficijent korelacije				
** - izračunata vrednost devijacije za odsečak				
$t_{\text{tab}(0.05, 5)} = 2,571$				
$t_{\text{tab}(0.05, 4)} = 2,447$				

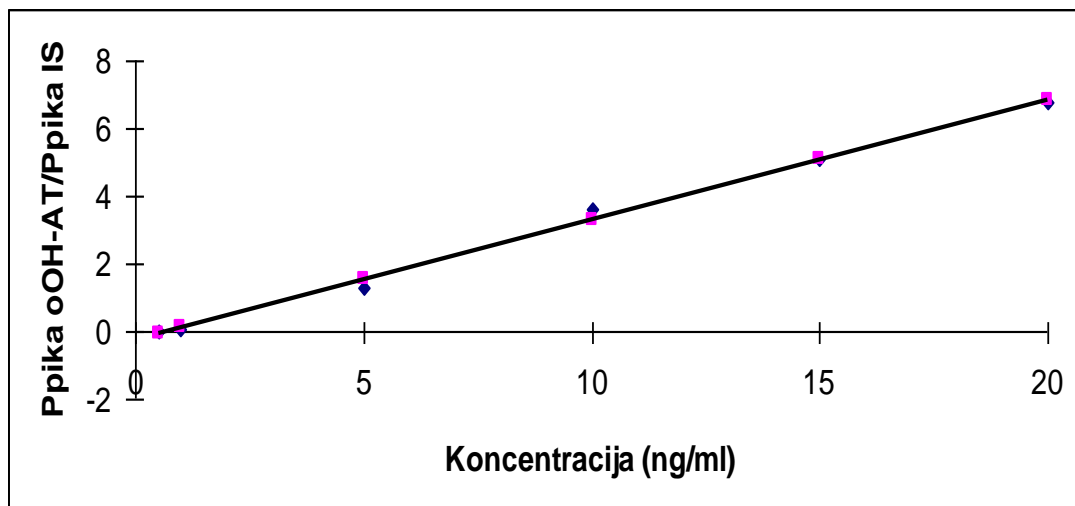
Bioanalitičke metode koje obuhvataju velik opseg koncentracija (najveća koncentracija je veća više od deset puta od najmanje) često karakteriše heteroskedastičnost tj.

heterogenost varijansi (160). Kod velikog opsega koncentracija prisutne su veće devijacije koje mogu uticati na regresionu jednačinu. Kao rezultat može se javiti manja tačnost metode u delu kalibracione krive koja odgovara nižim koncentracijama. Jedan od načina da se izbegne heterogenost varijanse je primena 'weighted' linearne regresije. U literaturi su opisane metode koje primenjuju *weighting* faktore (117-120), ali postoje opisane i metode u kojima ovi faktori nisu primenjeni (121, 122). U radu je izvršena provera regresione analize primenom programa PASW® Statistic. Urađena je linearna regresija sa *weighting* faktorima  $1/x^2$ ,  $1/x$ ,  $x^0$ ,  $x$ ,  $x^2$ , gde je  $x$  koncentracija ispitivanog jedinjenja. Rezultati su pokazali da je metoda linearna u ispitivanom opsegu koncentracija i bez primene *weighting* faktora ( $x^0 = 1$ ). Dobijeni koeficijenti linearnosti za sva ispitivana jedinjenja su veći od 0,9950. Primenom Studentovog t-testa izvršena je analiza značajnosti odsečka na y – osi. Izračunate vrednosti devijacije za odsečak ( $t_b$  u Tabeli 22.) su manje od tabelarnih t vrednosti ( $t_{tab(0.05, 5)}$  za atorvastatin i AT-L gde je kalibraciona kriva konstruisana sa 7 koncentracija,  $t_{tab(0.05, 4)}$  za oOH-AT i pOH-AT gde je kalibraciona kriva konstruisana sa 6 koncentracija) pa je zaključeno da odsecci na y – osi nisu statistički značajno različiti od nule.

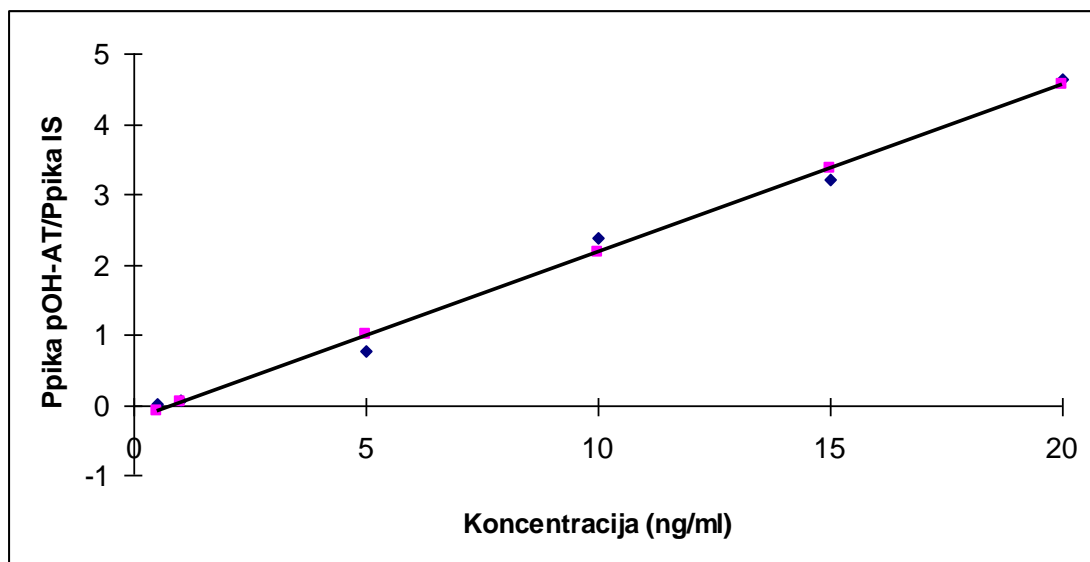
Kalibracione krive atorvastatina i metabolita su prikazane na Slikama 52., 53., 54. i 55.



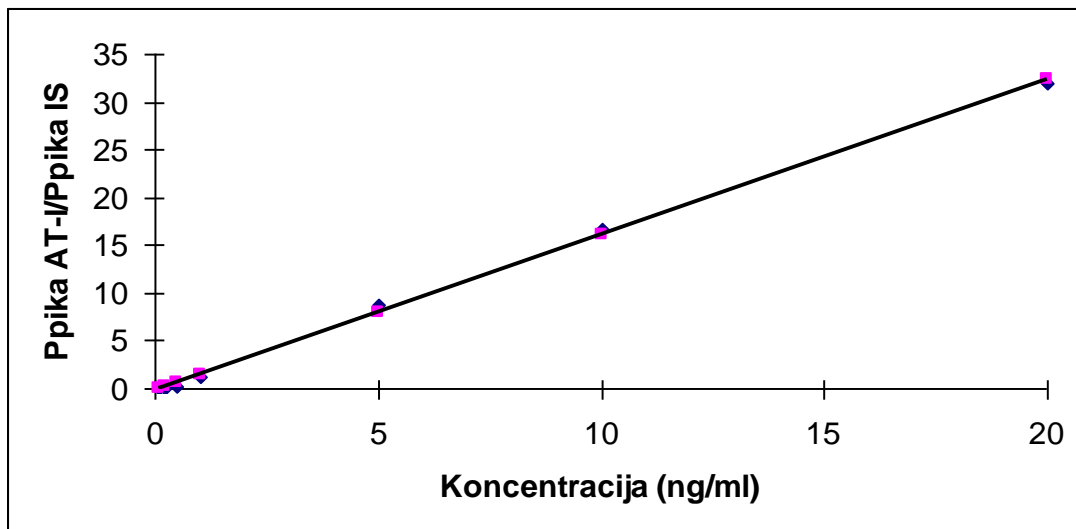
Slika 52. Kalibraciona kriva atorvastatina



Slika 53. Kalibraciona kriva *orto*-hidroksiatorvastatina



Slika 54. Kalibraciona kriva *para*-hidroksiatorvastatina



Slika 55. Kalibraciona kriva atorvastatin-laktona

#### 4.2.4.3. Preciznost

Preciznost analitičke metode predstavlja stepen rasipanja pojedinačnih rezultata dobijenih iz više paralelnih određivanja iz homogenih uzoraka. Preciznost se ispituje sa rastvorima 4 različite koncentracije u očekivanom opsegu koncentracija (rastvori standarda za proveru kvaliteta metode, *Quality Control Samples*, QC), a izražava se kao koeficijent varijacije, odnosno relativna standardna devijacija (RSD). RSD ne sme biti veća od 15 % za svaku QC koncentraciju, odnosno 20 % za LLOQ. Prema FDA, preciznost se određuje kao preciznost u okviru jedne analize (ponovljivost) i preciznost između analiza (meri se preciznost kroz vreme, i uključuje više analitičara, instrumenata, reagenasa i laboratorija). Prema EMEA, ispituje se preciznost u okviru jedne analize i preciznost između analiza kao najmanje 3 ponavljanja analiza u najmanje dva različita dana.

Rastvori standarda za procenu kvaliteta su pripremljeni u sledećim koncentracijama: 0,1; 0,3; 10 i 15 ng/mL (atorvastatin i atorvastatin-lakton) odnosno 0,5; 1; 10 i 15 ng/mL (*orto*-hidroksiatorvastatin i *para*-hidroksiatorvastatin), prema propisu datom u poglavlju 3.1.3. Dobijeni statistički parametri su prikazani u Tabeli 23.

**Tabela 23.** Rezultati ispitivanja preciznosti atorvastatina i metabolita

Analit	Nominalna koncentracija (ng/mL)	U okviru jedne analize (n=5)		Između analiza (n=3)	
		Nađena koncentracija	%RSD	Nađena koncentracija	%RSD
		( $\bar{x}_{sr} \pm SD$ ; ng/mL)		( $\bar{x}_{sr} \pm SD$ ; ng/mL)	
Atorvastatin	0,1	0,09±0,01	14,50	0,10±0,01	11,49
	0,3	0,27±0,02	9,69	0,27±0,03	14,56
	10	11,46±1,86	14,34	11,35±1,35	12,83
	15	16,57±1,32	7,56	16,20±2,01	9,57
Atorvastatin lakton	0,1	0,12±0,01	11,25	0,11±0,01	11,13
	0,3	0,28±0,04	14,29	0,27±0,03	11,11
	10	11,58±1,08	9,33	11,46±1,37	9,89
	15	16,77±0,08	0,48	16,35±1,42	8,68
<i>p</i> -hidroksi atorvastatin	0,5	0,58±0,01	1,19	0,59±0,05	8,47
	1	1,06±0,10	8,75	1,06±0,09	8,49
	10	9,57±0,01	0,12	9,62±0,87	9,04
	15	14,67±0,46	3,71	15,33±1,43	9,33
<i>o</i> -hidroksi atorvastatin	0,5	0,57±0,01	1,03	0,57±0,01	1,75
	1	0,87±0,10	11,47	0,92±0,03	3,26
	10	8,75±0,88	10,02	11,23±1,34	11,93
	15	15,65±2,55	14,88	15,28±1,73	11,32

Statističkom obradom eksperimentalno dobijenih podataka izračunate su vrednosti RSD koje su za sva ispitivana jedinjenja (u oblasti koncentracija QC rastvora) bile manje od 15 % čime je potvrđena zadovoljavajuća preciznost predložene metode.

#### 4.2.4.4. Tačnost

Tačnost analitičke metode predstavlja odnos srednje koncentracije analita izračunate primenom metode i stvarne (nominalne) koncentracije. Izražava se u procentima u odnosu na nominalnu vrednost i predstavlja sistematsku grešku ili *bias*.

**Tabela 24.** Rezultati ispitivanja tačnosti atorvastatina i praćenih metabolita

Analit	Nominalna koncentracija (ng/mL)	U okviru jedne analize (n=5)		Između analiza (n=3)	
		Određena koncentracija	Accuracy (%)	Određena koncentracija	Accuracy (%)
		( $\bar{x}_{sr} \pm SD$ ; ng/mL)		( $\bar{x}_{sr} \pm SD$ ; ng/mL)	
Atorvastatin	0,1	0,09±0,01	90,58	0,10±0,01	104,30
	0,3	0,27±0,02	89,27	0,27±0,03	89,66
	10	11,46±1,86	114,63	11,35±1,35	113,46
	15	16,57±1,32	110,45	16,20±2,01	108,01
Atorvastatin lakton	0,1	0,12±0,01	117,99	0,11±0,01	111,66
	0,3	0,28±0,04	93,31	0,27±0,03	90,79
	10	11,58±1,08	114,77	11,46±1,37	114,59
	15	16,77±0,08	111,78	16,35±1,42	109,00
<i>p</i> -hidroksi atorvastatin	0,5	0,58±0,01	116,00	0,59±0,05	117,00
	1	1,06±0,10	105,62	1,06±0,09	106,20
	10	9,57±0,01	95,71	9,62±0,87	96,19
	15	14,67±0,46	97,79	15,33±1,43	102,20
<i>o</i> -hidroksi atorvastatin	0,5	0,57±0,01	114,01	0,57±0,01	115,11
	1	0,87±0,10	86,56	0,92±0,03	91,83
	10	8,75±0,88	87,52	11,23±1,34	112,32
	15	15,65±2,55	104,36	15,28±1,73	101,86

Tačnost se ispituje sa rastvorima iste koncentracije kao i preciznost. Analizira se po 5 uzoraka rastvora u svakoj koncentraciji. Dobijena srednja vrednost može da odstupa najviše 15 % od stvarne vrednosti koncentracija QC rastvora, odnosno 20 % od vrednosti koncentracije LLOQ rastvora. Odstupanje srednje vrednosti predstavlja tačnost metode. Prema EMEA, tačnost se ispituje u dva nivoa: tačnost u okviru jedne analize ('*within run*' tačnost) i tačnost između analiza ('*between run*' tačnost).

Dobijeni statistički parametri procene tačnosti su prikazani u Tabeli 24.

Statističkom obradom eksperimentalno dobijenih podataka izračunate su Recovery vrednosti. Dobijene srednje vrednosti su odstupale manje od 15 % od stvarne vrednosti koncentracija QC rastvora, odnosno 20 % od koncentracije koja odgovara LLOQ čime je potvrđena zadovoljavajuća tačnost validirane metode.

#### **4.2.4.5. Stabilnost**

Ispitivanje stabilnosti ima za cilj da utvrdi da li koncentracija analita u trenutku analiziranja odgovara koncentraciji u trenutku ekstrahovanja iz biološkog matriksa. Stabilnost leka u biološkom materijalu zavisi od uslova čuvanja, hemijskih osobina leka, matriksa i kontejnera u kome se uzorak čuva. Pri ispitivanju stabilnosti postavljaju se uslovi koji se očekuju pri rukovanju i analizi realnih uzoraka. Stabilnost se ispituje u dve QC koncentracije (QC2 i QC4, poglavlje 3.1.3.) i izračunava poređenjem dobijene koncentracije analita nakon predviđenog vremena stajanja i stvarne (nominalne) koncentracije. Stabilnost se izražava u procentima. Relevantna regulatorna tela preporučuju ispitivanje stabilnosti u nekoliko nivoa.

**Stabilnost pri ponovljenom zamrzavanju i topljenju (*Freeze and thaw stability*)** se ispituje tako što se uzorak čuva 24 sata na temperaturi predviđenoj za čuvanje uzoraka (-80 °C), a potom se topi stajanjem na ledu (približno 4 °C). Pošto se potpuno istopi, uzorak se ponovo zamrzava na 12 do 24 sata pod istim uslovima. Postupak se ponavlja još 2 puta i nakon trećeg ciklusa vrši se analiza.



**Kratkoročna temperaturna stabilnost (*Bench-top stability*)** se izvodi tako što se uzorci otope stajanjem na ledu i ostave da stoje na temperaturi leda 8 sati. Nakon toga se analiziraju.

**Dugoročna temperaturna stabilnost (*Long-term stability*)** se ispituje na uzorcima koji se čuvaju 1 mesec na -80 °C. Nakon stajanja, uzorci se analiziraju a rezultati porede sa koncentracijama standarda koje su dobijene prvog dana ispitivanja.

**Stabilnost u *autosampler-u* (*Autosampler stability*)** je stabilnost pripremljenih uzoraka koji se čuvaju u *autosampler-u* u kom je temperatura podešena na 4 °C tokom 24 h. Nakon isteka vremena, uzorci se ponovo analiziraju i dobijeni odgovori se porede.

Rezultati procene stabilnosti prikazani su u Tabeli 25.

**Tabela 25.** Rezultati ispitivanja stabilnosti atorvastatina i praćenih metabolita

Analit		Recovery (%)							
		AT		AT-L		oOH-AT		pOH-AT	
Nominalna koncentracija (ng/mL)		0,3	15	0,3	15	1	15	1	15
Kratkoročna stabilnost		94,91	98,93	92,42	98,93	103,80	99,36	102,42	100,20
Stabilnost pri ponovljenom zamrzavanju i topljenju	nakon I ciklusa	100,20	100,20	102,41	101,25	102,77	101,88	99,76	98,38
	nakon II ciklusa	95,53	101,76	93,16	99,61	99,93	106,74	101,39	102,76
	nakon III ciklusa	95,28	100,86	93,24	94,31	102,31	104,44	99,90	101,37
Dugoročna stabilnost		96,51	100,69	102,88	95,23	102,16	103,49	101,21	102,71

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su atorvastatin, *o*-hidroksiatorvastatin, *p*-hidroksiatorvastatin i atorvastatin-lakton stabilni u plazmi pri svim ispitivanim uslovima.

#### 4.2.4.6. Efikasnost postupka čvrsto-tečne ekstrakcije (Recovery)

Postupak validacije bioanalitičkih metoda ne zahteva da efikasnost postupka ekstrakcije (*Recovery*) analita bude 100 % već je važno da rezultati ekstrakcije budu stalni, precizni i reproduktivni. Efikasnost ekstrakcije je procenjena sa tri rastvora različite koncentracije (QC2, QC3 i QC4). Za svaku koncentraciju pravi se po 5 rastvora prema propisu opisanom u poglavlju 3.1.3. (Tabele 5. i 6.). Pripremljeni rastvori se ekstrahuju SPE metodom opisanom u poglavlju 4.2.1. i analiziraju na LC-MS/MS uređaju. Posebno se pripremaju uzorci blanko plazme kojima se dodaje puffer (500 µL blanko plazme + 500 µL 100 mM NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO, pH 4,6). Ovi uzorci se ekstrahuju istom SPE metodom i nakon ekstrakcije, dodaju im se rastvori standarda da bi dobijena koncentracija bila ista kao u QC2, QC3 i QC4 rastvorima.

**Tabela 26.** Apsolutne Recovery vrednosti atorvastatina i praćenih metabolita nakon čvrsto-tečne ekstrakcije rastvorom acetonitril:100 mM NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO pH 4,6 (95:5, v/v)

Analit	Koncentracija (ng/mL)	Recovery (%)
Atorvastatin	0,3	65,26
	10	57,75
	15	64,98
Atorvastatin lakton	0,3	72,65
	10	75,07
	15	77,65
<i>o</i> -hidroksiatorvastatin	1	68,59
	10	69,48
	15	71,25
<i>p</i> -hidroksiatorvastatin	1	63,98
	10	64,26
	15	66,54

Recovery vrednost se dobija poređenjem signala atorvastatina i metabolita u uzorcima blanko plazme opterećene rastvorima standarda pre i posle ekstrakcije. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da li efikasnost postupka ekstrakcije zavisi od koncentracije kao i da li priroda biološkog materijala pokazuje značajan uticaj na Recovery vrednosti analita. Često je potrebno "žrtvovati" visoke Recovery vrednosti radi postizanja dobre selektivnosti.

Efikasnost postupka čvrsto-tečne ekstrakcije prikazana je u Tabeli 26.

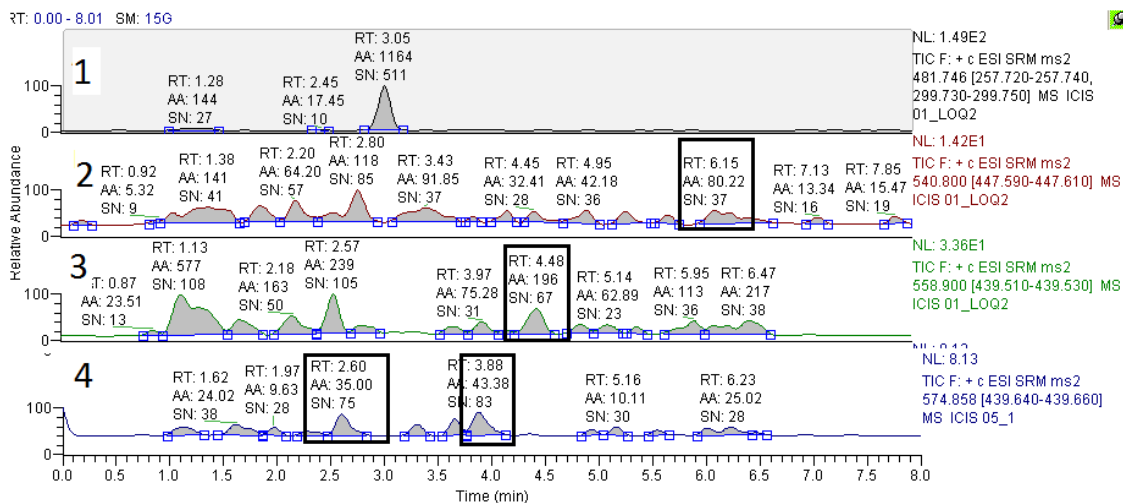
Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da efikasnost postupka čvrsto-tečne ekstrakcije ne zavisi od koncentracije i da je zadovoljavajuća za dalji eksperimentalni rad.

#### **4.2.4.7. Donji limit kvantifikacije (LLOQ) i limit detekcije (LOD)**

Donji limit kvantifikacije (LLOQ) je najniža tačka na kalibracionoj krivi, pri čemu koncentracija izračunata na osnovu dobijenog odgovora u ovoj tački mora biti sa preciznošću  $KV \leq 20 \%$  i tačnošću od 80 - 120 % u odnosu na nominalnu vrednost. Odgovor analita u LLOQ treba da bude najmanje 5 puta veći od odgovora blanko uzorka. LLOQ se postavlja u skladu sa konkretnim potrebama analize.

Limit detekcije (LOD) je najmanja koncentracija analita u uzorku koja se može detektovati, ali ne i kvantifikovati. Odgovor analita u LOD treba da bude najmanje 3 puta veći od odgovora blanko uzorka.

Validacija optimizovane LC-MS/MS metode za određivanje sadržaja AT i AT-L je urađena u opsegu 0,1 do 20 ng/mL tj. eksperimentalno dobijena LLOQ vrednost je 0,1 ng/mL za AT i AT-L. Metoda je validirana za određivanje sadržaja hidroksi-metabolita, oOH-AT i pOH-AT u opsegu koncentracija 0,3 do 20 ng/mL, tj. eksperimentalno dobijena LLOQ vrednost je 0,3 ng/mL. LC-MS/MS hromatogram LLOQ uzorka je prikazan na Slici 56.



**Slika 56.** LC-MS/MS hromatogram LLOQ uzorka (brojevima su obeleženi kanali koji odgovaraju: 1 – IS, 2 – AT-L, 3 – AT, 4 – oOH-AT i pOH-AT)

Donji limit detekcije je određen eksperimentalno, poređenjem rezultata dobijenih iz uzorka čiji je odgovor oko tri puta veći od šuma blanko uzorka. Dobijene LOD vrednosti su 0,05 ng/mL za AT i AT-L i 0,1 i 0,13 ng/mL za oOH-AT i pOH-AT.

#### 4.2.5. Primena validirane LC-MS/MS metode

Validirana SPE-LC-MS/MS metoda je korišćena za određivanje sadržaja atorvastatina, aktivnih i neaktivnih metabolita u uzorcima plazme životinja kao i za praćenje promene koncentracije metabolita u plazmi u uslovima kada životinje, pored atorvastatina unose i ekstrakt lista artičoke. Na ovaj način je moguće proceniti uticaj ekstrakta lista artičoke na metabolizam atorvastatina kao i interakcije koje se eventualno javljaju.

Poznato je da atorvastatin intenzivno metaboliše u jetri, dejstvom CYP3A4 enzima koji učestvuje u metabolizmu mnogih lekova (161). Zbog toga su moguće interakcije atorvastatina sa velikim brojem farmaceutski aktivnih supstanci koje se uzimaju istovremeno sa atorvastatinom. Metabolizam ekstrakta lista artičoke se takođe odvija u jetri. U literaturi su opisani rezultati istraživanja koja ukazuju da se u uzorcima biološkog materijala mogu identifikovati samo metaboliti komponenti ekstrakta lista artičoke, ali ne i početna jedinjenja (162, 163). Neki autori (164, 165) su utvrdili da su

hlorogenske kiseline (prisutne u ekstraktu lista artičoke, ali i u mnogim drugim biljnim drogama) jaki induktori CYP3A4.

Validirana SPE-LC-MS/MS metoda uspešno je primenjena za određivanje sadržaja atorvastatina, *o*-hidroksiatorvastatina, *p*-hidroksiatorvastatina i atorvastatin-laktona u plazmi pacova. Uzorci plazme su dobijeni od eksperimentalnih životinja koje su primale samo atorvastatin (u dozi od 1,15 mg/kg telesne mase, preračunato na osnovu prosečne doze koju prima odrasli čovek) ili atorvastatin (u istoj dozi) u kombinaciji sa ekstraktom lista artičoke. Detaljan plan izvođenja istraživanja na eksperimentalnim životinjama je prikazan u poglavlju 3.2.1.7. Priprema uzoraka plazme pacova koji su bili na terapiji atorvastatinom je prikazana u poglavlju 3.1.3. Određene koncentracije atorvastatina i aktivnih metabolita u realnim uzorcima eksperimentalnih životinja su prikazane u Tabeli 27.

**Tabela 27.** Koncentracije atorvastatina i metabolita u plazmi pacova koji su bili na terapiji atorvastatinom

Terapija	Redni broj pacova	Određena koncentracija (ng/mL)			
		AT	AT-L	oOH-AT	pOH-AT
Atorvastatin	27	1,108716	0,114852	1,093958	0,839496
	28	0,752455	<LLOQ	1,159110	0,866996
	29	0,370479	<LLOQ	1,006777	0,862735
	33	0,135290	<LLOQ	0,815506	0,863703
	34	0,365874	0,958747	0,958474	0,823560
	35	0,298564	0,102654	0,995684	0,805467
Atorvastatin + ekstrakt lista artičoke	39	0,091308	<LLOQ	0,926923	0,931952
	40	0,246772	<LLOQ	0,912564	0,923836
	41	0,071514	<LLOQ	0,798826	0,849368
	45	0,144845	0,104751	0,834091	1,148377
	46	0,101744	0,125074	0,737566	0,897879
	47	0,216541	0,115487	0,854765	0,965847

U Tabeli 28. su prikazani rezultati statističke analize koja je dobijena primenom ANOVA testa. Rezultati ukazuju da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji metabolita oOH-AT između grupe koja je primala samo atorvastatin i grupe koja je bila na kombinovanoj terapiji atorvastatinom i ekstraktom lista artičoke. Početna koncentracija leka i pOH-AT je manja, a koncentracija AT-L veća u grupi koji je istovremeno primala i ELA ( $p < 0,05$ ). Ovakvi rezultati ukazuju da ekstrakt lista artičoke ubrzava metabolizam atorvastatina i pomera ravnotežu između otvorenog, kiselinskog i zatvorenog, laktonskog oblika ka neaktivnom laktonu.

**Tabela 28.** Prosečne vrednosti koncentracije atorvastatina i metabolita u uzorcima plazme pacova koji su bili na terapiji atorvastatinom

Parametar	Tip terapije		p
	AI + AT	AI + AT + ELA	
AT (ng/mL)	0,5052 ± 0,3585	0,1455 ± 0,0716	<0,05
oOH-AT (ng/mL)	0,2363 ± 0,3542	0,1025 ± 0,0168	0,377
pOH-AT (ng/mL)	1,0049 ± 0,1182	0,8441 ± 0,0709	<0,05
AT-L (ng/mL)	0,8437 ± 0,0253	0,9527 ± 0,1034	<0,05

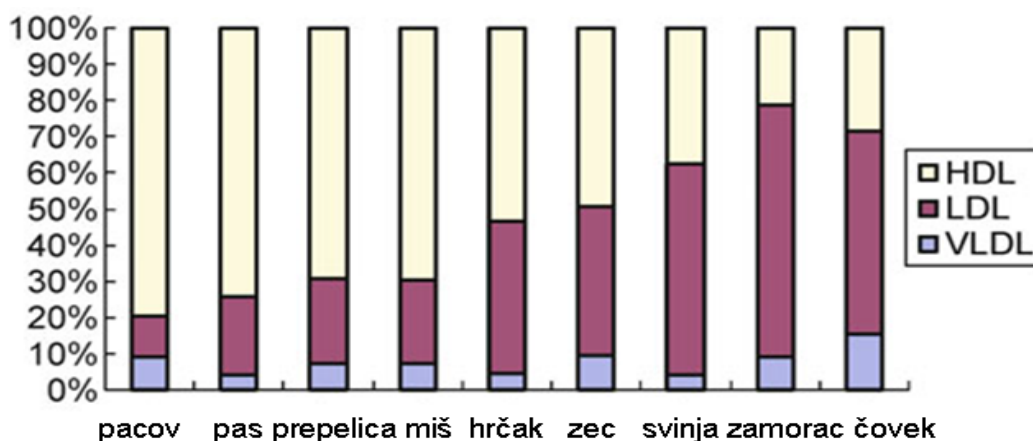
AT – koncentracija atorvastatina, oOH-AT – koncentracija *orto*-hidroksiatorvastatina, pOH-AT – koncentracija *para*-hidroksiatorvastatina, AT-L – koncentracija atorvastatin-laktona

p vrednost dobijena primenom ANOVA testa

### 4.3. REZULTATI ISPITIVANJA UTICAJA ATORVASTATINA I EKSTRAKTA LISTA ARTIČOKE NA OSNOVNE BIOHEMIJSKE PARAMETRE I PARAMETRE OKSIDATIVNOG STRESA I ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE

#### 4.3.1. Uslovi izvođenja eksperimenta

Za ispitivanje mehanizama nastanka ateroskleroze kao i uticaja terapije lekovima ili dijetetskim suplementima, veoma je važan pravilan izbor životinjskog modela. Da bi životinjska vrsta bila dobar model humanog organizma, mora da ima sličnu raspodelu glavnih lipidnih frakcija (HDL i LDL čestica) i sličnu osetljivost na razvoj ateroskleroze. Novija istraživanja (166) pokazuju da su zečevi, svinje i zamorci dobar životinjski model za proučavanje aterosklerotksih promena. Slika 57. pokazuje da je kod ovih vrsta odnos HDL, LDL i VLDL čestica veoma sličan onom u humanom organizmu.



Slika 57. Raspored lipoproteina kod različitih životinjskih vrsta

Pacovi u plazmi nemaju holesterol-estar transportni protein (CETP) i oko 80 % holesterola je u obliku HDL čestica. Holesterol se kod pacova veoma efikasno

konvertuje u žučne kiseline što ih čini veoma rezistentnim prema razvoju ateroskleroze. Ipak, i dalje se koriste u *in vivo* ispitivanjima (167, 168) jer su jeftini, nisu agresivni i lako im se obezbeđuje adekvatan smeštaj. Hiperlipidemija i aterosklerotske promene kod pacova se mogu izazvati primenom hrane obogaćene holesterolom tokom dužeg vremenskog perioda, uz obavezan dodatak holne kiseline ili natrijum-holata. Natrijum-holat i holna kiselina deluju kao inhibitori jetrene *holesterol-7 $\alpha$ -hidroksilaze*, ali imaju i emulgujuće dejstvo, čime poboljšavaju apsorpciju holesterola iz gastrointestinalnog trakta (169, 170).

Pri postavljanju eksperimenta jedan od početnih problema je bio kako dodati suncokretovo ulje, holesterol i natrijum-holat komercijalnim, standardnim briketima kojima se hrane pacovi u eksperimentalnim uslovima. Obzirom na nerastvorljivost holesterola i natrijum-holata u vodi, pokušaj dodavanja preko vode za piće se pokazao neuspešnim jer su se lipidne komponente našle na površini vode i životinje u kavezu ih nisu mogle ravnomerno uzimati. Zbog toga je odmerenoj količini briketa dodavana prethodno pripremljena smeša suncokretovog ulja, holesterola i natrijum-holata. Snažnim mešanjem je postignuto da lipidne komponente stvore ravnomeran film na površini briketa čime je omogućeno da svi pacovi u kavezu unose podjednake količine holesterola i natrijum-holata.

Izvođenje eksperimenta na pacovima je opisano u poglavlju 3.2.1.7. (Tabela 10). Cilj normalne ishrane životinja tokom prve nedelje eksperimenta je da se mladi Wistar pacovi prilagode životu u novom okruženju i da se eliminiše uticaj stresa kao dodatnog faktora koji bi mogao da doprinese razvoju patološkog procesa.

Grupa pacova koja je sve vreme trajanja eksperimenta bila na standardnoj ishrani je služila kao kontrolna grupa u odnosu na koju su poređene vrednosti svih određivanih parametara. Kod preostale četiri grupe pacova uvedena je ishrana sa povećanim sadržajem masti koja je imala za cilj da izazove aterosklerotske promene. Grupa koja je do kraja eksperimenta ostala na ishrani sa povećanim sadržajem masti je služila za procenu stepena izazvanih aterosklerotskih promena, kao i za procenu efikasnosti primenjene terapije.



Po šest pacova iz svake grupe je žrtvovano nakon tri nedelje terapije tj. 8 nedelja od početka eksperimenta. Statistička obrada rezultata koji su dobijeni nakon tri nedelje terapije je pokazala da nije bilo značajnije promene osnovnih biohemijskih parametara, debljine zida trbušne aorte i morfologije jetre, pa je zaključeno da tri nedelje nisu bile dovoljne da terapija pokaže povoljne efekte. Zbog toga će dalje u ovom radu biti prikazani samo rezultati dobijeni nakon šest nedelja terapije. Rezultati nakon tri nedelje terapije su zadržani samo u grafičkom prikazu da bi se ilustrativno prikazale njihove vrednosti i promena tokom vremena.

### **4.3.2. Rezultati određivanja osnovnih biohemijskih i lipidnih parametara u plazmi pacova**

U Tabeli 29. su prikazani rezultati određivanja aktivnosti *alaninaminotransferaze* (ALT), *aspartataminotransferaze* (AST), koncentracije ukupnog holesterola (HOL), LDL-holesterola (LDL), HDL-holesterola (HDL), triglicerida (TG), ukupnih proteina (TP) i glukoze (GLU) nakon šest nedelja terapije.

**Tabela 29.** Osnovni biohemijski i lipidni parametri nakon šest nedelja terapije

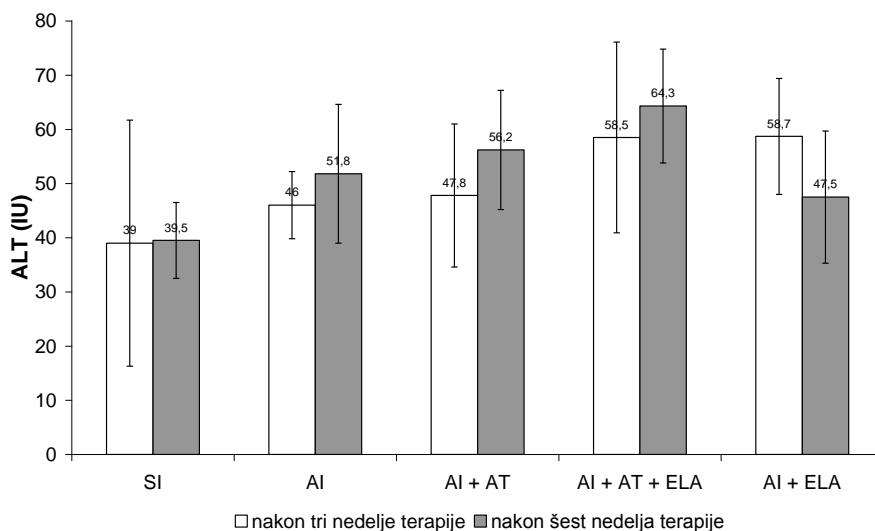
Parametar	SI	AI	AI + AT	AI + AT + ELA	AI + ELA	p
Masa na kraju eksperimenta (g)	449 ± 35	494 ± 16 <sup>a</sup>	495 ± 12 <sup>a</sup>	484 ± 23	475 ± 30	< 0,05
Porast mase (g)	272 ± 34	326 ± 26 <sup>a</sup>	322 ± 17 <sup>a</sup>	317 ± 20 <sup>a</sup>	301 ± 32	< 0,05
ALT (IU)	39,5 ± 7,0	51,8 ± 12,8	56,2 ± 11,0	64,3 ± 10,5	47,5 ± 12,2	< 0,01
AST (IU)	122,8 ± 39,6	167,2 ± 19,1	205,4 ± 35,7 <sup>aa</sup>	169,8 ± 19,3	127,5 ± 52,8 <sup>c</sup>	< 0,01
HOL (mmol/L)	1,45 ± 0,19	2,96 ± 0,49	3,67 ± 1,75	3,80 ± 1,66	4,48 ± 1,39 <sup>a</sup>	< 0,01
LDL (mmol/L)	0,64 ± 0,21	2,28 ± 0,53	3,06 ± 1,72	3,15 ± 1,67	3,83 ± 1,45 <sup>a</sup>	< 0,01
HDL (mmol/L)	0,478 ± 0,057	0,446 ± 0,108	0,428 ± 0,064	0,455 ± 0,075	0,442 ± 0,092	0,86
nonHDL (mmol/L)	0,97 ± 0,14	2,51 ± 0,49	3,24 ± 1,74	3,34 ± 1,68	3,49 ± 1,64	< 0,05
TG (mmol/L)	0,737 ± 0,205	0,508 ± 0,114	0,382 ± 0,065	0,422 ± 0,137	0,455 ± 0,126	< 0,001
TP (g/L)	70,8 ± 7,8	71,5 ± 4,7	72,1 ± 1,4	69,9 ± 1,6	69,2 ± 2,3	0,780
GLU (mmol/L)	7,3 ± 1,5	7,1 ± 1,8	6,6 ± 0,8	8,3 ± 2,0	7,8 ± 1,1	0,362

(ALT – alaninaminotransferaza, AST – aspartataminotransferaza, HOL – koncentracija ukupnog holesterola, LDL – koncentracija LDL čestica, HDL – koncentracija HDL čestica, nonHDL – koncentracija svih lipoproteinskih čestica osim HDL, TG – koncentracija triglicerida, TP – koncentracija ukupnih proteina, GLU – koncentracija glukoze)

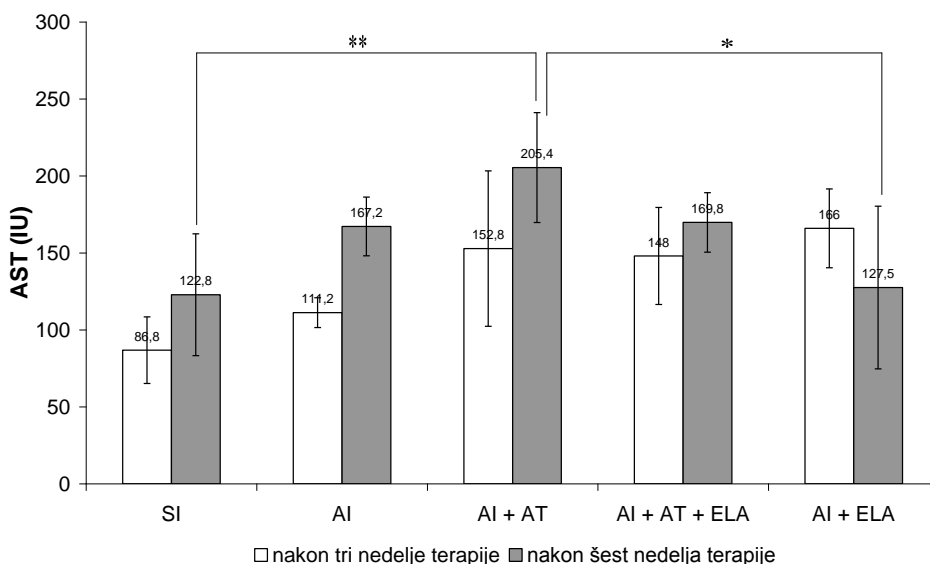
p vrednosti dobijene primenom testa ANOVA

p vrednosti prema *post-hoc* Tukey-Snedecor testu: <sup>a</sup>p<0,05, <sup>aa</sup>p<0,01 vs. SI; <sup>c</sup>p<0,05 vs. AI + AT

Dobijeni rezultati ukazuju da je kod grupa koje su bile na aterogenoj ishrani i/ili koje su primale atorvastatin (kao monoterapiju ili u kombinaciji sa ekstraktom lista artičoke) došlo do porasta aktivnosti enzima jetre (AST i ALT). Kod grupe koja je bila samo na terapiji ELA nije došlo do značajne promene u aktivnosti AST i ALT u odnosu na grupu koja je ostala na normalnoj ishrani. Promena aktivnosti ALT i AST enzima u različitim grupama, nakon tri i nakon šest nedelja terapije je prikazana na Slikama 58. i 59.



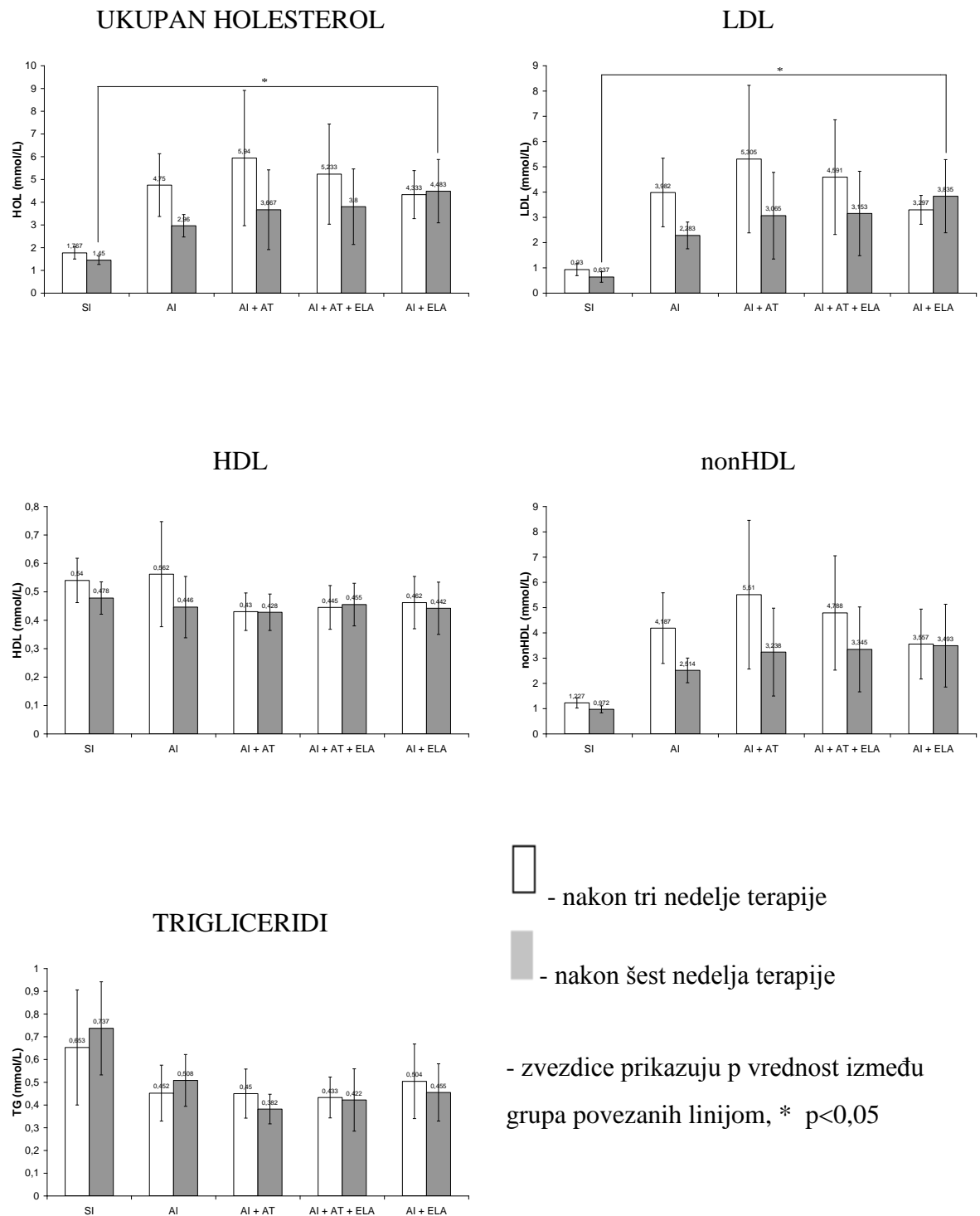
**Slika 58.** Aktivnost alaninaminotransferaze (ALT) nakon tri i šest nedelja terapije



**Slika 59.** Aktivnost aspartataminotransferaze (AST) nakon tri i šest nedelja terapije (zvezdice prikazuju p vrednost između grupa povezanih linijom, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ )

Porast aktivnosti jetrenih transaminaza kod hiperholesterolemičnih pacova je očekivan i javlja se zbog oštećenja ćelijske membrane hepatocita usled hiperlipidemije. Ovi enzimi se nalaze u citozolu ćelije; oštećenjem membrane izlaze iz ćelije i mogu se naći u krvotoku (68). Rezultati eksperimenta su pokazali da terapija atorvastatinom dovodi do daljeg povećanja nivoa transaminaza u plazmi što je u skladu sa literaturnim podacima (171). Dužom terapijom aktivnost posmatranih enzima se vraća na uobičajen nivo i, u većini slučajeva, atorvastatin neće dovesti do oštećenja jetre. Ipak, u retkim slučajevima, atorvastatin može dovesti do akutne hepatotoksičnosti (171). Dobijeni rezultati su potvrdili da ekstrakt lista artičoke ima hepatoprotektivno dejstvo i snižava nivo ALT i AST, što je u skladu sa literaturnim podacima.

Ishrana bogata holesterolom i zasićenim mastima dovela je, očekivano, do povećanja koncentracije većine lipidnih parametara (ukupnog holesterola, LDL, nonHDL). Eksperimenti su pokazali da ovakva ishrana nije uticala na sve lipidne parametre (HDL i trigliceride). Koncentracija osnovnih lipidnih parametara u različitim eksperimentalnim grupama je prikazana na Slici 60.



**Slika 60.** Koncentracija lipidnih parametara nakon tri i šest nedelja terapije

Značajan porast koncentracije ukupnog holesterola, LDL i nonHDL holesterola kod životinja koje su bile na ishrani sa povećanim sadržajem masti je očekivan jer su ove životinje, tokom eksperimenta, sve vreme intenzivno unosile velike količine holesterola (dodatog hrani) u organizam. Terapija atorvastatinom, kao ni artičokom nije uspjela da smanji nivo LDL i nonHDL holesterola što se može objasniti relativno kratkim vremenom trajanja eksperimenta tj. šest nedelja terapije nije bilo dovoljno da smanji koncentraciju lipida koji su unošeni hranom. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima istraživanja drugih autora (172). Dalal i saradnici (172) su izveli eksperiment u kom su pratili efekat atorvastatina i ekstrakta belog luka na lipidne parametre kod zečeva (koji su bolji životinjski model za proučavanje aterosklerotskih promena od pacova). U istraživanju je praćen nivo lipidnih komponenti tokom tri meseca terapije (dvostruko duže vreme trajanja eksperimenta od opisanog u našem istraživanju). Njihovi rezultati su pokazali da atorvastatin usporava rast koncentracije LDL čestica i triglicerida, ali ne dovodi i do pada koncentracije ovih proaterogenih čestica. U realnim uslovima, osoba koja započne terapiju statinima, pored terapije menja i način ishrane i time dodatno poboljšava učinak terapije.

Rezultati eksperimenta su pokazali da se pod uticajem aterogene ishrane koncentracija HDL holesterola nije promenila. Razlog je karakteristična raspodela lipidnih čestica u organizmu pacova. Na Slici 57. se jasno vidi da se kod pacova holesterol nalazi najvećim delom u obliku HDL. Male promene u koncentraciji HDL izazvane aterogenom hranom se ne uočavaju u odnosu na njegovu ukupnu koncentraciju. Antihiperlipidemijska terapija takođe nije uticala na nivo HDL holesterola, što nije uobičajeno kod terapije atorvastatinom iako su do ovakvih rezultata došli i drugi autori (44, 45, 97).

U Tabeli 29. se uočava i da se koncentracija ukupnih proteina i glukoze nije menjala pod uticajem aterogene ishrane, kao ni pod dejstvom terapije.

### **4.3.3. Rezultati određivanja parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u plazmi**

U plazmi eksperimentalnih životinja su određeni sledeći parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite: koncentracija malondialdehida (MDA), redukovanog glutationa (GSH) i ukupnih sulfhidrilnih grupa (SH), aktivnost enzima *superoksid-dizmutaze* (SOD) i *paraoksonaze 1* (PON1) i prooksidativno-antioksidativni balans (PAB). Rezultati dobijeni nakon šest nedelja terapije prikazani su u Tabeli 30.

**Tabela 30.** Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u plazmi nakon šest nedelja terapije

Parametar	SI	AI	AI + AT	AI + AT + ELA	AI + ELA	p
MDA ( $\mu\text{mol/L}$ )	$0,472 \pm 0,101$	$0,850 \pm 0,762^a$	$0,610 \pm 0,067$	$1,223 \pm 0,874^a$	$0,962 \pm 0,493^a$	0,172
PAB (HK jedinice)	$186 \pm 57$	$368 \pm 139^{aa}$	$364 \pm 115^{aa}$	$367 \pm 135^{aa}$	$266 \pm 39^{a, c}$	< 0,05
SOD (IU)	$112 \pm 4$	$109 \pm 10$	$117 \pm 5$	$115 \pm 6$	$119 \pm 4^{a, b}$	0,106
SH grupe (mmol/L)	$0,205 \pm 0,085$	$0,248 \pm 0,011$	$0,482 \pm 0,316$	$0,347 \pm 0,023$	$0,553 \pm 0,590$	0,215
GSH	$32,7 \pm 21,1$	$9,6 \pm 2,7^a$	$10,2 \pm 2,8^a$	$20,0 \pm 10,8^{b, c}$	$33,7 \pm 14,7^{bb, cc}$	< 0,01
PON1 (IU/L)	$4785 \pm 327$	$2785 \pm 417^a$	$1991 \pm 473^{aaa, b}$	$3072 \pm 662$	$2441 \pm 497^a$	< 0,01

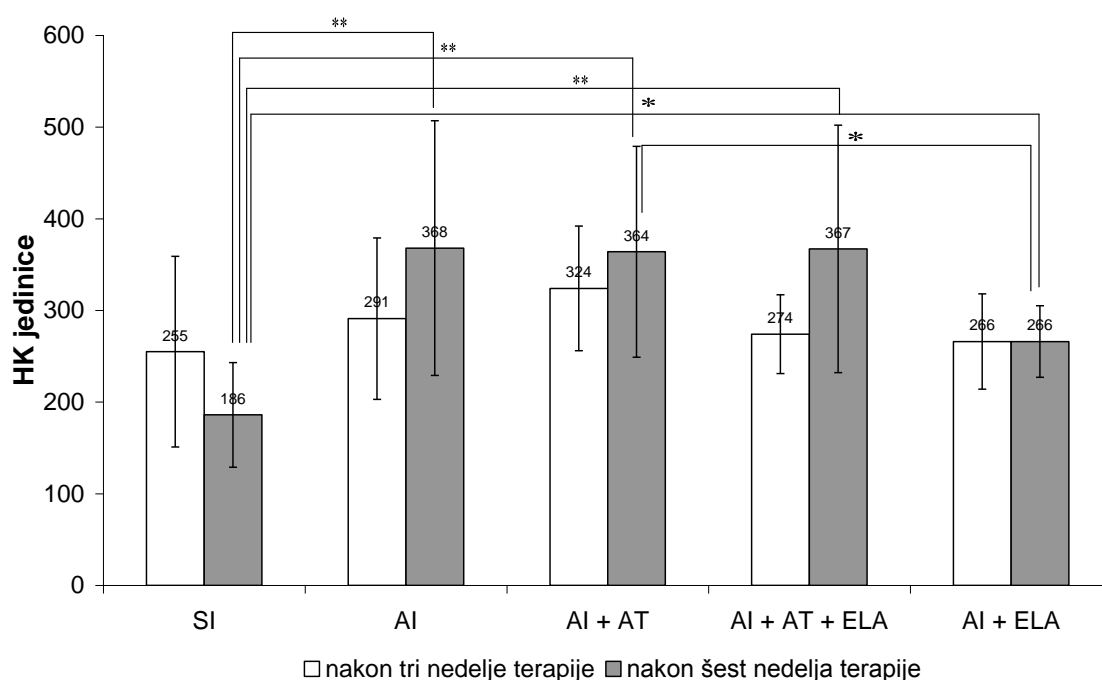
MDA – koncentracija malondialdehida, PAB – prooksidativno-antioksidativni balans, SOD – aktivnost *superoksid-dizmutaze*, SH grupe – koncentracija ukupnih SH grupa, GSH – koncentracija redukovanog glutationa, PON1 – aktivnost *paraoksonaze 1*  
 p vrednosti u poslednjoj koloni dobijene ANOVA-om;

p vrednosti dobijene *post-hoc* Tukey-Snedecor testom: <sup>a</sup>p<0,05, <sup>aa</sup>p<0,01, <sup>aaa</sup>p<0,001 vs. SI; <sup>b</sup>p<0,05, <sup>bb</sup>p<0,01 vs. AI, <sup>c</sup>p<0,05, <sup>cc</sup>p<0,01  
 AI + AT



#### 4.3.3.1. Rezultati određivanja prooksidativno-antioksidativnog balansa u plazmi

Prooksidativno-antioksidativni balans (PAB) je odnos ukupne koncentracije markera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite. Veća PAB vrednost ukazuje na povećan oksidativni stres. U izvedenom eksperimentu, ishrana sa povećanim sadržajem masti je dovela do povećanja PAB, što je i očekivano jer je proces aterogeneze oksidativni proces tokom kojeg se povećavaju parametri oksidativnog stresa. Terapija atorvastatinom (kao monoterapija ili u kombinaciji sa ELA) nije dovela do smanjenja PAB, dok je primena ekstrakta lista artičoke, potvrdila antioksidantno dejstvo (Sl. 61).

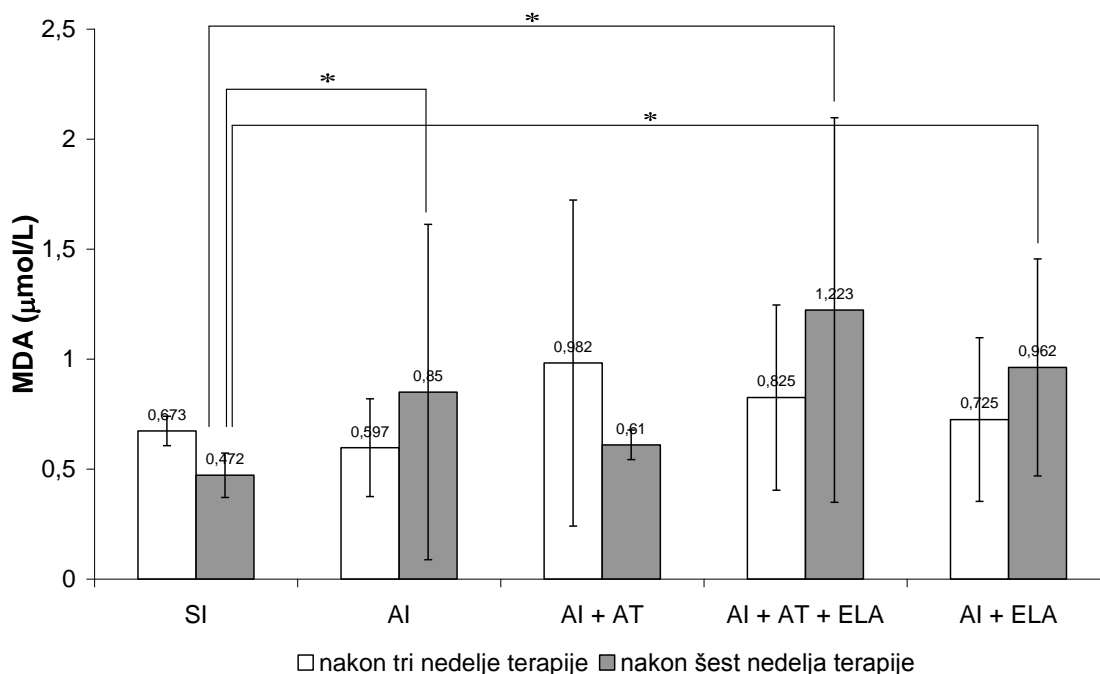


**Slika 61.** Prooksidativno-antioksidativni balans nakon tri i šest nedelja terapije (zvezdice prikazuju p vrednost između grupa povezanih linijom, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ )

#### 4.3.3.2. Rezultati određivanja koncentracije malondialdehida u plazmi

Usled dugotrajne ishrane bogate mastima, koncentracija MDA se statistički značajno povećala, što je dokaz da tokom aterogeneze dolazi do oksidativnog stresa (169, 173). Nijedan vid terapije nije značajno smanjio koncentraciju MDA u plazmi (Sl. 62). Pretpostavlja se da je ishrana bogata holesterolom dovela do uznapredovale peroksidacije lipida koju šest nedelja antioksidativnog dejstva atorvastatina i ELA nije

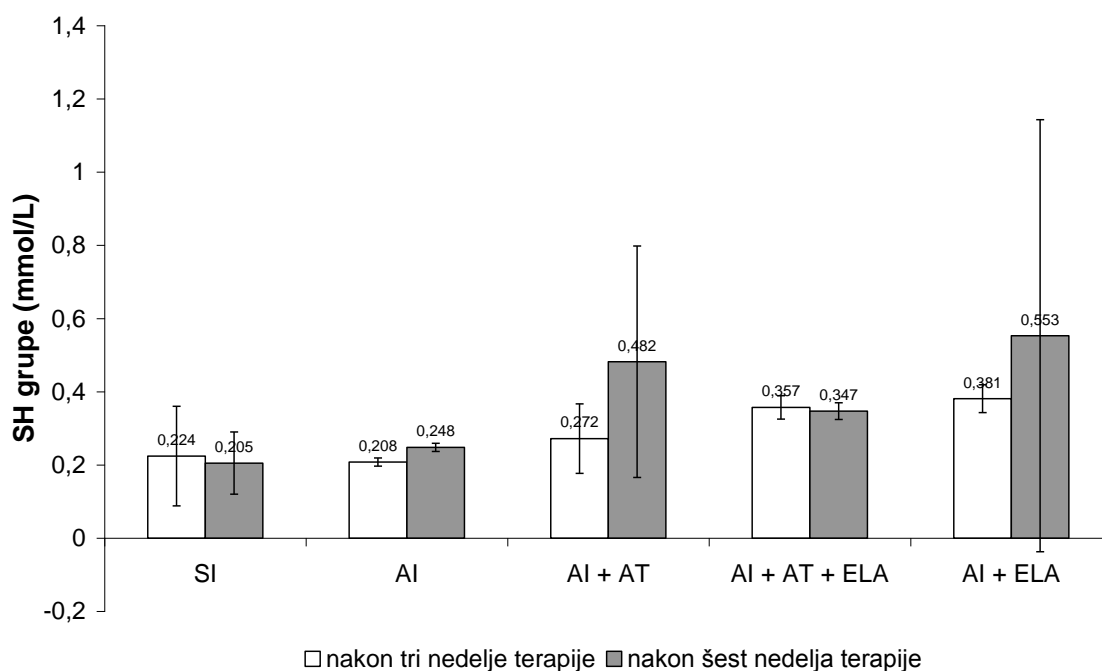
moglo sprečiti. Značajan povoljan efekat terapije na koncentraciju MDA se uočava i u homogenatima tkiva jetre o čemu će biti reči u poglavlju 4.3.5.



**Slika 62.** Koncentracija MDA u plazmi nakon tri i šest nedelja terapije (zvezdice prikazuju p vrednost između grupa povezanih linijom, \*  $p < 0,05$ )

#### 4.3.3.3. Rezultati određivanja slobodnih sulfhidrilnih grupa u plazmi

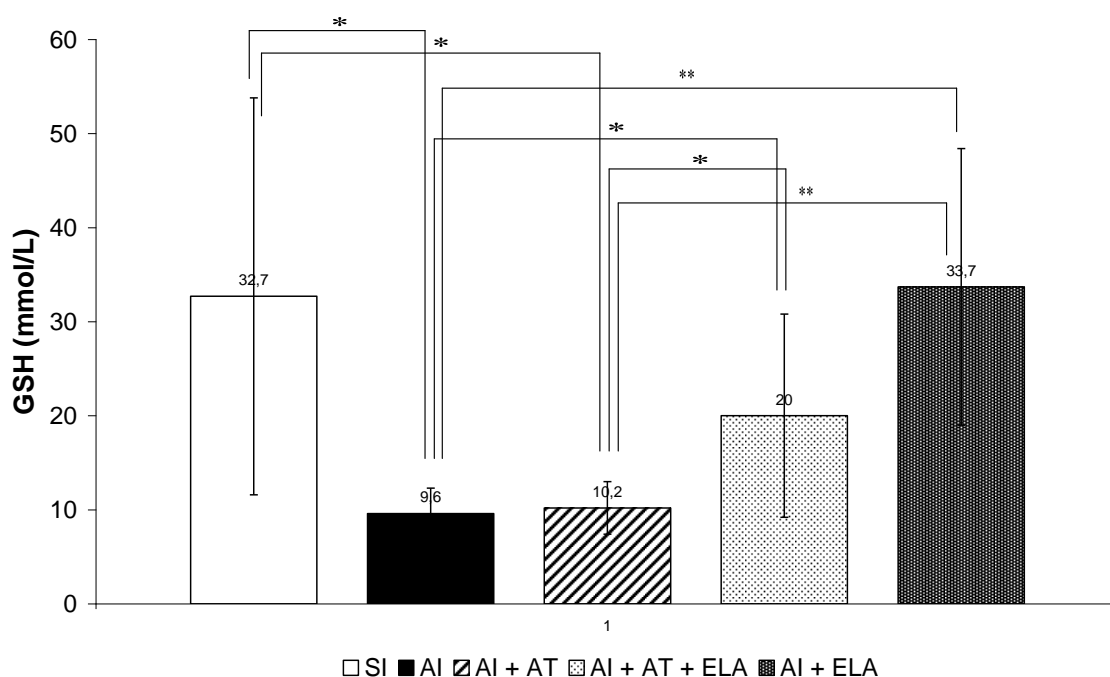
Slobodne sulfhidrilne grupe igraju važnu ulogu u neutralizaciji slobodnih radikala koji nastaju tokom oksidativnog stresa u toku procesa aterogeneze (161). Iako aterogena ishrana nije značajno uticala na koncentraciju slobodnih SH grupa (Tabela 27), svaki vid terapije je doveo do povećanja njihove koncentracije (bez statistički značajne razlike) (Sl.63) čime je potvrđeno antioksidativno dejstvo atorvastatina i ELA.



**Slika 63.** Koncentracija slobodnih sulfhidrilnih grupa nakon tri i šest nedelja terapije

#### 4.3.3.4. Rezultati određivanja koncentracije redukovanog glutaciona u plazmi

Glutation štiti ćelije od slobodnih radikala (173). Ovo jedinjenje može vezivati slobodne radikale samo kada se nalazi u redukovanom obliku (GSH). Dobijeni rezultati ukazuju da se redukovani oblik glutaciona intenzivno troši tokom procesa aterogeneze, što je i očekivano jer je nastanak slobodnih radikala u oksidativnom procesu povećan. Potrošeni glutacion se regeneriše primenom terapije koja pokazuje antioksidativno dejstvo. Primena atorvastatina kao monoterapije nije pokazala značajan efekat na regenerisanje potrošenog glutaciona dok je porast koncentracije regenerisanog GSH očigledan kod grupa koje su primale ELA (posebno se uočava kod grupe životinja koja je primala samo ekstrakt lista artičoke). Smatra se da dobar deo antioksidativne, hipolipemijske i holeretične aktivnosti ELA potiče od metabolita koji nastaju od polifenola prisutnih u ekstraktu (174). Koncentracija redukovanog glutaciona određena nakon šest nedelja terapije je prikazana na Slici 64.

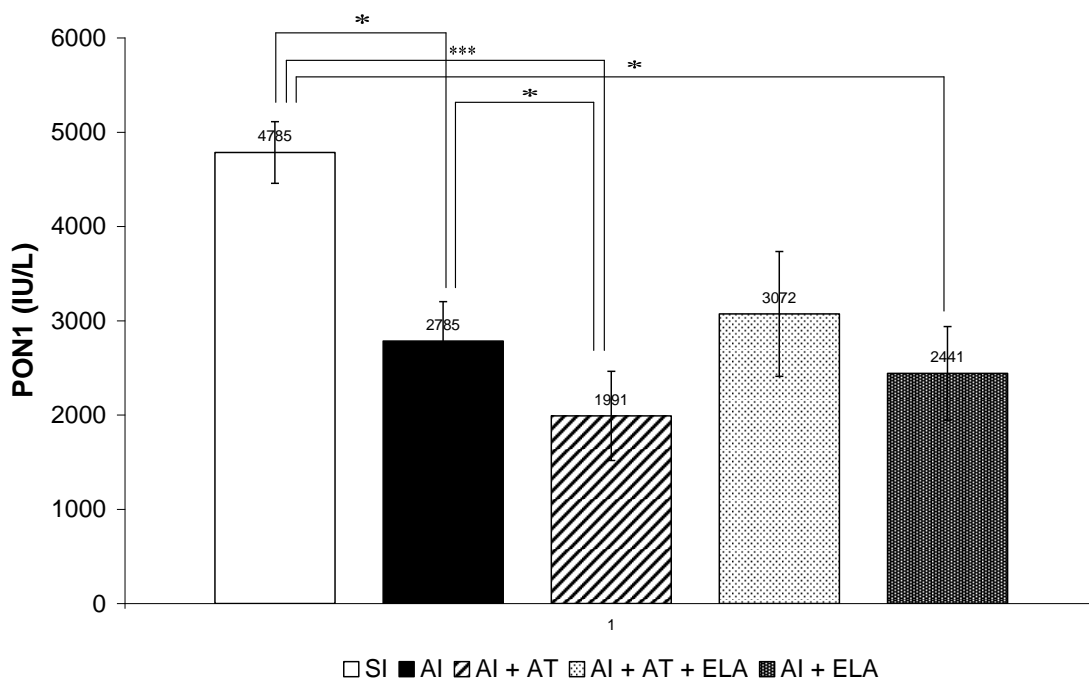


**Slika 64.** Koncentracija redukovanog glutationa (GSH) nakon šest nedelja terapije (zvezdice prikazuju p vrednost između grupa povezanih linijom, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ )

#### 4.3.3.5. Rezultati određivanja aktivnosti *paraoksonaze* u plazmi

*Paraoksonaza* (PON) je enzim koji se nalazi na HDL lipoproteinskim česticama i učestvuje u metabolizmu lipidnih peroksida čime sprečava njihovo deponovanje u LDL lipoproteinskim česticama. Zaštita LDL i HDL čestica od oksidacije (do koje dolazi tokom razvoja ateroskleroze) se delimično može objasniti sposobnošću PON enzima da hidrolizuje neke oksidovane fosfolipide i/ili holesteril-linoleat hidroperoksidi (175) prisutne u oksidovanim lipoproteinima. Istraživanja su pokazala da se PON1 delimično inaktivira prilikom oksidacije LDL čestica (176). Do ove inaktivacije dolazi zbog zamene jona kalcijuma (koji su neophodni za arilesteraznu/paraoksonaznu aktivnost enzima) jonima bakra. Takođe, slobodni radikali koji nastaju tokom lipidne peroksidacije mogu inaktivirati PON1 enzim (177). Navedene činjenice ukazuju da se tokom aterogeneze očekuje smanjenje nivoa paraoksonaze, što je i potvrđeno eksperimentalnim rezultatima. Obzirom da antioksidansi sprečavaju oksidaciju LDL čestica, njihova primena u terapiji „čuva” aktivnost paraoksonaze, pa se u grupama životinja koje su bile na terapiji ekstraktom lista artičoke i atorvastatinom očekuje veća

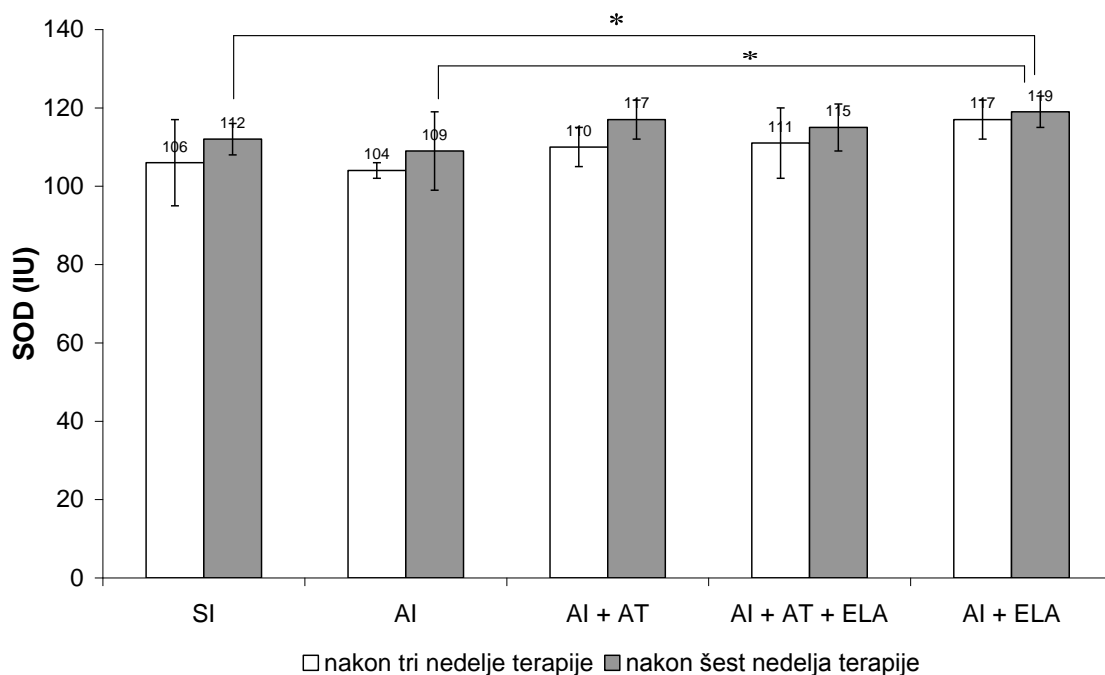
PON1 aktivnost. Aktivnost paraoksonaze je određena nakon šest nedelja terapije, a dobijeni rezultati pokazuju da je samo terapija ekstraktom lista artičoke pokazala značajnu antioksidativnu aktivnost, dok atorvastatin nije imao značajnog efekta na aktivnost PON1 (Sl. 65).



**Slika 65.** Aktivnost paraoksonaze (PON1) nakon šest nedelja terapije (zvezdice prikazuju p vrednost između grupa povezanih linijom, \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ )

#### 4.3.3.6. Rezultati određivanja aktivnosti *superoksid-dizmutaze* u plazmi

Aktivnost enzima *superoksid-dizmutaze* (SOD) se nije menjala pod dejstvom ishrane obogaćene mastima, a ni nakon primenjene terapije. Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 66.



**Slika 66.** Aktivnost enzima *superoksid-dizmutaze* nakon tri i šest nedelja terapije (zvezdice prikazuju p vrednost između grupa povezanih linijom, \*  $p < 0,05$ )

#### 4.3.4. Rezultati određivanja parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u hemolizatu eritrocita

Markeri oksidativnog stresa (MDA) i antioksidativne zaštite (SOD, SH grupe, GSH) su praćeni i u hemolizatu eritrocita. Određivanjem pomenutih parametara u hemolizatu (u kom su prisutne i ćelije krvi) prati se uticaj terapije na aterosklerotske promene do kojih je došlo na eritrocitima i leukocitima. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 31. i ukazuju na značajno antioksidativno dejstvo ekstrakta lista artičoke, koje je i u ovim uzorcima izraženije od antioksidativnog dejstva atorvastatina.

**Tabela 31.** Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u hemolizatu eritrocita nakon šest nedelja terapije

Parametar	SI	AI	AI + AT	AI + AT + ELA	AI + ELA	p
MDA ( $\mu\text{mol/L}$ )	$0,050 \pm 0,006$	$0,030 \pm 0,020$	$0,076 \pm 0,031$	$0,098 \pm 0,056$	$0,188 \pm 0,069$	< 0,01
SOD (IU/L)	$3,08 \pm 3,08$	$6,36 \pm 4,05$	$6,57 \pm 4,15$	$10,97 \pm 1,64$	$11,84 \pm 3,44^a$	< 0,01
SH grupe (mmol/L)	$0,171 \pm 0,105$	$0,283 \pm 0,162$	$0,254 \pm 0,173$	$0,324 \pm 0,046$	$0,273 \pm 0,126$	0,36
GSH (mmol/L)	$0,91 \pm 0,23$	$1,88 \pm 0,83$	$2,54 \pm 1,25$	$4,24 \pm 0,83$	$10,25 \pm 10,39^{aa,b,c}$	< 0,01

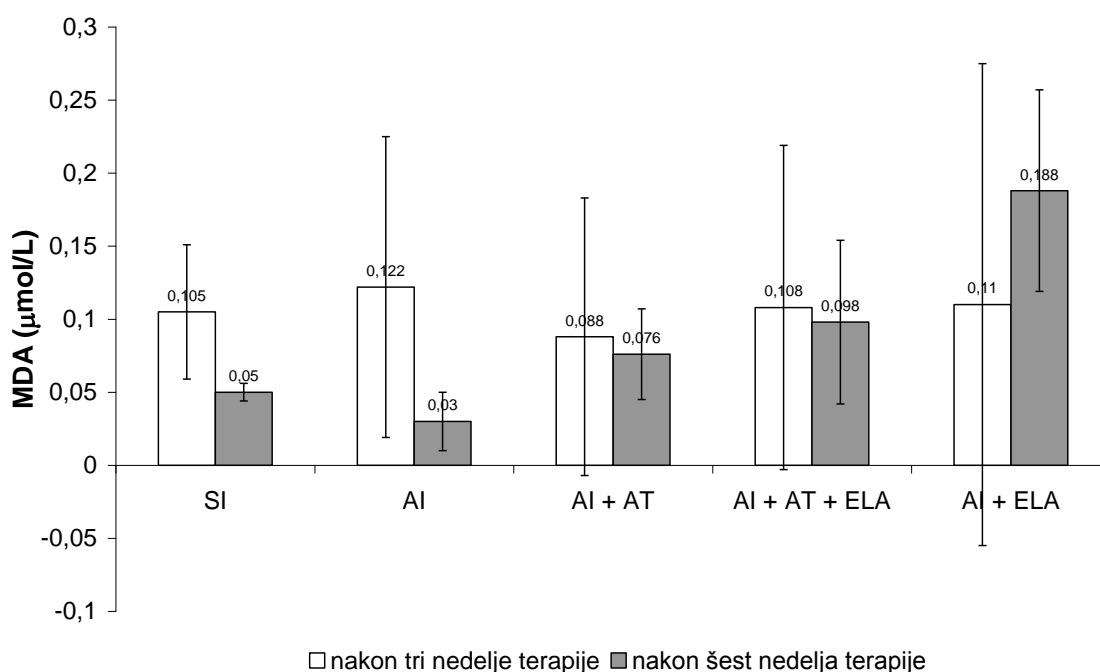
MDA – koncentracija malondialdehida, SOD – aktivnost *superoksid-dizmutaze*, SH grupe – koncentracija ukupnih sulfhidrilnih grupa, GSH – koncentracija redukovanog glutationa

p vrednosti u poslednjoj koloni prema ANOVA-i;

p vrednosti prema *post-hoc* Tukey-Snedecor testu: <sup>a</sup>p<0,05, <sup>aa</sup>p<0,01 vs. SI; <sup>b</sup>p<0,05 vs. AI; <sup>c</sup>p<0,05 vs. AI + AT.

#### 4.3.4.1. Rezultati određivanja koncentracije malondialdehida u hemolizatu eritrocita

Iako se očekuje da ishrana sa povećanim sadržajem masti dovodi do povećanja koncentracije MDA (usled oksidativnog procesa koji se dešava tokom aterogeneze), a da terapija snižava koncentraciju MDA, dobijeni rezultati nisu potvrdili očekivanja (Sl. 67). Nakon šest nedelja terapije potvrđeno je da je koncentracija MDA manja u grupi koja je uzimala hranu obogaćenu mastima, a veća u grupama koje su uzimale atorvastatin i/ili ELA. Jedno od objašnjenja za neočekivane rezultate je da je oksidativni stres u eritrocitima, usled intenzivnog unošenja veće koncentracije holesterola hranom, značajno napredovao i nastavio da se razvija uprkos antioksidativnoj terapiji. Drugo moguće objašnjenje je razlika koja postoji između eritrocita pacova i čoveka. U literaturi postoje podaci da su eritrociti pacova mnogo manje skloni agregaciji i sedimentaciji u odnosu na eritrocite čoveka (178). Autori za ovo daju nekoliko objašnjenja, a jedno od mogućih je specifična struktura membrane eritrocita u svakom od posmatranih modela (membrana eritrocita pacova je manje podložna deformacijama i čvršća je).



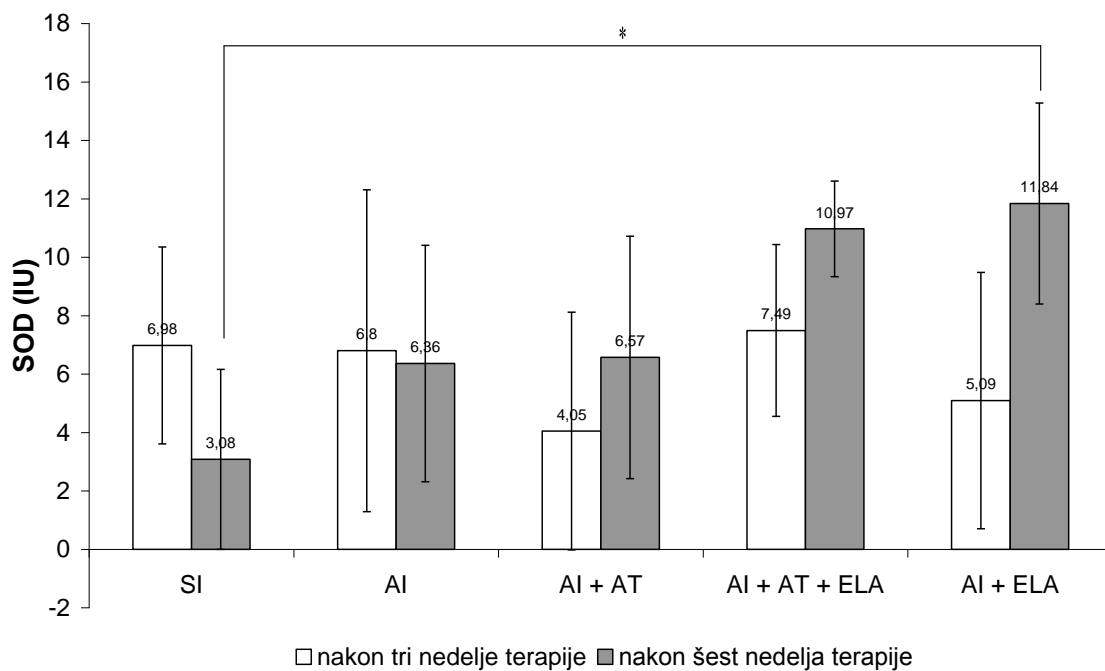
**Slika 67.** Koncentracija MDA u hemolizatu eritrocita nakon tri i šest nedelja terapije



#### **4.3.4.2. Rezultati određivanja aktivnosti *superoksid-dizmutaze* u hemolizatu eritrocita**

Za razliku od uzoraka plazme u kojima nije dobijena značajna razlika u aktivnosti *superoksid-dizmutaze* između grupa, u hemolizatu eritrocita su dobijeni očekivani rezultati (Sl. 68). Nakon tri nedelje terapije, kod svih praćenih grupa određena je podjednaka aktivnost SOD što je u skladu sa rezultatima koje su dobili i drugi autori (69). Nakon šest nedelja, kod svih grupa koje su bile na terapiji je povećana aktivnost enzima u odnosu na početni period čime je pokazano da je potreban duži tretman da bi terapija ispoljila antioksidativno dejstvo. Povećanje aktivnosti *superoksid-dizmutaze* je najveće kod grupe koja je primala ELA. Nije bilo značajne razlike u aktivnosti SOD kod grupe koja je primala hranu obogaćenu mastima u odnosu na grupu koja je bila na standardnoj ishrani, što je u skladu sa rezultatima koje je dobio Küçükgergin (179). U pomenutom radu, hiperholesterolemija kod pacova je izazvana na sličan način kao u našem eksperimentu, dodavanjem holesterola (4 %) i holne kiseline (1 %) standardnoj hrani. Terapija ekstraktom lista artičoke je trajala samo dve nedelje.

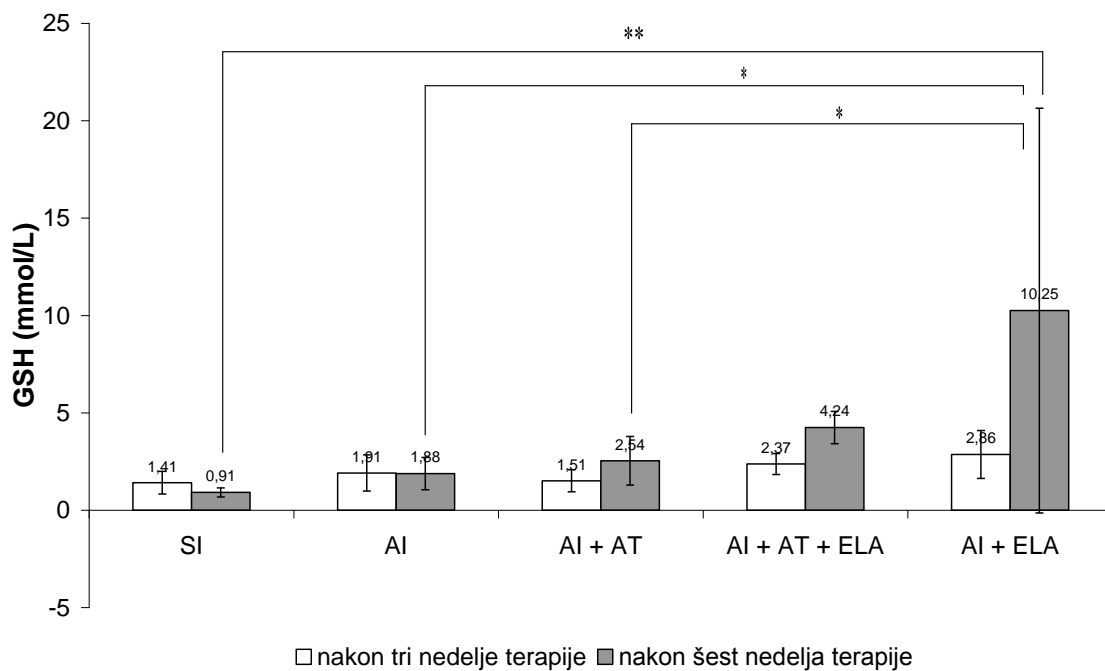
Dobijeni rezultati su pokazali da je ekstrakt lista artičoke bolji antioksidans od atorvastatina (aktivnost SOD je veća u grupi koja je bila samo na terapiji ELA, nego u grupi koja je primala kombinovanu terapiju).



**Slika 68.** Aktivnost enzima *superoksid-dizmutaze* u hemolizatu eritrocita nakon tri i šest nedelja terapije (zvezdice prikazuju p vrednost između grupa povezanih linijom, \*  $p < 0,05$ )

#### 4.3.4.3. Rezultati određivanja koncentracije redukovanoog glutationa u hemolizatu eritrocita

Dobijeni rezultati za koncentraciju redukovanoog glutationa (Sl. 69) su slični rezultatima dobijenim u plazmi (Sl. 64). U grupi koja je bila na kombinovanoj terapiji (AT + ELA) dobijene su veće koncentracije GSH a najveće vrednosti su dobijene u grupi koja je tokom terapije primala samo ekstrakt lista artičoke. Ovakav rezultat pokazuje da je ELA značajno bolji antioksidans od atorvastatina, ali ukazuje i na moguću interakciju između ELA i atorvastatina. Na isti način bi se mogla objasniti manja koncentracija GSH u grupi koja je bila na kombinovanoj terapiji.



**Slika 69.** Koncentracija GSH u hemolizatu eritrocita nakon tri i šest nedelje terapije (zvezdice prikazuju p vrednost između grupa povezanih linijom, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ )

Koncentracija ukupnih SH grupa se nije značajno menjala pod uticajem terapije u odnosu na grupu koja je ostala na aterogenoj ishrani.

#### 4.3.5. Rezultati određivanja parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u tkivu jetre

U uzorcima homogenata tkiva jetre praćena su dva najreprezentativnija parametra: koncentracija MDA kao marker oksidativnog stresa i koncentracija GSH kao marker antioksidativne zaštite. Homogenati su pripremljeni od uzoraka tkiva jetre uzetih nakon šest nedelja terapije. Dobijeni rezultati, izraženi po g proteina, su prikazani u Tabeli 32.

**Tabela 32.** Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u tkivu jetre nakon šest nedelja terapije

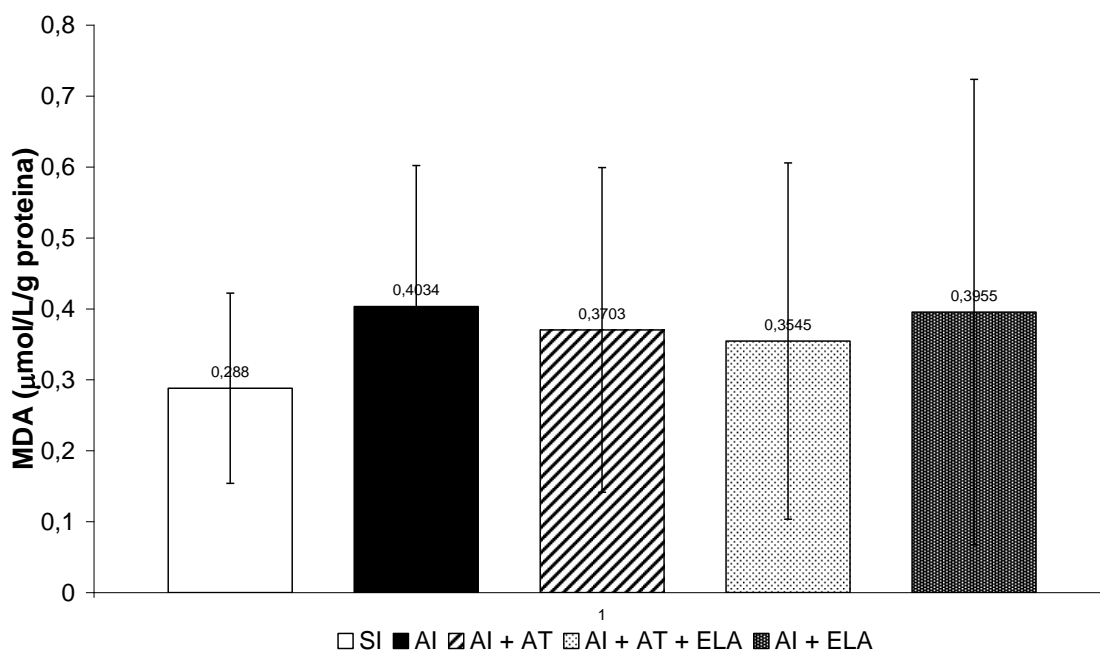
Parametar	SI	AI	AI + AT	AI + AT + ELA	AI + ELA	p
MDA ( $\mu\text{mol/L/g}$ proteina)	0,288 $\pm$ 0,134	0,403 $\pm$ 0,199	0,370 $\pm$ 0,229	0,354 $\pm$ 0,251	0,395 $\pm$ 0,328	< 0,01
GSH (mmol/L/g proteina)	32,7 $\pm$ 21,1	22,4 $\pm$ 17,3	46,6 $\pm$ 12,6	92,0 $\pm$ 50,6	152,0 $\pm$ 69,2 <sup>aaa,bbb,ccc</sup>	< 0,01

MDA – koncentracija malondialdehida po g tkiva jetre, GSH – koncentracija redukovano glutationa po g tkiva jetre  
p vrednosti u poslednjoj koloni prema ANOVA testu;

p vrednosti prema *post-hoc* Tukey-Snedecor testu: <sup>aaa</sup>p<0.001 vs. SI; <sup>bbb</sup>p<0.001 vs. AI; <sup>ccc</sup>p<0.001 vs. AI + AT.

#### 4.3.5.1. Rezultati određivanja koncentracije malondialdehida u tkivu jetre

Rezultati prikazani u Tabeli 29. i na Slici 70. ukazuju da je aterogena ishrana dovela do povećanja koncentracije malondialdehida u tkivu jetre, dok je terapija atorvastatinom i ELA pokazala antioksidativno dejstvo i dovela do slabog smanjenja koncentracije MDA. Razlike između pojedinih grupa životinja nisu statistički značajne, ali ukazuju na povoljno dejstvo terapije koje bi, verovatno, bilo još očiglednije nakon dužeg vremena. Slične rezultate su dobili i drugi autori (66, 67).



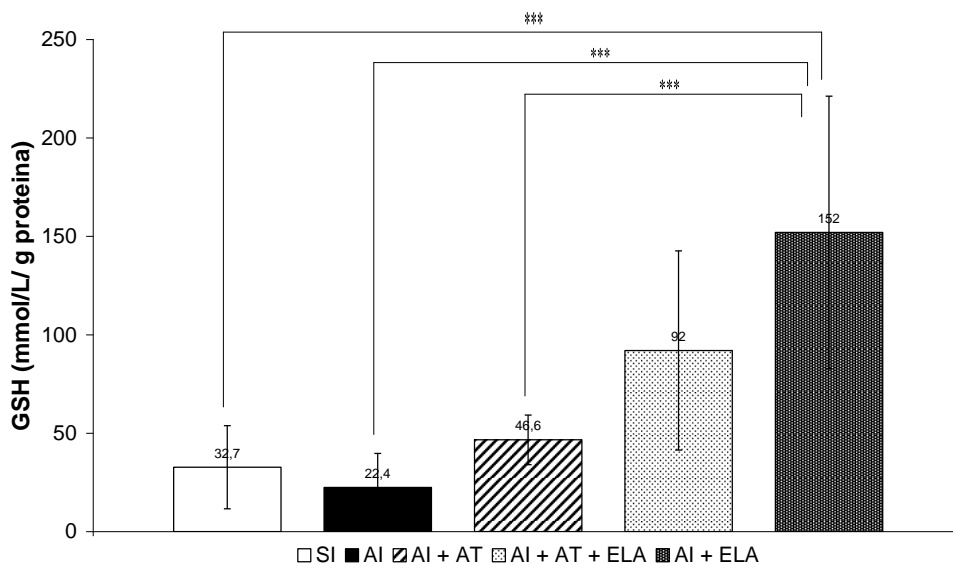
**Slika 70.** Koncentracija MDA u homogenatu tkiva jetre (po g proteina) nakon šest nedelja terapije

#### 4.3.5.2. Rezultati određivanja koncentracije redukovano glutationa u tkivu jetre

I u slučaju redukovano glutationa dobijeni su rezultati slični rezultatima dobijenim iz plazme i hemolizata eritrocita. Aterogena ishrana je dovela do smanjenja koncentracije GSH, koji je utrošen za neutralizaciju slobodnih radikala (koji se formiraju u oksidativnim procesima tokom aterogeneze). Kod sve tri grupe životinja koje su bile na terapiji došlo je do regenerisanja utrošenog GSH, tj. do povećanja njegove

koncentracije, čime je dokazano da se atorvastatin i ekstrakt lista artičoke ponašaju kao antioksidansi u tkivu jetre.

I ovaj marker je pokazao da su komponente ELA bolji antioksidansi od atorvastatina (Sl. 71) i to posebno kada se ekstrakt artičoke u terapiji primenjuje samostalno.



**Slika 71.** Koncentracija GSH u homogenatu tkiva jetre (po g proteina) nakon šest nedelja terapije (zvezdice prikazuju p vrednost između grupa povezanih linijom,

\*\*\*  $p < 0,001$ )

Rezultati dobijeni za većinu parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u plazmi, hemolizatu eritrocita i homogenatu tkiva jetre ukazuju da ekstrakt lista artičoke ima jače izraženo antioksidativno dejstvo u odnosu na lek atorvastatin. To ne znači da se ELA može koristiti samostalno u terapiji, ali je rezultatima dokazano da se ovaj dijetetski suplement može koristiti kao pomoćno sredstvo koje bi moglo biti posebno efikasno u ranim fazama subkliničke ateroskleroze, odnosno dislipidemije kao faktora rizika za razvoj ateroskleroze (kod osoba kod kojih je lipidni status poremećen, ali još uvek ne moraju koristiti lekove). Iako se ekstrakt lista artičoke često koristi istovremeno sa statinima, dobijeni rezultati ukazuju na postojanje interakcija između aktivnih komponenti ekstrakta i atorvastatina, o čemu treba voditi računa prilikom propisivanja terapije. Antioksidativno dejstvo se može pripisati samo nekim komponentama ELA,

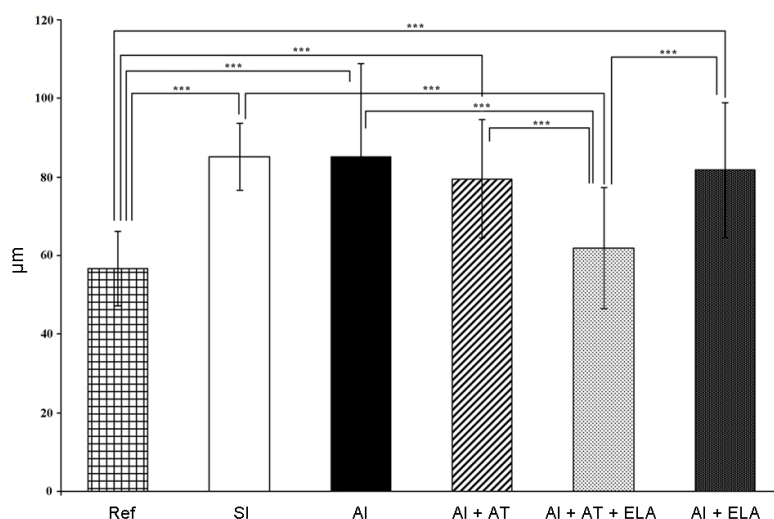
kao što su flavonoidi i hidrosicimetne kiseline za koje je dokazano da su efikasni donori vodonika i helatni agensi (180). Slično dejstvo se pripisuje i kafeinskoj i hlorogenskoj kiselini. Ove kiseline stimulišu formiranje hidroksil radikala i sprečavaju  $\text{Cu}^{2+}$ -indukovanu oksidaciju LDL čestica. Uloga ELA u zaštiti LDL od oksidativnih modifikacija je dokazana i *in vitro* testovima (94). Gebhardt (181) smatra da se deo antioksidativnog efekta ELA može pripisati komponentama ekstrakta kao što su hlorogenska kiselina, flavonoidi ili cinarin, ali ukupno antioksidativno dejstvo je značajno veće od onog koje bi moglo poticati od pojedinačnih aktivnih komponenti.

## 4.4. REZULTATI ISPITIVANJA UTICAJA ATORVASTATINA I EKSTRAKTA LISTA ARTIČOKE NA DEBLJINU ZIDA TRBUŠNE AORTE I MORFOLOGIJU JETRE

### 4.4.1. Rezultati ispitivanja debljine zida trbušne aorte

Debljina zida trbušne aorte je parametar koji se koristi za predviđanje rizika od razvoja kardiovaskularnih bolesti (12). Povećanje vrednosti ovog parametra ukazuje na oštećenje arterijskog zida usled formiranja plaka, do čega dolazi tokom procesa aterogeneze.

Aterogena ishrana je dovela do značajnog povećanja debljine zida trbušne aorte u poređenju sa pacovima koji su bili na standardnoj ishrani (Sl. 72). U grafik su uključeni i rezultati dobijeni od tri referentne životinje koje su žrtvovane na samom početku eksperimenta čime je eliminisan uticaj stresa i sedentarnog načina života kome su bile izložene ostale grupe životinja.



**Slika 72.** Debljina zida trbušne aorte (µm) nakon šest nedelja terapije (zvezdice prikazuju p vrednost između grupa povezanih linijom, \*\*\* p<0,001)



Svi vidovi terapije su doveli do smanjenja debljine zida trbušne aorte, ali je samo nakon terapije kombinacijom atorvastatina i ELA to smanjenje bilo statistički značajno, u poređenju sa grupom koja je bila na aterogenoj ishrani ( $p < 0,001$ ).

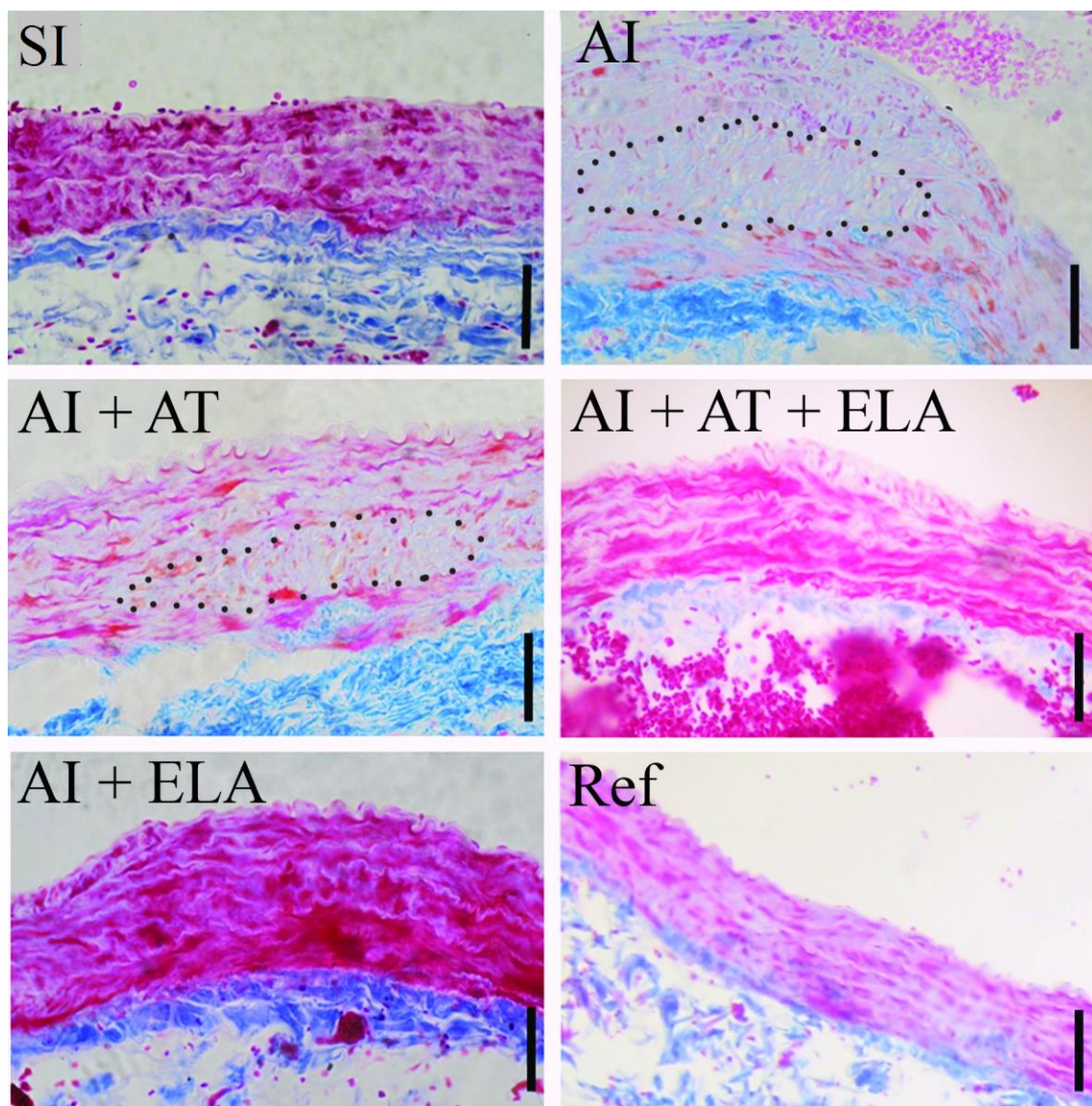
Urađena je i mikroskopska analiza uzoraka trbušne aorte, a dobijeni snimci su prikazani na Slici 73. Dobijeni rezultati ukazuju da je u većini eksperimentalnih grupa prisutna normalna organizacija slojeva mišićnih ćelija. Formiranje plaka se uočava kod grupe koja je bila na hrani obogaćenoj mastima (Sl. 73B) što je i očekivano jer je cilj aterogene ishrane i bio izazivanje aterosklerotskih promena. Na slici se uočava da nastali plakovi narušavaju normalnu organizaciju *tunicae mediae* zida trbušne aorte kod pacova sa aterosklerozom što je u skladu sa rezultatima drugih autora (10-12).

Plakovi se uočavaju i u grupi koja je bila na terapiji atorvastatinom, što ukazuje da atorvastatin nije uspeo da regeneriše zid trbušne aorte tokom relativno kratkog trajanja eksperimenta. Zanimljiv je zaključak do kog su došli Yonemura i saradnici (182), da je abdominalna aorta manje osetljiva na antihiperlipidemijsku terapiju od torakalne aorte. Ovi istraživači su na humanom modelu pokazali da godinu dana terapije atorvastatinom dovodi do smanjenja plakova uočenih na zidu torakalne aorte; na zidu trbušne aorte ovaj proces nije intenzivan. Drugi autori (183) su došli do zaključka da velika doza atorvastatina dovodi do smanjenja debljine zida karotidne aorte, ali tek nakon 26 nedelja terapije.

Rezultati su pokazali da terapija ekstraktom lista artičoke obnavlja oštećeni arterijski zid tj. dovodi do smanjenja debljine zida i povlačenja plaka formiranog u aterogenezi. Do sličnog rezultata su došli Asgary i saradnici (184) koji su poredili efekat lovastatina i vodeno-alkoholnog ekstrakta kantariona (*Hypericum perforatum*) na lezije prisutne u zidu grudne aorte zečeva gde se pokazalo da je ispitivani biljni ekstrakt bolji antioksidans od statina.

Kod većine ostalih markera, najpovoljniji efekat je dobijen korišćenjem ekstrakta lista artičoke, dok je kombinacija sa atorvastatinom imala manje povoljno dejstvo. Aditivno

dejstvo atorvastatina i ekstrakta lista artičoke se najbolje uočava kod praćenja debljine zida trbušne aorte.



**Slika 73.** Fotomikrografski presek trbušne aorte (Azan trihromatsko bojenje, skala 50  $\mu\text{m}$ )

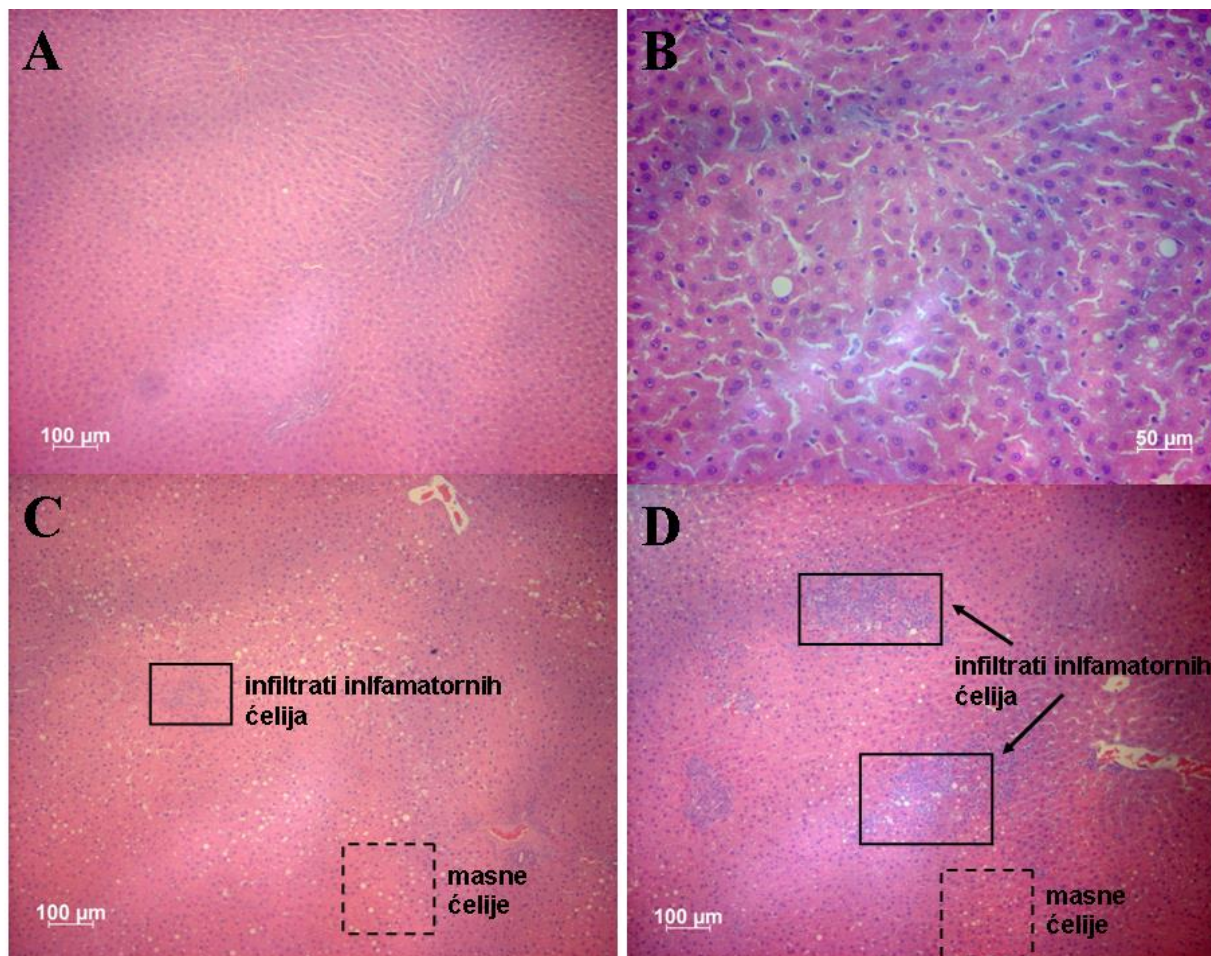
## 4.4.2. Rezultati ispitivanja morfologije jetre

Cilj ovog ispitivanja je bio da se utvrdi da li terapija atorvastatinom može regenerisati oštećeno tkivo jetre kod pacova koji su bili na aterogenoj ishrani.

Histopatološka ispitivanja su urađena na uzorcima jetre životinja koje su tokom celog eksperimenta bile na normalnoj ishrani, kao i kod pacova koji su bili na terapiji atorvastatinom (nakon tri i šest nedelja terapije).

Snimak svetlosnim mikroskopom histoloških preparata jetre pacova koji su bili na normalnoj ishrani ukazuje na normalnu arhitekturu režnjeva i morfološke karakteristike hepatocita, odnosno odsustvo patoloških promena (Sl. 74 A i B). Kod grupe koja je bila na aterogenoj ishrani i istovremeno primala atorvastatin, primećuje se da je došlo do degeneracije i nekroze hepatocita i do infiltracije inflamatornih ćelija u tkivo jetre (Sl. 74 C i D), odnosno, da je došlo do destrukcije normalne arhitekture tkiva jetre. Slični rezultati su dobijeni nakon tri i šest nedelja terapije. Promene u izgledu jetre pacova koji su bili na aterogenoj ishrani su uočene i odmah, nakon žrtvovanja životinja. Na Slici 75. se vidi jetra pacova koji je hranjen normalnom hranom, a na Slici 76. jetra životinje koja je bila na aterogenoj ishrani. Masna, nekrotična jetra kod pacova sa aterosklerozom se uočava i golim okom.

Histopatološki nalaz tkiva jetre ukazuje da je aterogena ishrana pokrenula proces aterogeneze i u jetri izazvala promene koje su i očekivane za ovakvo stanje. Terapija atorvastatinom nije dovela do regeneracije oštećene jetre nakon tri, ali ni nakon šest nedelja terapije. Ovim je potvrđeno da je potrebna znatno duža terapija da bi se povukla oštećenja koja su se javila tokom uznapredovale ateroskleroze.



**Slika 74.** Histopatološki nalaz tkiva jetre (A i B – uzorci životinja koje su bile na standardnoj ishrani, C – uzorak nakon tri nedelje terapije atorvastatinom, D – uzorak nakon šest nedelja terapije atorvastatinom)



**Slika 75.** Žrtvovana životinja koja je bila na standardnoj ishrani



**Slika 76.** Žrtvovana životinja koja je bila na ishrani sa povećanim sadržajem masti

## **5.ZAKLJUČAK**

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- HPLC metoda za određivanje sadržaja atorvastatina, *orto*-hidroksiatorvastatina, *para*-hidroksiatorvastatina i atorvastatin laktone u uzorcima plazme pacova je optimizovana primenom hemometrijskog pristupa. Kao preliminarni, *screening* dizajn primenjen je  $2^3$  pun faktorski dizajn sa centralnom tačkom. Optimalni hromatografski uslovi su procenjeni *face centered* centralnim kompozitnim dizajnom primenom Derringer-ove funkcije poželjnih odgovora. Vrednosti ispitivanih promenljivih veličina pri kojima je ostvarena najveća vrednost globalne funkcije poželjnih odgovora su: 61,93 % acetonitrila, temperatura kolone 31,44 °C i protok mobilne faze 1,03 mL/min. Korišćena je ZORBAX Eclipse Plus C18 Analytical (4,6 mm x 250 mm, 5 µm prečnik čestica) hromatografska kolona. Talasna dužina detekcije je 254 nm.
- Optimizovanom HPLC metodom je postignuto dobro razdvajanje analiziranih jedinjenja u uzorcima standardnih rastvora kao i u uzorcima plazme eksperimentalnih životinja. Ograničenja u primeni metode su se javila zbog nedovoljne osetljivosti detektora i niske koncentracije atorvastatina i metabolita u pripremljenim uzorcima (red veličine ng/mL ili manje). Metoda nije dalje validirana ali se može koristiti za određivanje atorvastatina i metabolita u uzorcima plazme životinja koje su na terapiji atorvastatinom u dužem vremenskom periodu.
- Optimizovana je i validirana LC-MS/MS metoda za određivanje koncentracije atorvastatina, *orto*-hidroksiatorvastatina, *para*-hidroksiatorvastatina i atorvastatin laktone u uzorcima plazme pacova. Uzorci plazme su pripremljeni čvrsto tečnom ekstrakcijom (SPE) na OASIS® HLB kertridžima (veličina kertridža 1 mL, punjen sa 30 mg OASIS® HLB polimernog sorbensa). Za analizu je korišćena ZORBAX Eclipse C18 Analytical (4,6 mm × 100 mm, 3,5 µm prečnik čestica) hromatografska kolona. Analiza je izvršena primenom mobilne faze: acetonitril - 0,1 % CH<sub>3</sub>COOH, uz gradijentno eluiranje, pri protoku od 400 µL/min, sobnu temperaturu kolone (25 °C) i temperaturu autosamplera 4 °C. Masena detekcija je izvršena na četiri zasebna kanala pri

čemu svaki kanal odgovara izabranom SRM prelazu ( $m/z$ , Q1  $\rightarrow$  Q3, energija kolizije): *orto*-hidroksi i *para*-hidroksiatorvastatin ( $m/z$ , 574,86  $\rightarrow$  439,65; 20 eV), atorvastatin ( $m/z$ , 558,9  $\rightarrow$  439,52; 22 eV), atorvastatin-lakton ( $m/z$ , 540,8  $\rightarrow$  447,6; 19 eV) i rosuvastatin ( $m/z$ , 481,75  $\rightarrow$  257,73; 31 eV i 299,74; 35 eV).

- Validiranom LC-MS/MS metodom je određen sadržaj atorvastatina i metabolita u uzorcima plazme pacova koji su tokom šest nedelja bili na terapiji atorvastatinom ili kombinaciji atorvastatina i ekstrakta lista artičoke. Dobijeni rezultati ukazuju da ekstrakt lista artičoke utiče na metabolizam atorvastatina tako što smanjuje koncentraciju atorvastatina i *para*-hidroksiatorvastatina, a povećava koncentraciju atorvastatin-laktona. Uticaj na koncentraciju *orto*-hidroksiatorvastatina je bio bez statističke značajnosti. Ovim je potvrđeno da se sastojci ekstrakta lista artičoke ponašaju kao induktori CYP3A4 enzima i da ravnotežu između kiselinskog i laktonskog oblika pomeraju ka laktonskom obliku.
- Terapija atorvastatinom i ekstraktom lista artičoke nije uspela smanjiti nivo praćenih lipidnih čestica, što je za očekivati obzirom na relativno kratko vreme trajanja eksperimenta.
- Rezultati dobijeni za parametre oksidativnog stresa (MDA, PAB) i antioksidativne zaštite (GSH, SH grupe, PON1, SOD) u plazmi, hemolizatu eritrocita i tkivu jetre ukazuju na antioksidativno dejstvo primenjene terapije (i atorvastatina i ekstrakta lista artičoke). Ekstrakt lista artičoke se pokazao boljim antioksidansom u odnosu na atorvastatin (posebno kada se primenjuje samostalno u terapiji, što se može objasniti mogućom interakcijom na nivou metabolizma).
- Potvrđeno je da se ekstrakt lista artičoke može koristiti kao pomoćno sredstvo u početnim fazama razvoja ateroskleroze.



## **6. LITERATURA**

1. Chetty P.S., Mayne L., Kan Z.Y., Lund-Katz S., Englander S.W., Phillips M.C. Apolipoprotein A-I helical structure and stability in discoidal high-density lipoprotein (HDL) particles by hydrogen exchange and mass spectrometry. *PNAS*, **2012**, *29*, 11687-11692.
2. Fryar C.D., Hirsch R., Eberhardt M.S., Yoon S.S., Wright J.D. Hypertension, high serum total cholesterol, and diabetes: racial and ethnic prevalence differences in U.S. adults, 1999-2006. *NCHS Data Brief*, **2010**, *36*, 1-8.
3. Linna M., Ahotupa M., Löppönen M.K., Irjala K., Vasankari T. Circulating oxidised LDL lipids, when proportioned to HDL-c, emerged as a risk factor of all-cause mortality in a population-based survival study. *Age Ageing*. **2013**, *42*, 110-113.
4. Nelson R.H. Hyperlipidemia as a Risk Factor for Cardiovascular Disease. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, **2013**, *40*, 195-211.
5. Dreschler M., Megens R.T.A., Van Zandvoort M., Weber C., Soehnlein O. Hyperlipidemia-Triggered Neutrophilia Promotes Early Atherosclerosis. *Circulation*, **2010**, *122*, 1837-1845.
6. Frostegård J. Low level natural antibodies against phosphorylcholine: A novel risk marker and potential mechanism in atherosclerosis and cardiovascular disease. *Clin. Immunol.* **2010**, *134*, 47-54.
7. Aronson D., Rayfield E.J. How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. *Cardiovasc. Diabetol.* **2002**, *1*, 1-10.
8. Sakellarios A.I., Siogkas P., Exarchos T., Stefanou K., Bourantas C.V., Athanasiou L., Fotiou E., Papafaklis M., Naka K.K., Michalis, Fotiadis D.I. Modelling LDL accumulation in the case of endothelial dysfunction. *Journal of the Serbian Society for Computational Mechanics*. **2011**, *5*, 90-100.
9. Ip J.H., Fuster V., Badimon L., Badimon J., Taubman M.B., Chesebro J.H. Syndromes of accelerated atherosclerosis: Role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1990**, *15*, 1667-1687.
10. Daemen M.J., Lombardi D.M., Bosman F.T., Schwartz S.M. Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ. Res.* **1991**, *68*, 450-456.

11. Bots M.L., Witteman J.C.M., Grobbee D.E. Carotid intima-media wall thickness in elderly women with and without atherosclerosis of the abdominal aorta. *Atherosclerosis*. **1993**, *102*, 99-105.
12. Järvisalo M.J., Jartti L., Nantö-Salonen K., Irjala K., Rönnemaa T., Hartiala J.J., Celermajer D.S., Raitakari O.T. Increased aortic intima-media thickness: a marker of preclinical atherosclerosis in high-risk children. *Circulation* **2001**, *104*, 2943-2947.
13. Griendling K.K., Fitzgerald G.A. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* **2003**, *108*, 1912-1916.
14. Heitzer T., Schlinzig T., Krohn K., Meinertz T., Münzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* **2001**, *104*, 2673-2678.
15. Landmesser U., Spiekermann S., Dikalov S., Tatge H., Wilke R., Kohler C., Harrison D.G., Hornig B., Drexler H. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure. *Circulation* **2002**, *106*, 3073–3078.
16. Ostend B., Bjorklid E. Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol. Rev.* **2003**, *83*, 1069–1112.
17. Schulz E., Gori T., Münzel T. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertens. Res.* **2011**, *34*, 665-673.
18. Förstermann U. Nitric Oxide and oxidative stress in vascular disease. *Eur. J. Physiol.* **2010**, *459*, 923-939.
19. Pearson T.A., Mensah G.A., Alexander R.W., Anderson J.L., Cannon R.O., Criqui M., Fadl Y.Y., Fortmann S.P., Hong Y., Myers G.L., Rifai N., Smith Jr S.C., Taubert K., Tracy R.P., Vinicor F. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* **2003**, *107*, 499–511.

20. Corrado E., Rizzo M., Coppola G., Fattouch K., Novo G., Marturana I., Ferrara F., Novo S. An update on the role of markers of inflammation in atherosclerosis. *J. Atheroscler. Thromb.* **2010**, *17*, 1-11.
21. Hulsmans M., Holvoet P. The vicious circle between oxidative stress and inflammation in atherosclerosis. *J. Cell. Mol. Med.* **2010**, *14*, 70-78.
22. Kutuk O., Basaga H. Inflammation meets oxidation: NF- $\kappa$ B as a mediator of initial lesion development in atherosclerosis. *Trends. Mol. Med.* **2003**, *9(12)*, 549–557.
23. Cominacini L., Pasini A.F., Garbin U., Davoli A., Tosetti M.L., Campagnola M., Rigoni A., Pastorino A.M., Lo Cascio V., Sawamura T. Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF- $\kappa$ B through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 12633–12638.
24. Stocker R., Keaney J.F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol. Rev.* **2004**, *84*, 1381–1478.
25. Rodrigo L., Mackness B., Durrington P.I., Hernandez A., Mackness M.I. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem. J.* **2001**, *354*, 1-7.
26. Yuan Y., Li P., Ye J. Lipid homeostasis and the formation of macrophage-derived foam cells in atherosclerosis. *Protein. Cell.* **2012**, *3*, 173-181.
27. Prosser H.C., Ng M.K.C., Bursill C.A. The role of cholesterol efflux in mechanisms of endothelial protection by HDL. *Curr. Opin. Lipidol.* **2012**, *3*, 182-189.
28. Farmer J.A., Liao J. Evolving concepts of the role of high-density lipoprotein in protection from atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2011**, *13*, 107-114.
29. Navab M., Reddy S.T., Van Lenten B.J., Fogelman A.M. HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nat. Rev. Cardiol.* **2011**, *8*, 222-232.
30. Hine D., Mackness B., Mackness M. Coincubation of PON1, APO A1, and LCAT increases the time HDL is able to prevent LDL oxidation. *Life.* **2012**, *64*, 157-161.

31. Deakin S.P., Bioletto S., Bochaton-Piallat M.L., James R.W. HDL-associated paraoxonase-1 can redistribute to cell membranes and influence sensitivity to oxidative stress. *Free. Radical. Bio. Med.* **2011**, *50*, 102-109.
32. Calabresi L., Franceschini G. Lecithin:cholesterol acyltransferase, high-density lipoproteins, and atheroprotection in humans. *Trends. Cardiovasc. Med.* **2010**, *20*, 50-53.
33. Kotosai M., Shimada S., Kanda M., Matsuda N., Sekido K., Shimizu Y., Tokumura A., Nakamura T., Murota K., Kawai Y., Terao J. Plasma HDL reduces nonesterified fatty acid hydroperoxides originating from oxidized LDL: a mechanism for its antioxidant ability. *Lipids.* **2013**, *48*, 569-578.
34. Staels B., Dallongeville J., Auwerx J., Schoonjans K., Leitersdorf E., Fruchart J.C. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation.* **1998**, *98*, 2088-2093.
35. Katsiki N., Nikolić D., Montalto G., Banach M., Mikhailidis D.P., Rizzo M. The role of fibrate treatment in dyslipidemia: An overview. *Curr. Pharm. Design.* **2013**, *19*, 3124-3131.
36. Kamanna V.S., Ganji S.H., Kashyap M.L. Recent advances in niacin and lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* **2013**, *24*, 239-245.
37. Ruparelia N., Digby J.E., Choudhury R.P. Effects of niacin on atherosclerosis and vascular function. *Curr. Opin. Cardiol.* **2011**, *26(1)*, 66-70.
38. Phan B.A.P., Dayspring T.D., Toth P.P. Ezetimibe therapy: mechanism of action and clinical update. *Vascular Health and Risk Management.* **2012**, *8*, 415-427.
39. Staels B., Handelsman Y., Fonseca V. Bile acid sequestrants for lipid and glucose control. *Curr. Diab. Rep.* **2010**, *10*, 70-77.
40. Stossel T.P. The discovery of statins. *Cell.* **2008**, *134*, 903-905.
41. Endo A. A historical perspective on the discovery of statins. *Proc. Jpn. Acad.* **2010**, *86*, 484-493.
42. Stancu C., Sima A. Statins: mechanism of action and effects. *J. Cell. Mol. Med.* **2001**, *5*, 378-387.
43. Da Costa R.F., Freire V.N., Bezerra E.M., Cavada B.S., Caetano E.W.S., De Lima Filho J.L., Albuquerque E.L. Explaining statin inhibition effectiveness of

- HMG-CoA reductase by quantum biochemistry computations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 1389-1398.
44. Paragh G., Törőcsik D., Seres I., Harangi M., Illyés L., Balogh Z., Kovács P. Effect of short treatment with simvastatin and atorvastatin on lipids and paraoxonase activity in patients with hyperlipoproteinaemia. *Curr. Med. Res. Opin.* **2004**, *20*, 1321-1327.
45. Nagila A., Permpongpaiboon T., Tantrarongroj S., Porapakham P., Chinwattana K., Deakin S., Porntadavity S. Effect of atorvastatin on paraoxonase1 (PON1) and oxidative status. *Pharmacol. Rep.* **2009**, *61*, 892-898.
46. Zhou Q., Liao J.K. Pleiotropic effects of statins: basic research and clinical perspectives. *Circ. J.* **2010**, *74*, 818-826.
47. Sanguigni V., Pignatelli P., Caccese D., Pulcinelli F.M., Lenti L., Magnaterra R., Martini F., Lauro R., Violi F. Increased platelet superoxide anion production in hypercholesterolemic patients. *Thromb. Haemostasis.* **2002**; *4*, 796-801.
48. Li W., Asagami T., Matsushita H., Lee K.H., Tsao P.S. Rosuvastatin attenuates monocyte-endothelial cell interactions and vascular free radical production in hypercholesterolemic mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**; *313*, 557-562.
49. Rikitake Y., Kawashima S., Takeshita S., Yamashita T., Azumi H., Yasuhara M., Nishi H., Inoue N., Yokoyama M. Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis.* **2001**; *154*, 87-96.
50. Sumi D., Hayashi T., Thankur N.K., Jayachandran M., Asai Y., Kano H., Matsui H., Iguchi A. A HMG-CoA reductase inhibitor possesses a potent anti-atherosclerotic effect other than serum lipid lowering effects – the relevance of endothelial nitric oxide synthase and superoxide anion scavenging action. *Atherosclerosis.* **2001**; *155*, 347-357.
51. Yasuhara M., Suzumura K., Tanaka K., Takahashi M., Aoki S., Odawara A., Narita H., Suzuki T. Fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, protects LDL from oxidative modification in hypercholesterolemic rabbits. *Biol. Pharm. Bull.* **2000**, *23*, 570-574.

52. Wassmann S., Laufs U., Muller K., Konkol C., Ahlbory K., Baumer A.T., Linz W., Böhm M., Nickenig G. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2002**, *22*, 300-305.
53. Wassmann S., Laufs U., Baumer A.T., Müller K., Ahlbory K., Linz W., Itter G., Rösen R., Böhm M., Nickenig G. HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. *Hypertension.* **2001**, *37*, 1450-1457.
54. Guzik T.J., Korbout R., Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Pharmacol.* **2003**, *54*, 469-487.
55. Rueckschloss U., Galle J., Holtz J., Zerkowski H.R., Morawietz H. Induction of NAD(P)H oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells: antioxidative potential of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor therapy. *Circulation.* **2001**, *104*, 1767-1772.
56. Laufs U., La Fata V., Plutzky J., Liao J.K. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation.* **1998**, *97*, 1129-1135.
57. Kureishi Y., Luo Z., Shiojima I., Bialik A., Fulton D., Lefer D.J., Sessa W.C., Walsh K. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 1004-1010.
58. Di Napoli P., Taccardi A.A., Grilli A., De Lutii M.A., Barsotti A., Felaco M., De Caterina R. Chronic treatment with rosuvastatin modulates nitric oxide synthase expression and reduces ischemia-reperfusion injury in rat hearts. *Cardiovasc. Res.* **2005**, *66*, 462-471.
59. Matsuki A., Igawa A., Nozawa T., Nakadate T., Igarashi N., Nonomura M., Inoue H. Early administration of fluvastatin, but not at the onset of ischemia or reperfusion, attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury through the nitric oxide pathway rather than its antioxidant property. *Circ. J.* **2006**, *70*, 1643-1649.
60. D'Annunzio V., Donato M., Erni L., Miksztowicz V., Buchholz B., Carrion C.L., Schreier L., Wikinski R., Gelpi R.J., Berg G., Basso N. Rosuvastatin given during reperfusion decreases infarct size and inhibits matrix metalloproteinase-2

- activity in normocholesterolemic and hypercholesterolemic rabbits. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2009**, *53*, 137-144.
61. Ignarro L.J. Physiology and pathophysiology of nitric oxide. *Kidney. Int. Suppl.* **1996**, *55*, S2-5.
  62. Sarti P., Forte E., Mastronicola D., Giuffrè A., Arese M. Cytochrome C oxidase and nitric oxide in action: Molecular mechanisms and pathophysiological implications. *BBA. Bio.* **2012**, *1817*, 610-619.
  63. Dimmeler S., Aicher A., Vasa M., Mildner-Rihm C., Adler K., Tiemann M., Rutten H., Fichtlscherer S., Martin H., Zeiher A.M. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J. Clin. Invest.* **2001**, *108*, 391-397.
  64. Laufs U., Gertz K., Huang P., Nickenig G., Bohm M., Dirnagl U., Endres M. Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke.* **2000**, *31*, 2442-2449.
  65. Aikawa M., Rabkin E., Sugiyama S., Voglic S.J., Fukumoto Y., Furukawa Y., Shiomi M., Schoen F.J., Libby P. An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. *Circulation.* **2001**, *103*, 276-283.
  66. Heeba G.H., Abd-Elghany M.I. Effect of combined administration of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and atorvastatin on the liver of rats. *Phytomedicine.* **2010**, *17*, 1076-1081.
  67. Aydin S., Uzun H., Sozer V., Altug T. Effects of atorvastatin therapy on protein oxidation and oxidative DNA damage in hypercholesterolemic rabbits. *Pharmacol. Res.* **2009**, *59*, 242-247.
  68. Amin K.A., Abd El-Twab T.M. Oxidative markers, nitric oxide and homocysteine alteration in hypercholesterolemic rats: role of atorvastatine and cinnamon. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **2009**, *2*, 254-265.
  69. Jiménez-Escrig A., Dragsted L.O., Daneshvar B., Pulido R., Saura-Calixto F. In vitro antioxidant activities of edible artichoke (*Cynara scolymus* L.) and effect



- on biomarkers of antioxidants in rats. *J. Agric. Food. Chem.* **2003**, *51*, 5540-5545.
70. Maron D.J., Fazio S., Linton M. Current perspectives on statins. *Circulation* **2000**, *101*, 207-213.
71. Holbrook A., Wright M., Sung M., Ribic C., Baker S. Statin-associated rhabdomyolysis: Is there a dose-response relationship? *Can. J. Cardiol.* **2011**, *27*, 146-151.
72. Bottorff M. Statin safety and drug interactions: clinical implications. *Am. J. Cardiol.* **2006**, *97*, 27C-31C.
73. Shitara Y., Sugiyama Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharmacol. Therapeut.* **2006**, *112*, 71-105.
74. Spinella M. The importance of pharmacological synergy in psychoactive herbal medicines. *Altern. Med. Rev.* **2002**, *7*, 130-137.
75. Zeng Y., Song J.X., Shen X.C. Herbal remedies supply a novel prospect for the treatment of atherosclerosis: a review of current mechanism studies. *Phytother. Res.* **2012**, *26*, 159-167.
76. Choi J.H., Rho M.C., Lee S.W., Kwon O.E., Park H.R., Kang J.Y., Lee S.H., Lee H.S., Bae K.H., Kim Y.K. Glabrol, an acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase inhibitor from licorice roots. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *110*, 563-566.
77. Yuan H.Y., Kuang S.Y., Zheng X., Ling H.Y., Yang Y.B., Yan P.K., Li K., Liao D.F. Curcumin inhibits cellular cholesterol accumulation by regulating SREBP-1/caveolin-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Acta. Pharmacol. Sin.* **2008**, *29*, 555-563.
78. Suanarunsawat T., Na Ayutthaya W.D., Songsak T., Thirawarapan S., Pongshompoo S. Antioxidant activity and lipid-lowering effect of essential oils extracted from *Ocimum Sanctum* L. leaves in rats fed with a high cholesterol diet. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2010**, *46*, 52-59.

79. Mai Le P., Benhaddou-Andalousi A., Elimadi A., Settaf A., Cherrah Y., Haddad P.S. The petroleum ether extract of *Nigella Sativa* exerts lipid-lowering and insulin-sensitizing actions in the rat. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *94*, 251-259.
80. Koo S.I., Noh S.K. Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of lipids: potential mechanism for its lipid-lowering effect. *J. Nutr. Biochem.* **2007**, *18*, 179-183.
81. Yeh Y.Y., Liu L. Cholesterol-lowering effect of garlic extracts and organosulfur compounds: human and animal studies. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 989S-993S.
82. Yan L.P., Chan S.W., Chan A.S., Chen S.L., Ma X.J., Xu H.X. Puerarin decreases serum total cholesterol and enhances thoracic aorta endothelial nitric oxide synthase expression in diet-induced hypercholesterolemic rats. *Life. Sci.* **2006**, *79*, 324-330.
83. Steinkamp-Fenske K., Bollinger L., Voller N., Xu H., Yao Y., Bauer R., Förstermann U., Li H. Ursolic acid from the Chinese herb danshen (*Salvia miltiorrhiza* L.) upregulates eNOS and downregulates Nox4 expression in human endothelial cells. *Atherosclerosis.* **2007**, *195*, e104-e111.
84. Moon M.K., Kang D.G., Lee A.S., Yeom K.B., Kim J.S., Lee H.S. Anti-atherogenic effects of the aqueous extract of rhubarb in rats fed an atherogenic diet. *Am. J. Chin. Med.* **2008**, *36*, 555-568.
85. Zhang W., Xu X.L., Wang Y.Q., Wang C.H., Zhu W.Z. Effects of 2,3,4',5-tetrahydroxystilbene 2-O-beta-D-glucoside on vascular endothelial dysfunction in atherogenic-diet rats. *Planta. Med.* **2009b**, *75*, 1209-1214.
86. Lee S., Lim H.J., Park H.Y., Lee K.S., Park J.H., Jang Y. Berberine inhibits rat vascular smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and improves neointima formation after balloon injury in vivo. Berberine improves neointima formation in a rat model. *Atherosclerosis.* **2006**, *186*, 29-37.
87. Chan K.C., Ho H.H., Huang C.N., Lin M.C., Chen H.M., Wang C.J. Mulberry leaf extract inhibits vascular smooth muscle cell migration involving a block of small GTPase and Akt/NF-kappaB signals. *J. Agric. Food. Chem.* **2009**, *57*, 9147-9153.

88. Kähkönen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J.P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food. Chem.* **1999**, *47*, 3954-3962.
89. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical. Res.* **1995**, *22*, 375-383.
90. Llorach R., Espín J.C., Tomás-Barberán F.A., Ferreres F. Artichoke (*Cynara scolymus* L) byproducts as a potential source of health-promoting antioxidant phenolics. *J. Agric. Food. Chem.* **2002**, *50*, 3458-3464.
91. Wang M., Simon J.E., Aviles I.F., He K., Zheng Q., Tadmor Y. Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J. Agric. Food. Chem.* **2003**, *51*, 601-608.
92. Ogier N., Amiot M.J., Georgé S., Maillot M., Mallmann C., Maraninchi M., Morange S., Lescuyer J.F., Peltier S.L., Cardinault N. LDL-cholesterol-lowering effect of a dietary supplement with plant extracts in subjects with moderate hypercholesterolemia. *Eur. J. Nutr.* **2013**, *52*, 547-557.
93. Qinna N.A., Kamona B.S., Alhussainy T.M., Taha H., Badwan A.A., Matalka K.Z. Effects of prickly pear dried leaves, artichoke leaves, turmeric and garlic extracts, and their combinations on preventing dyslipidemia in rats. *ISRN Pharmacology*, **2012**.
94. Brown J.E., Rice-Evans C.A. Luteolin-rich artichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation in vitro. *Free. Radic. Res.* **1998**, *29*, 247-255.
95. Gebhardt R., Fausel M. Antioxidant and hepatoprotective effects of artichoke extracts and constituents in cultured rat hepatocytes. *Toxicol. In. Vitro.* **1997**, *11*, 669-672.
96. Kraft K. Artichoke leaf extract – Recent findings reflecting effects on lipid metabolism, liver and gastrointestinal tracts. *Phytomedicine* **1997**, *4*, 369-378.
97. Küskü-Kiraz Z., Mehmetçik G., Doğru-Abbasoğlu S., Uysal M. Artichoke leaf extract reduces oxidative stress and lipoprotein dyshomeostasis in rats fed on high cholesterol diet. *Phytother. Res.* **2004**, *24*, 565-570.

98. Mehmetçik G., Özdemirler G., Koçak-Toker N., Çevikbaş U., Uysal M. Effect of pretreatment with artichoke extract on carbon tetrachloride-induced liver injury and oxidative stress. *Exp. Toxicol. Pathol.* **2008**, *60*, 475-480.
99. Natarajan S.K., Thomas S., Ramamoorthy P., Basivireddy J., Pulimood A.B., Ramachandran A., Balasubramanian K.A. Oxidative stress in the development of liver cirrhosis: a comparison of two different experimental models. *J. Gastroen. Hepatol.* **2006**, *21*, 947-957.
100. Nagaraju P., Pasumarthy., Gopal N.V., Srinivas V.D.N., Padma S.V.N. Spectrophotometric methods for the determination of atorvastatin calcium in pure and its pharmaceutical dosage forms. *Asian J. Research Chem.* **2008**, *1*, 64-66.
101. Stanisz B., Kania L. Validation of HPLC method for determination of atorvastatin in tablets and for monitoring stability in solid phase. *Acta. Pol. Pharm.* **2006**, *63*, 471-476.
102. Ertürk S., Sevinç Aktaş E., Ersoy L., Fiçicioğlu S. An HPLC method for the determination of atorvastatin and its impurities in bulk drug and tablets. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2003**, *33(5)*, 1017-1023.
103. Petkovska R., Cornett C., Dimitrovska A. Development and validation of rapid resolution RP-HPLC method for simultaneous determination of atorvastatin and related compounds by use of chemometrics. *Anal. Lett.* **2008**, *41(6)*, 992-1009.
104. Polagani S.R., Pilli N.R., Gajula R., Gandu V. Simultaneous determination of atorvastatin, metformin and glimepiride in human plasma by LC-MS/MS and its application to a human pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical Analysis.* **2013**, *3*, 9-19.
105. Gajula R., Pilli N.R., Ravi V.B., Maddela R., Inamadugu J.K., Polagani S.R., Busa S. Simultaneous determination of atorvastatin and aspirin in human plasma by LC-MS/MS: Its pharmacokinetic application. *Sci. Pharm.* **2012**, *80(4)*, 923-940.
106. Pilli N.R., Inamadugu J.K., Mullangi R., Karra V.K., Vaidya J.R., Rao J.V. Simultaneous determination of atorvastatin, amlodipine, ramipril and benazepril in human plasma by LC-MS/MS and its application to a human pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.* **2011**, *25(4)*, 439-449.

107. Dey S., Sarkar S., Malakar J., Ghosh A., Gangopadhyay A., Mazumder B. Spectrophotometric method for simultaneous determination of atenolol and atorvastatin in tablet dosage forms. *Int. J. Pharm. Biomed. Res.* **2012**, *3(1)*, 40-43.
108. Valesky R.J., Liu L., Musson D.G., Zhao, J.J. Automated enzyme inhibition assay for the determination of atorvastatin-derived HMG-CoA reductase inhibitors in human plasma using radioactivity detection. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* **2008**, *57*, 61-69.
109. Posvar E.L., Radulovic L.L., Cilla D.D., Whitfield L.R., Sedman, A.J. Tolerance and pharmacokinetics of single-dose atorvastatin, a potent inhibitor of HMG-CoA reductase, in healthy subjects. *J. Clin. Pharmacol.* **1996**, *36*: 728-731.
110. Erk N. Development of electrochemical methods for determination of atorvastatin and analytical application to pharmaceutical products and spiked human plasma. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2004**, *34*, 1-7.
111. Altuntas T.G., Erk N. Liquid chromatographic determination of atorvastatin in bulk drug, tablets, and human plasma. *J. Liq. Chromatogr. Related. Technol.* **2004**, *27*, 83-93.
112. Bahrami G., Mohammadi B., Mirzaeei S., Kiani A. Determination of atorvastatin in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with UV detection. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **2005**, *826*, 41-45.
113. Shen H.R., Li Z.D., Zhong M.K. HPLC assay and pharmacokinetic study of atorvastatin in beagle dogs after oral administration of atorvastatin self-microemulsifying drug delivery system. *Pharmazie* **2006**, *61*, 18-20.
114. Zarghi A., Shafaati A., Foroutan S.M., Khoddam A. A simple and rapid HPLC method for the determination of atorvastatin in human plasma with UV detection and its application to pharmacokinetic studies. *Arzneimittelforschung* **2005**, *55*, 451-454.
115. Van Pelt C.K., Corso T.N., Schultz G.A., Lowes S., Henion J. A four-column parallel chromatography system for isocratic or gradient LC/MS analyses. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 582-588.

116. Miao X.S., Metcalfe C.D. Determination of pharmaceuticals in aqueous samples using positive and negative voltage switching microbore liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Mass. Spectrom.* **2003**, *38*, 27-34.
117. Jemal M., Ouyang Z., Chen B.C., Teitz D. Quantitation of the acid and lactone forms of atorvastatin and its biotransformation products in human serum by high-performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* **1999**, *13*, 1003-1015.
118. Macwan J.S., Ionita I.A., Dostalek M., Akhlaghi F. Development and validation of a sensitive, simple, and rapid method for simultaneous quantitation of atorvastatin and its acid and lactone metabolites by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 423-433.
119. Bullen W.W., Miller R.A., Hayes R.N. Development and validation of a high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for atorvastatin, ortho-hydroxy atorvastatin, and para-hydroxy atorvastatin in human, dog, and rat plasma. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **1999**, *10*, 55-66.
120. Nirogi R.V.S., Kandikere V.N., Shukla M., Mudigonda K., Maurya S., Boosi R., Anjaneyulu Y. Simultaneous quantification of atorvastatin and active metabolites in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using rosuvastatin as internal standard. *Biomed. Chromatogr.* **2006**, *20*, 924-936.
121. Hermann M., Christensen H., Reubsaet J.L.E. Determination of atorvastatin and metabolites in human plasma with solid-phase extraction followed by LC-tandem MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *382*, 1242-1249.
122. Partani P., Verma S.M., Gurule S., Khuroo A., Monif T. Simultaneous quantitation of atorvastatin and its two active metabolites in human plasma by liquid chromatography/(-) electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical Analysis.* **2014**, *4*, 26-36.
123. Borek-Dohalsky V., Huclova J., Barrett B., Nemeč B., Ulc I., Jelinek I. Validated HPLC-MS-MS method for simultaneous determination of atorvastatin

- and 2-hydroxyatorvastatin in human plasma-pharmacokinetic study. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 275-285.
124. Guillen D., Cofan F., Ros E., Millan O., Cofan M., Rimola A., Brunet M. Determination of atorvastatin and its metabolite ortho-hydroxyatorvastatin in human plasma by on-line anion-exchange solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 1687-1696.
125. Liu D., Jiang J., Zhou H., Hu P. Quantitative determination of atorvastatin and para-hydroxy atorvastatin in human plasma by LC-MS-MS. *J. Chromatogr. Sci.* **2008**, *46*, 862-866.
126. Ma L., Dong J., Chen X.J., Wang G.J. Development and validation of atorvastatin by LC-ESI-MS and application in bioequivalence research in healthy chinese volunteers. *Chromatographia.* **2007**, *65*, 737-741.
127. Thurman E.M., Mills M.S. Solid-Phase Extraction, Principles and Practise. John Wiley & Sons, New York **1998**.
128. Mutihac L., Mutihac R. Mining in chemometrics. *Anal. Chim. Acta.* **2008**, *612*, 1-18.
129. Vander Heyden Y., Nijhuis A., Smeyers-Verbeke J., Vandeginste B.G.M., Massart D.L. Guidance for robustness / ruggedness tests in method validation. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2001**, *24*, 723-753.
130. Ferreirós N., Iriarte G., Alonso R.M., Jiménez R.M. Multi-Simplex and experimental design as chemometric tools to optimize a SPE-HPLC-UV method for the determination of eprosartan in human plasma samples. *Talanta.* **2006**, *69*, 747-756.
131. Ferreira S.L.C., Bruns R.E., da Silva E.G.P., Dos Santos W.N.L., Quintella C.M., David J.M., de Andrade J.B., Breikreitz M.C., Jardim I.C.S.F., Neto B.B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *J. Chromatogr. A.* **2007**, *1158*, 2-14.
132. Brereton R.G. Chemometrics-Data analysis for the laboratory and chemical plant. John Wiley & Sons Ltd., The Atrium, Chichester, England, **2003**.

133. Lundstedt T., Seifert E., Abramo L., Thelin B., Nyström Å., Pettersen J., Bergman R. Experimental design and optimization. *Chemometr. Intell. Lab.* **1998**, *42*, 3-40.
134. Deming S.N., Morgan S.L. Experimental design: A Chemometric approach, 2<sup>nd</sup> edition, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, **1993**.
135. Jeong I.J., Kim K.J. An interactive desirability function method to multiresponse optimization. *Eur. J. Oper. Res.* **2009**, *195*, 412-426.
136. Ribardo C., Allen T.T. An alternative Desirability function for achieving six sigma quality. *Qual. Reliab. Eng. Int.* **2003**, *19*, 227-240.
137. Candiotti L.V., Robles J.C., Mantovani V.E., Goicoechea H.C. Multiple response optimization applied to the development of a capillary electrophoretic method for pharmaceutical analysis. *Talanta*, **2006**, *69*, 140-147.
138. European Medicines Agency, Guideline on bioanalytical method validation, July 2011
139. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. Food and Drug Administration. 2001.
140. Friedewald W.T., Levy R.I., Fredrickson D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* **1972**, *18(6)*, 499–502.
141. Misra H.P., Fridovich I. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 3170–3175.
142. Richter R.J., Furlong C.E. Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics* **1999**, *9*, 745-753.
143. Girotti M.J., Khan N., McLellan B.A. Early measurement of systemic lipid peroxidation products in plasma of major blunt trauma patients. *J. Trauma.* **1991**, *31*, 32-35.
144. Jollow D.J., Mitchell J.R., Zampaglione N., Gillette J.R. Bromobenzene-induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolite. *Pharmacology* **1974**, *11*, 151-169.



145. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70-77.
146. Alamdari D.H., Ghayour-Mobarhan M., Tavallaie S., Parizadeh M.R., Moohebaty M., Ghafoori F., Kazemi-Bajestani S.M.R., Paletas K., Pegiou T., Koliakos G. Prooxidant-antioxidant balance as a new risk factor in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Clin. Biochem.* **2008**, *41*, 375-380.
147. Barbera A., Gomis R.R., Prats N., Rodriguez-Gil J.E., Domingo M., Gomis R., Guinovart J.J. Tungstate is an effective antidiabetic agent in streptozotocin-induced diabetic rats: a long-term study. *Diabetologia* **2001**, *44*, 507-513.
148. Lins R.L., Matthys K.E., Verpooten G.A., Peeters P.C., Dratwa M., Stolear J.C., Lameire N.H. Pharmacokinetics of atorvastatin and its metabolites after single and multiple dosing in hypercholesterolaemic haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2003**, *18*, 967-976.
149. Bořek-Dohalský V., Huclová J., Barrett B., Němec B., Ulč I., Jelínek I. Validated HPLC-MS-MS method for simultaneous determination of atorvastatin and 2-hydroxyatorvastatin in human plasma – pharmacokinetic study. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 275-285.
150. Ghosh C., Jain I., Gaur S., Patel N., Upadhyay A., Chakraborty B.S. Simultaneous estimation of atorvastatin and its two metabolites from human plasma by ESI-LC-MS/MS. *Drug. Test. Anal.* **2011**, *3*, 352-362.
151. Yang D.J., Hwang L.S. Study on the conversion of three natural statins from lactone forms to their corresponding hydroxy acid forms and their determination in Pu-Erh tea. *J. Chromatogr. A.* **2006**, *1119*, 277-284.
152. Kearney A.S., Crawford L.F., Mehta S.C., Radebaugh G.W. The interconversion kinetics, equilibrium, and solubilities of the lactone and hydroxyacid forms of the HMG-CoA reductase inhibitor, CI-981. *Pharm. Res.* **1993**, *10*, 1461-1465.
153. Myers R.H., Montgomery D.C. Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments, 2nd ed.; John Wiley & Sons Inc.: New York, NY, USA, **2002**.

154. Sivakumar T., Manavalan R., Valliappan K. Global optimization using Derringer's desirability function: enantioselective determination of ketoprofen in formulations and in biological matrices. *Acta. Chromatogr.* **2007**, *19*, 29-47.
155. Engineering statistics hand book, Multiple response case, <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section5/pri532.htm>
156. Derringer G., Suich R. Simultaneous optimization of several response variables. *J. Qual. Techn.* **1980**, *12*, 214-219.
157. Jimidar M., Bourguignon B., Massart D.L. Application of Derringer's desirability function for the selection of optimum separation conditions in capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* **1996**, *740*, 109-117.
158. Sivakumar T., Manavalan R., Muralidharan C., Valliappan K. Multi-criteria decision making approach and experimental design as chemometric tools to optimize HPLC separation of domperidone and pantoprazole. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2007**, *43*, 1842-1848.
159. Kazakevich Y.V., LoBrutto R. HPLC for Pharmaceutical Scientists, Wiley-Interscience, New Jersey **2007**, 281-346.
160. Almeida A.M., Castel-Branco M.M., Falcão A.C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *J. Chromatogr. B.* **2002**, *774*, 215-222.
161. Wittenstein B., Klein M., Finckh B., Ullrich K., Kohlschütter A. Plasma antioxidants in pediatric patients with glycogen storage disease, diabetes mellitus, and hypercholesterolemia. *Free. Radical. Bio. Med.* **2002**, *33*, 103-110.
162. Wittemer S.M., Ploch M., Windeck T., Müller S.C., Drewelow B., Derendorf H., Veit M. Bioavailability and pharmacokinetics of caffeoylquinic acids and flavonoids after oral administration of Artichoke leaf extract in humans. *Phytomedicine*, **2005**, *12*, 28-38.
163. Azuma K., Ippoushi K., Nakayama M., Ito H., Higashio H., Terao J. Absorption of Chlorogenic Acid and Caffeic acid in rats after oral administration. *J. Agric. Food. Chem.* **2000**, *48*, 5496-5500.
164. Andrés L., Andreasson Å., Eggertsen R. Interaction between a commercially available St. John's wort product (Movina) and atorvastatin in patients with hypercholesterolemia. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2007**, *63*, 913-916.

165. Di Y.M., Li C.G., Xue C.C., Zhou S.F. Clinical drugs that interact with St.John's worth and implication in drug development. *Curr. Pharm. Design.* **2008**, *14*, 1723-1742.
166. Li X., Liu Y., Zhang H., Ren L., Li Q., Li N. Animal models for the atherosclerosis research: a review. *Protein. Cell.* **2011**, *2(3)*, 189-201.
167. Xu J., Gao H., Zhang L., Chen C., Yang W., Deng Q., Huang Q., Huang F. A combination of flaxseed oil and astaxanthin alleviates atherosclerosis risk factors in high fat diet fed rats. *Lipids. Health. Dis.* **2014**, *13*, 63.
168. Gorinstein S., Leontowicz H., Leontowicz M., Jesion I., Namiesnik J., Drzewiecki J., Park Y.S., Ham K.S., Giordani E., Trakhtenberg S. Influence of two cultivars of persimmon on atherosclerosis indices in rats fed cholesterol-containing diets: Investigation in vitro and in vivo. *Nutrition* **2011**, *27*, 838-846.
169. Balkan J., Doğru-Abbasoğlu S., Aykaç-Toker G., Uysal M. The effects of high cholesterol diets on lipids and oxidative stress in plasma, liver and aorta of rabbits and rats. *Nutr. Res.* **2004**, *24*, 229-234.
170. Vergnes L., Phan J., Strauss M., Tafuri S., Reue K. Cholesterol and cholate components of an atherogenic diet induce distinct stages of hepatic inflammatory gene expression. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 42774-42784.
171. Clarke A.T., Mills P.R. Atorvastatin associated liver disease. *Digest. Liver. Dis.* **2006**, *38*, 772-777.
172. Dalal I., Sengupta M., Paul S., Mishra A.N. Comparative study of the effect of atorvastatin and garlic extract in experimentally induced hypercholesterolemia in rabbits. *Int. J. Basic. Clin. Pharmacol.* **2013**, *2*, 397-402.
173. G., Koçak-Toker N., Uysal M. Effect of artichoke leaf extract on hepatic Kondo T., Hirose M., Kageyama K. Roles of oxidative stress and redox regulation in atherosclerosis. *J. Atheroscler. Thromb.* **2009**, *16*, 532-538.
174. Wittemer S.M., Veit M. Validated method for the determination of six metabolites derived from artichoke leaf extract in human plasma by high-performance liquid chromatography-coulometric-array detection. *J. Chromatogr. B.* **2003**, *793*, 367-375.

175. Fujino H., Saito T., Tsunenari Y., Kojima J., Sakaeda T. Metabolic properties of the acid and lactone forms of HMG-CoA reductase inhibitors. *Xenobiotica* **2004**, *34*, 961-971.
176. Aviram M., Rosenblat M., Bisgaier C.L., Newton R.S., Primo-Parmo S.L., La Du B.N. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. *J. Clin. Invest.* **1998**, *101*, 1581-1590.
177. Aviram M., Billecke S., Sorenson R., Bisgaier C., Newton R., Rosenblat M., Eroglu J., Hsu C., Dunlop C., La Du B. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different than that required for its arylesterase/paraoxonase activities: Selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1998**, *18*, 1617-1624.
178. Baskurt O.K., Farley R.A., Meishelman H.J. Erythrocyte aggregation tendency and cellular properties in horse, human, and rat: a comparative study. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology.* **1997**, *273*, 2604-2612.
179. Küçükgergin C., Aydin A.F., Özdemirler-Erata G., Mehmetçik and cardiac oxidative stress in rats fed on high cholesterol diet. *Biol. Trace. Elem. Res.* **2010**, *135*, 264-274.
180. Zapolska-Downar D., Zapolski-Downar A., Naruszewicz M., Siennicka A., Krasnodębska B., Kołodziej B. Protective properties of artichoke (*Cynara scolymus*) against oxidative stress induced in cultured endothelial cells and monocytes. *Life. Sci.* **2002**, *71*, 2897-2908.
181. Gebhardt R. Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artichoke (*Cynara scolymus* L.) against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharm.* **1997**, *144*, 279-286.
182. Yonemura A., Momiyama Y., Fayad Z.A., Ayaori M., Ohmori R., Higashi K., Kihara T., Sawada S., Iwamoto N., Ogura M., Taniguchi H., Kusuhara M., Nagata M., Nakamura H., Tamai S., Ohsuzu F. Effect of lipid-lowering therapy with atorvastatin on atherosclerotic aortic plaques detected by noninvasive magnetic resonance imaging. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2005**, *45*, 733-742.

183. Yu C.M., Zhang Q., Lam L., Lin H., Kong S.L., Chan W., Fung J.W.H., Cheng K.K.K., Chan I.H.S., Lee S.W.L., Sanderson J.E., Lam C.W.K. Comparison of intensive and low-dose atorvastatin therapy in the reduction of carotid intimal-medial thickness in patients with coronary heart disease. *Heart*. **2007**, 93, 933-939.
184. Asgary S., Solhpour A., Parkhideh S., Madani H., Mahzouni P., Kabiri N. Effect of hydroalcoholic extract of *Hypericum perforatum* on selected traditional and novel biochemical factors of cardiovascular diseases and atherosclerotic lesions in hypercholesterolemic rabbits: A comparison between the extract and lovastatin. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* **2012**, 4, 212-218.

## **7. PRILOZI**

## **PRILOG 1: Spisak publikovanih radova i saopštenja**

### **Spisak radova publikovanih u međunarodnim časopisima**

1. **M. Crevar Sakač, Z. Vujić, J. Brborić, V. Kuntić, S. Uskoković-Marković**, An improved HPLC method with the aid of a chemometric protocol: simultaneous determination of atorvastatin and its metabolites in plasma, *Molecules* (2013) 18, 2469-2482 **M22**
2. **M. Crevar Sakač, Z. Vujić, J. Kotur-Stevuljević, J. Ivanišević, Z. Jelić Ivanović, M. Milenković, M. Markelić, Z. Vujčić**, Effects of atorvastatin and aqueous-ethanolic artichoke leaf extract on oxidative stress in hypercholesterolemic rats, *Vojnosanitetski pregled (in press)* **M23**
3. **M. Crevar Sakač, Z. Vujić, Z. Vujčić, B. Marković, D. Vasiljević**, LC-MS/MS method for quantification of atorvastatin, o-hydroxyatorvastatin, phydroxyatorvastatin and atorvastatin-lactone in rat plasma, *Acta Chromatographica (in press)* **M23**

### **Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini (M33)**

1. **M. Crevar Sakač, Z. Vujić, V. Kuntić**, Development of LC-MS/MS method for determination of atorvastatin and its metabolites in biological samples. 12<sup>th</sup> International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, Serbia, September 22-26, 2014.

### **Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)**

1. **M. Crevar Sakač, Z. Vujić, V. Kuntić**, Optimization and validation of a sensitive and simple method for quantification of atorvastatin and its metabolites by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), 4<sup>th</sup> International Conference and Exhibition on Analytical & Bioanalytical Techniques, Las Vegas (USA), 2013

2. **M. Crevar Sakač**, Z. Vujić, J. Kotur Stevuljević, Effects of atorvastatin and artichoke leaf extract treatment on lipids and oxidative stress parameters in rats fed on high cholesterol diet, 4<sup>th</sup> International Conference and Exhibition on Analytical & Bioanalytical Techniques, Las Vegas (USA), 2013

**Usmeno izlaganje na skupu nacionalnog značaja (M62)**

1. **M. Crevar Sakač**, Z. Vujić, Uticaj ekstrakta lista artičoke (*Cynara scolymus*, L.) na metabolizam atorvastatina / Influence of Artichoke (*Cynara scolymus*, L.) Leaf Extract on Atorvastatin Metabolism, VI kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, Srbija, 2014

**Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64)**

1. **M. Crevar Sakač**, J. Kotur Stevuljević, Z. Vujić, Modulacija antioksidativnog delovanja atorvastatina primenom ekstrakta lista artičoke (*Cynara scolymus*, L.) / Modulation of antioxidative properties of atorvastatin by simultaneous use of artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaf extract, VI kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, Srbija, 2014



## 8. Biografija

Milkica Crevar Sakač je rođena 26.04.1981. godine u Karlovcu, Republika Hrvatska. Osnovnu školu je završila u Topuskom, Republika Hrvatska. Gimnaziju (prirodno-matematički smer) je završila u Pančevu kao nosilac Vukove diplome, a Farmaceutski fakultet u Beogradu upisala je školske 1999/2000. godine i diplomirala 2005. godine sa prosečnom ocenom 9,16. Po završetku fakulteta, obavila je pripravnički staž i položila stručni ispit za farmaceute. Od marta 2005. godine zaposlena je kao saradnik na Katedri za farmaceutsku hemiju, a 2007. godine izabrana je u zvanje asistenta za užu naučnu oblast Farmaceutska-medicinska hemija i strukturna analiza.

U toku naučno-istraživačkog rada bila je saradnik na dva projekta iz oblasti hemije koje finansira Ministarstvo za nauku i zaštitu životne sredine Republike Srbije. Doktorsku disertaciju pod nazivom „**Uticaj ekstrakta lista artičoke na metabolizam atorvastatina i optimizacija metoda tečne hromatografije za praćenje nastalih metabolita u biološkom materijalu**” uradila je pod rukovodstvom prof. dr Zorice Vujić. Autor je i koautor 5 radova štampanih u časopisima od međunarodnog značaja od kojih 3 rada čine deo doktorske teze (2 rada su prihvaćena za štampu), 1 rada štampanog u časopisu nacionalnog značaja, 1 rada štampanog u međunarodnom časopisu koji nije na SCI listi, 10 saopštenja sa naučnih skupova od kojih su 4 rezultati iz doktorske disertacije i 1 usmenog izlaganja na skupu nacionalnog značaja sa rezultatima iz doktorske disertacije.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Милкица Цревар Сакач

број индекса 11/06

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

"Утицај екстракта листа артичоке на метаболизам аторвастатина и оптимизација

метода течне хроматографије за праћење насталих метаболита у биолошком

материјалу"

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, 16.03.2015.

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милкица Цревар Сакач

Број индекса 11/06

Студијски програм фармацеутска хемија

Наслов рада "Утицај екстракта листа артичоке на метаболизам аторвастатина и оптимизација метода течне хроматографије за праћење насталих метаболита у биолошком материјалу"

Ментор др сц. Зорица Вујић, редовни професор

Потписани/а Милкица Цревар Сакач

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, 16.03.2015.

\_\_\_\_\_

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

"Утицај екстракта листа артичоке на метаболизам аторвастатина и оптимизација

---

метода течне хроматографије за праћење насталих метаболита у биолошком

материјалу"

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, 16.03.2015.

---

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.