

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta, održanoj 22.01.2015. godine, imenovana je komisija u sastavu:

1. Prof. dr Zorica Vujić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, mentor
2. Prof. dr Jelena Kotur Stevuljević, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
3. Prof. dr Zoran Vujčić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod nazivom „**Uticaj ekstrakta lista artičoke na metabolizam atorvastatina i optimizacija metoda tečne hromatografije za praćenje nastalih metabolita u biološkom materijalu**“, kandidata dipl. farm. Milkice Crevar Sakač, stručnog saradnika na Katedri za farmaceutsku hemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Članovi Komisije su pregledali priloženu disertaciju i podnose Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

1. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dipl. farm. Milkice Crevar Sakač pod nazivom „**Uticaj ekstrakta lista artičoke na metabolizam atorvastatina i optimizacija metoda tečne hromatografije za praćenje nastalih metabolita u biološkom materijalu**“ napisana je na 199 strana, sadrži 74 slike, 32 tabele i 1 prilog. Sastoji se od sledećih poglavlja: Uvod, Cilj rada, Eksperimentalni deo, Rezultati i diskusija, Zaključak, Literatura, Prilozi i Biografija. U doktorskoj disertaciji citirano je 184 literaturne reference.

Za izvođenje eksperimenata na životinjama dobijena je saglasnost Etičkog Komiteta Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj dozvole: 5/10, izdata 03.11.2010.).

2. Opis postignutih rezultata

U ovoj doktorskoj disertaciji je hemometrijskim pristupom optimizovana metoda visoko-efikasne tečne hromatografije (HPLC) za određivanje sadržaja atorvastatina (AT), *orto*-hidroksiatorvastatina (oOH-AT), *para*-hidroksiatorvastatina (pOH-AT) i atorvastatin-laktona (AT-L) u plazmi eksperimentalnih životinja. Metoda je optimizovana primenom eksperimentalnog dizajna (*Design of Experiments, DoE*). Kako bi se broj varijabli koje će biti ispitivane svele na što manji broj i da bi se izbegli kompleksni modeli velike varijabilnosti korišćen je 2^3 pun faktorski dizajn sa centralnom tačkom¹ u kombinaciji sa metodologijom površine odgovora (*Response Surface Methodology*)². Svi eksperimenti izvedeni su nasumično i svaki je ponovljen tri puta u cilju izračunavanja standardne greške. Odgovori sistema koji su praćeni su bili: 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). Iz 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 sistema dobijene su p-vrednosti manje od 0.05, što ukazuje na njihovu značajnost, pa su svi dalje posmatrani i u optimizacionom dizajnu.

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 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). Eksperimenti su izvođeni nasumično, da bi se minimizovao efekat varijabli koje nisu praćene.

Stepen uticaja varijable na odgovor određen je apsolutnom vrednošću koeficijenta (što je veća apsolutna vrednost koeficijenta koji stoji pored oznake varijable u jednačinama, veći je i uticaj te varijable). 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).

Derringer-ova funkcija poželjnih odgovora^{3,4} je najčešće korišćena multikriterijumska metoda, tj. metoda istovremene optimizacije više nezavisnih promenljivih prema više odgovora sistema. Individualna funkcija poželjnih odgovora (d_i) daje informacije kako kombinacije faktorskih nivoa zadovoljavaju postavljeni cilj za svaki od posmatranih odgovora sistema, dok se na osnovu globalne funkcije poželjnih odgovora (D) procenjuje u kom stepenu kombinacije faktorskih nivoa zadovoljavaju postavljene ciljeve za sve odgovore sistema⁵. Izračunavanja funkcije poželjnih odgovora su izvedena primenom programa Design-Expert® 7.0. Koordinate koje odgovaraju maksimumima prikazanih funkcija na odgovarajućim 3D dijagramima su izabrane kao najbolji hromatografski uslovi (61.93 % acetonitrila u mobilnoj fazi, temperatura kolone 31.44 °C i protok mobilne faze 1.03 mL/min).

Određivanjem pOH-AT, oOH-AT, AT i AT-L primenom HPLC metode u uzorcima plazme eksperimentalnih životinja koje su bile na terapiji atorvastatinom tokom šest nedelja nisu dobijeni zadovoljavajući rezultati. U daljem radu je korišćena metoda tečne hromatografije spregnuta sa masenim detektorom (LC-MS/MS) i selektivno praćenje zadanog produkt jona koji nastaje iz odgovarajućeg prekursora. Na ovaj način uređaj ne detektuje ostale jone eventualno prisutne u uzorku i osetljivost metode je značajno povećana.

Uzorci plazme eksperimentalnih životinja za HPLC i LC-MS/MS analizu su pripremani metodom čvrsto-tečne ekstrakcije (SPE) na C18 BakerBond kertridžima (veličina kertridža 1 mL, punjen sa 100 mg oktadecilsilanom), odnosno OASIS® HLB kertridžima (veličina kertridža 1 mL, punjen sa 30 mg OASIS® HLB polimernog sorbensa). SPE metoda je odabrana jer omogućava rad sa više uzoraka odjednom, daje čiste ekstrakte i dovodi do minimalne supresije jonizacije u masenom spektrometru.

Kao interni standard kod LC-MS/MS metode korišćen je rosuvastatin (IS). LC-MS/MS eksperimenti su rađeni na hromatografskim kolonama različite dužine sa ciljem 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 μ m). Mobilna faza se sastojala od acetonitrila i 0,1% CH₃COOH čiji odnos se menjao tokom vremena. Izabranim gradijentom je postignuto dobro razdvajanje, a analiza traje ukupno 8 minuta pri protoku od 400 μ L/min. Retencionna vremena ispitivanih jedinjenja su: 2.65 min (pOH-AT), 3.97 min (oOH-AT), 4.48 min (AT) i 6.25 min (AT-L).

Za analizu atorvastatina i njegovih metabolita izabrana je elektrosprej jonizacija (ESI) u pozitivnom modu. ESI metoda pripada tzv. „*soft*“ metodama koje karakteriše blaga jonizacija tokom koje nastaju uglavnom molekularni joni. Ova metoda se lako povezuje sa HPLC uređajem, funkcioniše pri nižim protocima i najbolja je za analizu većine polarnih i umereno

polarnih jedinjenja. Probnim eksperimentima je potvrđeno da se postiže veća osetljivost radom u pozitivnom modu što su potvrdili i drugi autori^{6,7}, pa je ovaj mod izabran za analizu atorvastatina i metabolita. Detekcija je izvršena praćenjem izabranih reakcija tj. SRM (*Selected Reaction Monitoring*) tehnikom. Prednost SRM tehnike je velika specifičnost pa se ova metoda najčešće koristi za kvantifikovanje više analita u kompleksnim smešama. Masena detekcija je izvršena na četiri zasebna kanala pri čemu je svaki kanal odgovarao izabranom SRM prelazu (m/z , Q1 → Q3, energija kolizije) (oOH-AT i pOH-AT se prate na istom kanalu (m/z , 574.86 → 439.65, 20 eV), AT (m/z , 558.9 → 439.52, 22 eV), AT-L (m/z , 540.8 → 447.6, 19 eV) i IS (beleži se signal kojim nastaju dva definisana fragmenta (m/z , 481.75 → 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)⁸ i Američke agencije za hranu i lekove (*Food and Drug Administration*, FDA)⁹.

Validirana SPE-LC-MS/MS metoda uspešno je primenjena za određivanje sadržaja AT, oOH-AT, pOH-AT i AT-L u plazmi pacova koji su primali 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 (ELA). Aterosklerotske promene kod pacova su izazvane primenom hrane obogaćene holesterolom, uz dodatak natrijum holata^{10,11}.

Eksperimentalne životinje su podeljene u 5 grupa od kojih je svaka bila 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 (NI) 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). 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 (tri nedelje su pacovi primali terapiju), a preostalih 6 iz svake grupe je žrtvovano 11 nedelja od početka eksperimenta (šest nedelja su pacovi primali terapiju).

U plazmi eksperimentalnih životinja su određene koncentracije: *alanin-aminotransferaze* (ALT), *aspartat-aminotransferaze* (AST), ukupnih proteina (TP), glukoze (GLU), ukupnog

holesterola (uHOL), triglicerida (TG), HDL-holesterola (HDL), LDL-holesterola (LDL) i nonHDL holesterola. Od markera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u plazmi su određivani: ukupna aktivnost enzima *superoksid-dizmutaze* (SOD) i *paraoksonaze 1* (PON1), koncentracije 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.

Dobijeni rezultati ukazuju da su primenom ishrane obogaćene mastima izazvane aterosklerotske promene kod eksperimentalnih životinja. Terapija atorvastatinom i ELA nije dovela do opadanja koncentracije lipidnih komponenti što se može objasniti relativno kratkim vremenom izvođenja eksperimenta tj. šest nedelja terapije nije bilo dovoljno da primenjena terapija smanji koncentraciju lipida koji su sve vreme unošeni hranom. 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.

U uzorcima plazme pacova koji su bili na terapiji atorvastatinom ili smešom atorvastatina i ELA određena je koncentracija leka i metabolita primenom validirane SPE-LC-MS/MS metode. Dobijeni rezultati ukazuju da ELA ubrzava metabolizam atorvastatina i pomera ravnotežu kiselina-lakton ka neaktivnom laktoskom obliku.

Kod eksperimentalnih životinja je merena i debljina zida trbušne aorte, parametra koji se koristi za predviđanje rizika od razvoja kardiovaskularnih bolesti¹⁰. Aterogena ishrana je dovela do značajnog povećanja debljine zida trbušne aorte u poređenju sa pacovima koji su sve vreme bili na standardnoj ishrani. 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 ($p < 0.001$). 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.

3. Uporedna analiza rezultata doktorske disertacije sa podacima iz literature

Ateroskleroza je hronično inflamatorno oboljenje koje nastaje kao posledica dugotrajnog taloženja masnih naslaga na unutrašnjim stranama zidova krvnih sudova. Najčešći izbor u terapiji ateroskleroze su statini, inhibitori *HMG-CoA reduktaze*. Obzirom da lekovi pokazuju i neželjene efekte, u prevenciji ili terapiji ateroskleroze se koriste i prirodni proizvodi za koje se smatra da su potpuno bezbedni.

Atorvastatin je hemijski [R-(R*,R*)]-2-(4-fluorofenil)- β,δ -dihidroksi-5-(1-metiletil)-3-fenil-4-[(fenilamino)karbonil]-1H -pirol-1-heptanska kiselina. Ovaj lek 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. Obzirom da veliki broj lekova metaboliše pod dejstvom CYP3A4 izoenzima, moguće su interakcije na nivou metabolizma sa drugim lekovima koji se istovremeno uzimaju o čemu se mora voditi računa. U istraživanju koje su izveli Nagila i saradnici¹¹ na pacijentima sa hiperholesterolemijom pokazalo se da atorvastatin ima antioksidativno dejstvo (snižava nivo malondialdehida, konjugovanih diena, ukupnih peroksida i smanjuje indeks oksidativnog stresa, a povećava ukupnu aktivnost supstanci sa antioksidativnim dejstvom i aktivnost *paraoksonaze*) i smanjuje koncentraciju lipidnih komponenti kao što su ukupni holesterol i LDL. U ovom radu se navodi uticaj atorvastatina na koncentraciju HDL čestica.

Artičoka (*Cynara scolymus* L.) je zeljasta, jednogodišnja biljka prirodno rasprostranjena širom Mediterana. Svi delovi artičoke su bogati jedinjenjima koja se ponašaju kao prirodni antioksidansi¹². *In vitro* istraživanja^{13,14} su pokazala da ekstrakt lista artičoke smanjuje nastanak reaktivnih kiseoničnih jedinjenja, oksidaciju LDL čestica i peroksidaciju lipida. Ovakvi rezultati istraživanja ukazuju da primena preparata na bazi artičoke može biti opravdana u prevenciji i/ili kao dopunska terapija lekovima koji se koriste u terapiji ateroskleroze.

U ovoj doktorskoj disertaciji kao životinjski model za izazivanje aterosklerotskih promena izabrani su pacovi koji su veoma rezistentni prema razvoju ateroskleroze i nisu najpovoljniji izbor. Ipak, oni se i dalje koriste jer su jeftini i lako im se obezbeđuje adekvatan smeštaj¹⁵.

Hiperlipidemija i aterosklerotske promene se mogu izazavati kod pacova nakon primene hrane obogaćene holesterolom tokom dužeg vremena, uz obavezan dodatak holne kiseline ili natrijum-holata. Natrijum-holat i holna kiselina deluju kao inhibitori jetrene *holesterol-7 α -hidroksilaze*, ali imaju i emulgujuće dejstvo, čime poboljšavaju apsorpciju holesterola iz gastrointestinalnog trakta¹⁶.

Porast aktivnosti jetrenih enzima (AST i ALT) je primećen kod grupa koje su bile na aterogenoj ishrani i/ili koje su primale atorvastatin (sam ili u kombinaciji sa ELA). 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 sve vreme. Porast aktivnosti jetrenih transaminaza kod hiperholesterolemičnih pacova je očekivan i javlja se zbog oštećenja ćelijske membrane hepatocita usled hiperlipidemije¹⁷. U literaturi postoje nalazi da atorvastatin može dovesti do blagog, prolaznog, povećanja aktivnosti ALT i AST¹⁸. Dobijeni rezultati su potvrdili podatke iz literature da ekstrakt lista artičoke ima hepatoprotektivno dejstvo i snižava nivo ALT i AST¹⁹. U izvedenom eksperimentu terapija atorvastatinom, ni ELA nije uspela smanjiti nivo LDL, ukupnog holesterola i nonHDL tokom šest nedelja tretmana, ali je primećeno usporavanje daljeg porasta koncentracije ovih parametara. Dalal i saradnici²⁰ su izveli eksperiment u kom su pratili efekat atorvastatina i ekstrakta belog luka na lipidne parametre kod zečeva nakon tri meseca terapije. Njihovi rezultati su pokazali da atorvastatin dovodi do usporavanja porasta koncentracije LDL čestica i triglicerida, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji. Antihiperlipidemijska terapija takođe nije uticala na nivo HDL holesterola, što je posebno neočekivano za terapiju atorvastatinom. Ovakvi rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora¹¹.

Rezultati ove doktorske disertacije potvrđuju da ekstrakt lista artičoke ispoljava antioksidativno dejstvo, koje je više izraženo nego kod leka atorvastatina. Sudeći po rezultatima drugih autora¹², ELA je bogat jedinjenjima koji su efikasni donori vodonika i helatni agensi. Uloga ELA u zaštiti LDL od oksidativnih modifikacija je dokazana i *in vitro* testovima¹³. Gebhardt¹⁴ 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.

Atorvastatin, primenjen u relativno niskoj dozi, se nije pokazao dobrim antioksidansom u plazmi i hemolizatu eritrocita pacova. Lek je pokazao antioksidativni efekat samo u uzorcima tkiva jetre, gde je doveo do smanjenja koncentracije MDA i povećanja koncentracije GSH. 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 autori²¹. Svi dobijeni rezultati ukazuju da šest nedelja nije dovoljno vreme trajanja terapije da bi atorvastatin ostvario povoljne efekte. Ovo potvrđuje i merenje zida trbušne aorte, jer se plakovi uočavaju i u grupi koja je bila na terapiji atorvastatinom, što znači da atorvastatin nije uspeo da regeneriše zid trbušne aorte tokom relativno kratkog trajanja eksperimenta. Drugi autori²² su došli do zaključka da velika doza atorvastatina dovodi do smanjenja debljine zida karotidne aorte, ali tek nakon 26 nedelja terapije.

U ovoj doktorskoj disertaciji dobijene vrednosti za većinu parametra oksidativnog stresa i antioksidative zaštite ukazuju da se ekstrakt lista artičoke ponaša kao bolji antioksidans kada se primenjuje sam nego kao kombinovana terapija sa atorvastatinom. Moguće objašnjenje ovakvih rezultata leži u interakciji komponenti ELA i atorvastatina na nivou metabolizma, što je potvrđeno istraživanjima drugih autora.

Poznato je da se atorvastatin intenzivno metaboliše u jetri, pod dejstvom CYP3A4 enzima koji učestvuje u metabolizmu mnogih drugih lekova²³. Pronađeno je više literaturnih podataka o metabolizmu komponenti ekstrakta lista artičoke u humanom²⁴ i životinjskom organizmu²⁵. Istraživači navode da se aktivni sastojci ekstrakta lista artičoke intenzivno metabolišu u jetri, kao i lek atorvastatin i da se ponašaju kao jaki induktori CYP3A4 enzima. Obzirom da dobar deo farmakoloških efekata i atorvastatina i ELA potiče od aktivnih metabolita, očekivano je da kombinovana primena (u jednoj dozi) pokazuje slabije efekte.

Interakcije AT i ELA su proučavane na osnovu praćenja određivanja koncentracije atorvastatina, oOH-AT, pOH-AT i AT-L u uzorcima plazme eksperimentalnih životinja tj. ispitivano je u kojoj meri istovremena primena leka i biljnog ekstrakta dovodi do promene koncentracije aktivnih metabolita AT. Da bi se obezbedilo praćenje i određivanje koncentracije aktivnih metabolita, potrebno je imati dovoljno osetljivu analitičku metodu kojom se mogu kvantifikovati veoma niske koncentracije metabolita u uzorcima.

Primena HPLC metoda ima određene prednosti u istraživanjima jer su HPLC instrumenti relativno jeftini i dostupni većini analitičkih laboratorija. Na početku eksperimenta cilj je bio da se optimizuje i primeni jednostavna i dovoljno osetljiva HPLC metoda za određivanje atorvastatina i metabolita u biološkom materijalu koja bi bila dovoljno dobra alternativa LC-MS/MS metodi. U literaturi su opisane HPLC metode za određivanje atorvastatina u biološkom materijalu²⁶, ali nisu opisane metode praćenja aktivnih metabolita jer je limit kvantifikacije relativno visok (20 ng/mL), pa HPLC metoda nije dovoljno osetljiva. HPLC metoda predložena u ovoj doktorskoj disertaciji je optimizovana primenom eksperimentalnog dizajna, ali i pored definisanja optimalnih uslova, niske koncentracije atorvastatina i

metabolita (red veličine ng/mL ili manje) u pripremljenim uzorcima su bile ispod limita detekcije te predložena metoda nije omogućavala dovoljnu osetljivost. U daljem radu je korišćena metoda sa masenim detektorom koji je značajno osetljiviji od UV detektora.

U literaturi postoji veliki broj opisanih LC-MS metoda za određivanje atorvastatina i njegovih aktivnih metabolita^{7,27} i relativno mali broj metoda određivanja sadržaja neaktivnog metabolita, atorvastatin-laktona^{6,28}. Prednost validirane LC-MS metode u odnosu na druge opisane metode^{6,28} je priprema uzoraka metodom čvrsto-tečne ekstrakcije koja je brza, jednostavna, daje čistije uzorke i dovodi do slabije supresije jona u odnosu na metode tečno-tečne ekstrakcije⁶ i precipitacije proteina²⁸, jednostavna mobilna faza i nizak limit kvantifikacije⁶.

Validirana SPE-LC-MS/MS metoda uspešno je primenjena za određivanje sadržaja atorvastatina, *o*-hidroksiatorvastatina, *p*-hidroksiatorvastatina i atorvastatin-laktona u plazmi pacova koji su primale samo atorvastatin ili atorvastatin u kombinaciji sa ekstraktom lista artičoke.

Citirana relevantna literatura

1. 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**.
2. 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.
3. Engineering statistics hand book, Multiple response case, <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section5/pri532.htm>
4. Derringer G., Suich R. Simultaneous optimization of several response variables. *J. Qual. Techn.* **1980**, *12*, 214-219.
5. 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.
6. 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.

7. 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.
8. European Medicines Agency, Guideline on bioanalytical method validation, July 2011
9. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. Food and Drug Administration. 2001.
10. Järvisalo M.J., Jartti L., Näntö-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.
11. Nagila A., Permpongpaiboon T., Tantrarongroj S., Porapakkham P., Chinwattana K., Deakin S., Porntadavity S. Effect of atorvastatin on paraoxonase1 (PON1) and oxidative status. *Pharmacol. Rep.* **2009**, *61*, 892-898.
12. Zapolska-Downar D., Zapolski-Downar A., Naruszewicz M., Siennicka A., Krasnodebska 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Balkan J., Dođru-Abbasođlu 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.
17. 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.
18. Clarke A.T., Mills P.R. Atorvastatin associated liver disease. *Digest. Liver. Dis.* **2006**, *38*, 772-777.

19. Kraft K. Artichoke leaf extract – Recent findings reflecting effects on lipid metabolism, liver and gastrointestinal tracts. *Phytomedicine* **1997**, *4*, 369-378.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Hermann M., Christensen H., Reubsæet 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.
28. 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.

4. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine sastavni deo doktorske disertacije

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**

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. 12th 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), 4th 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, 4th 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

5. Obrazloženje naučnog doprinosa doktorske disertacije

Stanja koja nastaju kao posledica razvoja ateroskleroze (ishemijska bolest srca, infarkt miokarda) su vodeći uzrok smrtnosti u svetu. Statini su lekovi izbora u terapiji aterosklerotskih promena, smatraju se sigurnim ali, u retkim slučajevima, mogu izazvati ozbiljne neželjene efekte (rabdomioliza) što ukazuje na značaj *in vivo* i *in vitro* ispitivanja ove grupe lekova. U terapiji aterosklerotskih promena često se, kao pomoćna terapija, koriste preparati biljnog porekla. Aktivni sastojci ovih preparata su različita polifenolna jedinjenja koja se ponašaju kao antioksidansi. Jedan od često primenjivanih preparata je tinktura lista artičoke, tj. vodeno-etanolni ekstrakt ove biljke koji koriste pacijenti na terapiji statinima kao dopunsku terapiju. U literaturi nema dovoljno podataka o mogućoj interakciji atorvastatina i aktivnih komponenti ekstrakta lista artičoke.

Praćenje efekta relativno male doze atorvastatina na osnovne biohemijske i lipidne parametre je pokazalo da šest nedelja terapije lekom nije dovoljno da dođe do snižavanja nivoa ukupnog holesterola, LDL i nonHDL čestica. Koncentracija parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite je određivana u plazmi, hemolizatu eritrocita i tkivu jetre pacova. Atorvastatin je, u relativno kratkom vremenu trajanja eksperimenta, pokazao slab

antioksidativni efekat što ukazuje na neophodnost dugotrajne terapije statinima. Nasuprot atorvastatinu, ekstrakt lista artičoke je ispoljio značajan antioksidativni efekat čime su potvrđeni rezultati drugih autora. Novina u ovoj doktorskoj disertaciji su rezultati dobijeni u uzorcima pacova koji su primali kombinovanu terapiju atorvastatinom i ekstraktom lista artičoke. Antioksidativni efekat kombinacije je manji u odnosu na efekat koji pokazuje sam ekstrakt biljne droge. Dobijeni rezultat potvrđuje postojanje interakcije između leka i polifenola prisutnih u artičoki verovatno zbog istih izoenzima koji učestvuju u reakcijama biotransformacija. Rezultati dobijeni iz plazme, hemolizata eritrocita i tkiva jetre su potvrđeni praćenjem morfologije jetre i merenjem debljine zida trbušne aorte.

Interakcija leka sa komponentama ekstrakta lista artičoke je praćena određivanjem koncentracije atorvastatina, aktivnih metabolita *p*-hidroksiatorvastatina i *o*-hidroksiatorvastatina i neaktivnog metabolita, atorvastatin-laktona u uzorcima plazme pacova. Eksperimenti su izvođeni primenom optimizovane i validirane SPE-LC-MS/MS metode. Iako u literaturi postoji veći broj metoda za određivanje atorvastatina i metabolita u biološkom materijalu, opisana metoda ima nekoliko prednosti. Uzorci se pripremaju metodom čvrsto-tečne ekstrakcije, postignut je nizak limit kvantifikacije i upotrebljena je jednostavna mobilna faza.

Dobijeni rezultati ukazuju na postojanje interakcije između atorvastatina i komponenti koje ulaze u sastav ekstrakta lista artičoke. Zaključeno je da ekstrakt artičoke ubrzava metabolizam atorvastatina i pomera ravnotežu između otvorenog, kiselinog i zatvorenog, laktonskog oblika ka neaktivnom laktonu.

6. Zaključak i predlog Komisije

Na osnovu izloženog komisija je zaključila da rezultati kandidata, diplomiranog farmaceuta Milkice Crevar Sakač, prikazani u okviru doktorske disertacije predstavljaju originalan i značajan naučni doprinos za oblast Farmaceutska medicinska hemija i strukturna analiza. Rezultati doktorske disertacije publikovani su u 2 rada u časopisima od međunarodnog značaja, od toga jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22) i jedan rad u međunarodnom časopisu (M23), kao i u vidu 1 saopštenja sa međunarodnih skupova štampanog u celini (M33), 2 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima

štampana u izvodu (M34), jednog usmenog izlaganja na skupu nacionalnog značaja (M62) i 2 saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64).

Uzimajući u obzir sve izloženo, Komisija u navedenom sastavu pozitivno ocenjuje doktorsku disertaciju dipl. farm. Milkice Crevar Sakač i predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj Izveštaj i uputi Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom:

„Uticaj ekstrakta lista artičoke na metabolizam atorvastatina i optimizacija metoda tečne hromatografije za praćenje nastalih metabolita u biološkom materijalu“

1. _____
dr sc. Zorica Vujić (mentor), redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
2. _____
dr sc. Jelena Kotur Stevuljević, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
3. _____
dr sc. Zoran Vujčić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

U Beogradu, 18.02.2015.