

# Određivanje antioksidativne aktivnosti statina HPLC-DPPH metodom

---

Džanija, Luka

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:035443>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Luka Džanija**

**Određivanje antioksidativne aktivnosti statina  
HPLC-DPPH metodom**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitika lijekova i izrađen u Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom dr. sc. Ane Mornar Turk.

Iskreno zahvaljujem svojoj mentorici, dr. sc. Danieli Amidžić Klarić koja me savjetovala i stručno vodila kroz izradu ovog diplomskog rada te bez čije pomoći ostvarenje ovog rada ne bi bilo moguće.

Također, zahvaljujem Mariu-Liviu Jeličiću, mag. appl. chem. i Edvinu Brusaču, mag. pharm., na pomoći prilikom provođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada. Zahvaljujem i prof.dr.sc. Ani Mornar Turk i ostalim članovima Zavoda za analitiku i kontrolu lijekova, jer su izvrsno vođenim predavanjima i laboratorijskim vježbama probudile u meni interes za područje djelovanja Zavoda.

Najveće hvala mojoj obitelji, kolegama i prijateljima na svojoj podršci tijekom studiranja. Sve zasluge pripadaju njima više nego meni.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Oksidativni stres .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Mehanizmi obrane od oksidativnog stresa .....	3
1.1.2. Kemijske metode određivanja antioksidativne aktivnosti .....	4
<b>1.2. Statini.....</b>	<b>7</b>
1.2.1. Povijest statina.....	8
1.2.2. Primjena statina .....	10
1.2.3. Nelipidni učinci statina.....	10
1.2.4. Mišićno koštane nuspojave statina.....	12
<b>1.3 Ateroskleroza .....</b>	<b>13</b>
1.3.1. Etiologija, patologija i epidemiologija bolesti.....	13
1.3.2. Uloga oksidativnog stresa u patogenezi ateroskleroze .....	14
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME .....</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Materijali.....</b>	<b>17</b>
3.1.1. Kemikalije .....	17
3.1.2. Uzorci .....	17
3.1.3. Radni instrumenti.....	17
3.1.4. Pribor i posuđe.....	17
3.1.5. Računalni programi .....	18
<b>3.2 Metode .....</b>	<b>18</b>
3.2.1. Priprema mobilne faze.....	18
3.2.2. Priprema ispitivanih otopina.....	18
3.2.3. HPLC-DPPH metoda .....	19
3.2.4. Statistička obrada podataka .....	20
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>21</b>
4.1. Validacija analitičke metode .....	21
4.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti statina .....	22
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>24</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>25</b>
<b>7. SAŽETAK/SUMMARY .....</b>	<b>29</b>

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

# 1. UVOD

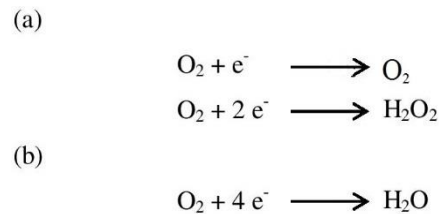
Prva izvješća o toksičnosti kisika iznio je Antoine Lavoisier već krajem 18. stoljeća, ubrzo nakon otkrića tog plina. Potkraj 19. stoljeća francuski zoolog Paul Bert prvi je opisao toksične učinke kisika na središnji živčani sustav, a nešto kasnije irska liječnica Lorrain Smith nizom pokusa dokazuje da izlaganje pokusnih životinja povećanom parcijalnom tlaku kisika dovodi do teške plućne opstruktivne bolesti. Međutim, sumnja znanstvene zajednice u prisutnost reaktivnih kisikovih spojeva u biološkim sustavima i njihovu uključenost u patofiziološke pojave trajala je sve do 1969. godine. Tada američki biokemičar Irwin Fridovich zajedno s Joeom McCordom iz uzorka goveđih eritrocita izolira enzim superoksid dismutazu (SOD) sa sposobnošću disproporcioniranja superoksidnog anion radikala do kisika i vodikova peroksida, što implicira da se superoksidni anion radikal stvara u fiziološkim uvjetima u organizmu. Njegovo otkriće se smatra jednim od najvažnijih otkrića na području (bio)kemije slobodnih radikala do danas (Knight, 1998).

## 1.1 Oksidativni stres

Reaktivni kisikovi spojevi (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*) su skupina spojeva nastalih parcijalnom redukcijom kisika (Ray i sur., 2012). Pojam ROS obuhvaća kisikove slobodne radikale: hidroksilni radikal ( $\text{OH}^\cdot$ ), superoksidni anion radikal ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), hidroperoksilni radikal ( $\text{HO}_2^\cdot$ ) i druge, ali u skupinu spadaju i neradikalni spojevi kao npr. vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ozon ( $\text{O}_3$ ), hipokloritna kiselina ( $\text{HOCl}$ ) i singletni kisik ( $^1\text{O}_2$ ). Osim toga, radi se o visokoreaktivnim i kemijski nestabilnim spojevima tako da se spojevi unutar skupine ROS razlikuju se po vremenu poluživota.

Ovi spojevi su sveprisutni u okolini. Egzogeni izvori ROS uključuju onečišćenja vode i zraka, prijelazne metale, dim, industrijska otapala, određene lijekove (npr. ciklosporin, gentamicin, takrolimus) i mnoge druge. Osim što s njima dolazi u kontakt preko brojnih egzogenih izvora, ljudski organizam neprestano proizvodi ove spojeve. Reakcija redukcije kisika u vodu je visokog potencijala, otprilike 0,8 V, ali također zahtijeva i visoku energiju aktivacije pa ju je stoga ponekad u respiratornome lancu teško postići. Kada se ta energija ne postigne, umjesto potpune redukcije molekularnog kisika do vode, dolazi do nastanka superoksidnog radikala odnosno vodikova peroksida (Slika 1) koji se daljnjim reakcijama (npr. Fentonova i skupina Fentonovoj sličnih reakcija, vezanje na endogene molekule ili enzimski kataliza) pretvaraju u

sekundarne ROS i druge radikale. (Ray i sur., 2012). Osim mitohondrijskog respiratornog lanca, ROS i RNS (engl. *Reactive Nitrogen Species*) proizvode i enzimi poput NADPH oksidaze i ksantin oksidaze, mijeloperoksidaze i lipooksigenaze.



Slika 1. Reakcije parcijalne (a) i potpune (b) redukcije kisika u odgovarajuće produkte

Nakupljanje ROS u stanici uzrokuje oštećenja staničnih struktura koje može rezultirati poremećajem u funkciji i smrću stanice. ROS reagiraju sa svim staničnim strukturama, prvenstveno uzrokujući oksidativna oštećenja lipidnih membrana (lipidna peroksidacija), ali i proteina i DNA. Sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa tako da aktiviraju (uzrokuju odvajanje inhibirajućih peptida) nekoliko skupina kinaza uključujući c-Jun-N-terminalne kinaze (JNK) i mitogenom-aktivirane proteinske kinaze (MAPK), koje su odgovorne za stanični odgovor na stres (Ray i sur, 2012). Kaskadom reakcija inducira se transkripcija proupalnih citokina i stanica se usmjerava prema apoptozi. Nekontrolirana i pretjerana apoptoza uzrokuje pojačan imunološki odgovor, što dovodi do dodatnog povećanja koncentracije i propagacije aktivnosti ROS u tkivu oštećenom oksidativnim stresom. Također, u stanicama vaskularnog endotela, superoksidni radikal može reagirati s dušikovim (II) oksidom stvarajući peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), što dovodi do pada u koncentraciji cGMP-a i sposobnosti vazodilatacije. Peroksinitritni anion zatim reagira s aminokiselinskim ostatcima endotelne sintaze dušikova (II) oksida (eNOS), uzrokujući oksidativno oštećenje eNOS i razgradnju u proteasomima, a u slučaju vezanja na aktivno mjesto može ireverzibilno inhibirati sintezu NO.

S druge strane, ROS su vrlo korisni u procesu uništavanja patogena, gdje im je uloga oštećenje makromolekulskih struktura radi gašenja virulencije i lakše fagocitoze. Uz sve dosad poznate i još mnogo potencijalnih neistraženih uloga ROS u organizmu, sa sigurnošću se može zaključiti da su redoks reakcije u čovjekovu organizmu neophodne za održavanje homeostaze i normalne funkcije (Makino i sur., 1999; Salisbury i Bronas, 2015; Adler i sur. 1999; Ligouri i sur., 2018).

Oksidativni stres definiran je kao potencijalno štetan poremećaj ravnoteže između razina antioksidansa i prooksidansa u organizmu u korist prooksidansa (Sies, 1997). Prooksidansi su tvari koje uzrokuju oksidativna oštećenja biomolekula. Radi se o visokoreaktivnim spojevima koji su većinom (premda postoje iznimke) slobodni radikali tj. imaju barem jedan valentni elektron nesparenog spina (Droge, 2002).

### 1.1.1 Mehanizmi obrane od oksidativnog stresa

Ljudski se organizam od štetnih učinaka oksidacije brani pomoću antioksidansa. Antioksidans je svaka tvar koja, prisutna u niskim koncentracijama u odnosu na oksidirajući supstrat, značajno produljuje vrijeme oksidacije ili inhibira oksidaciju tog supstrata. Prema podrijetlu, antioksidansi se dijele na enzimске (SOD, katalaza, glutationska peroksidaza) i neenzimске, pri čemu neenzimski antioksidansi mogu biti endogene ili egzogene tvari tj. nutrijenti (npr. vitamin E, vitamin C, flavonoidi, karotenoidi, neki metali) (Tablica 1) (Knight, 1998).

Glavna karakteristika antioksidansa je sposobnost prevencije oštećenja stanica stupanjem u reakciju sa slobodnim radikalima kako bi ih stabilizirali i/ili deaktivirali. Enzimski antioksidansi razgrađuju ROS na način da ih redukcijom prevode prvo u vodikov peroksid, a zatim u vodu u višestupanjskom procesu. Neenzimski antioksidansi reduciraju slobodne radikale, prevodeći ih tako u kemijski inaktivan oblik i prekidajući lančanu reakciju autooksidacije. Pri toj redukciji, neenzimski antioksidansi mogu sami poprimiti oblik radikala, no zbog svojih intrinzičnih svojstava bolje delokaliziraju naboj. Radi bolje delokalizacije naboja, manje su reaktivni nego prooksidansi te ne oštećuju stanične makromolekule (Ighodaro i Akinloye, 2018; www.inpharma.hr).

Tablica 1. Primjeri tvari s antioksidativnim učincima (Knight, 1998)

Enzimski antioksidansi		Neenzimski antioksidansi	
Enzimi	Neenzimski proteini antioksidativnih svojstava	Endogeni antioksidansi	Egzogeni antioksidansi (nutrijenti)
Superoksid dismutaza (SOD) Katalaza (CAT) Glutationska peroksidaza (GPx) Glutationska reduktaza (GSx)*	Ceruloplazmin Feritin Hemoglobin Laktoferin, Metalotionein, Mioglobin, Transferin	Bilirubin Mokraćna kiselina Glutation $\alpha$ -Lipoićna kiselina Koenzim Q Poliamini	Vitamini A, C, E Bioflavonoidi Antocijanoidi Selen (potreban za funkciju GPx) Bakar, Cink, Mangan (potrebni za funkciju SOD)

\* Glutationska reduktaza ne utječe direktno na koncentraciju prooksidansa, već služi za regeneraciju reduciranog oblika glutaciona, važnog endogenog antioksidansa

Iako endogeni antioksidansi imaju važnu ulogu u održavanju homeostatskih uvjeta u organizmu, učinak suplementacije antioksidansima još uvijek nije sa sigurnošću dokazan. Postoje prednosti suplementacije u propisanim dozama, pogotovo kod patoloških stanja, ali učinak može biti u nekim slučajevima nezamjetljiv ili čak i upitan. Pretpostavlja se da je uzrok tomu činjenica da ljudski organizam posjeduje dobro balansiran sustav slobodnih radikala i antioksidansa koji omogućava dostatnu neutralizaciju viška slobodnih radikala, uz održavanje njihovih fizioloških uloga. Dosadašnja istraživanja upućuju na pojavu “antioksidativnog/reduktivnog stresa”, poremećaja u funkciji enzimskih antioksidativnih sustava uzrokovanog pretjeranim unosom egzogenih antioksidansa, koji u iznimnim slučajevima može imati suprimirajući učinak na imunološki sustav i njegovu sposobnost uklanjanja imunogena i karcinogena (Chang i sur., 2018; Dundar i Aslan, 2000; Poljšak i Milisav 2011).

### **1.1.2. Kemijske metode određivanja antioksidativne aktivnosti**

Na osnovi principa kemijskih reakcija na kojima se temelje, kemijske metode za određivanje antioksidativne aktivnosti nekog uzorka najtočnije se mogu podijeliti u dvije skupine:

#### 1) Metode prijenosa atoma vodika

U metodama prijenosa atoma vodika (engl. *Hydrogen atom transfer methods*, HAT), kao što su naprimjer metoda određivanja kapaciteta za apsorpciju kisikovih radikala (engl. *oxygen radical absorbance capacity*, ORAC), TRAP (engl. *total radical trapping antioxidant parameter*), metoda izbjeljivanja beta karotena (engl. *beta carotene bleaching assay*, BCBA) i metoda izbjeljivanja krocina (engl. *crocin bleaching assay*, CBA) mjeri se sposobnost fenolnog antioksidansa da priguši (engl. *quenching*) reaktivnost peroksidnih radikala doniranjem protona. Antioksidativni potencijal se kvantificira na temelju gašenja fluorescencije fluorescentnih sonda dodanih u reakcijsku otopinu što se očituje kao promjena u apsorbanciji. S obzirom na to da radikal može reagirati s fluorescentnom sondom, što dovodi do pogrešaka pri mjerenju, paralelno s uzorkom radi se usporedna analiza kontrolne reakcijske smjese bez antioksidansa. Razlika u izmjerenoj promjeni apsorbancije pripisuje se učinku antioksidansa (Gupta, 2015).

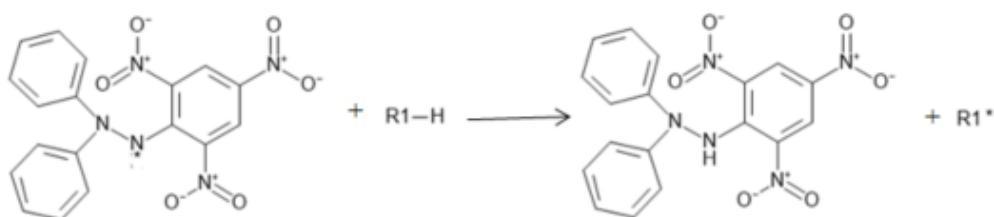
#### 2) Metode prijenosa elektrona



U metodama prijenosa elektrona (engl. *electron transfer methods*, ET), mjeri se direktna sposobnost antioksidansa da predaju elektron radikalnom reagensu. Predajom elektrona dolazi do gašenja radikalne aktivnosti reagensa i obično do promjene u boji reakcijske otopine. Važno je naglasiti kako je za ovu vrstu analitičkih metoda neophodan reagens koji stvara stabilne radikale (delokalizacijom naboja, oksidacijom kinonskih skupina, regrupacijom konjugiranih veza ili sl.). Kvantifikacija se vrši spektrofotometrijski, na temelju promjene apsorbancije na valnoj duljini specifičnoj za odabrani reagens. Zbog prirode reagensa, gašenje radikalne aktivnosti također se mjeri u kontrolnoj otopini, kako bi se isključio učinak autoterminacije nastalih radikala dimerizacijom. Najčešće korištene metode iz ove skupine su metoda s 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonskom kiselinom) (engl. *2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)*, ABTS), metoda mjerenja antioksidativne aktivnosti prema ekvivalentu TROLOX-a (engl. *Trolox equivalent antioxidant capacity*, TEAC) i metoda određivanja antioksidativnog potencijala pomoću 2,2-difenil-pikrilhidrazina (engl. *2,2-diphenyl-picrylhydrazine*, DPPH) (Moharram i Youssef, 2014).

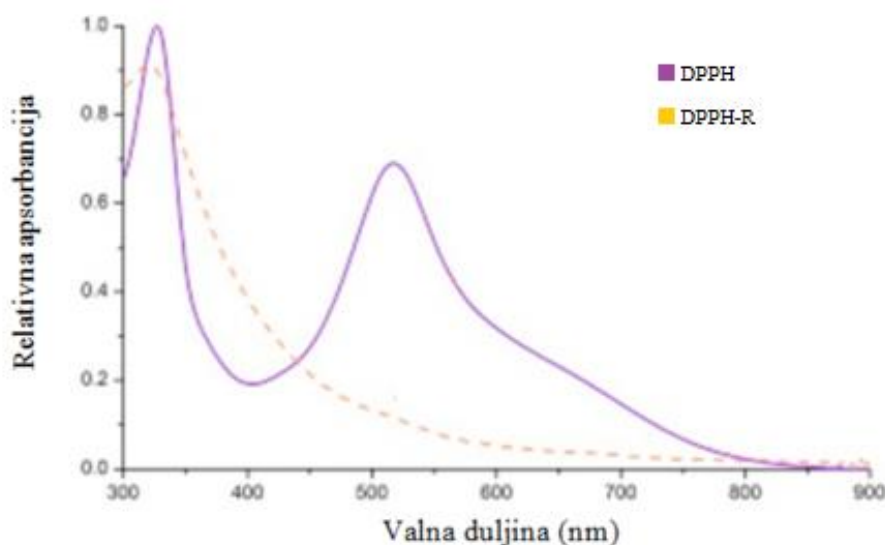
#### 1.1.2.1. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilni (DPPH<sup>•</sup>) reagens

Metodu određivanja antioksidativne aktivnosti spojeva pomoću kromogenog DPPH<sup>•</sup> reagensa utemeljio je Marsden Blois 1958. godine. Zbog svoje brzine, relativne jednostavnosti i ekonomske prihvatljivosti pokazala se kao izvrsna i široko korištena metoda probira u određivanju antioksidativne aktivnosti uzoraka. Temeljena je na sposobnosti DPPH<sup>•</sup> da oksidira antioksidans preuzimanjem vodika i prijeđe u neradikalni 2,2-difenil-1-pikrilhidrazin (Slika 2). Reagens je stabilan u polarnim organskim otapalima, a radi delokalizacije slobodnog elektrona etanolna otopina DPPH<sup>•</sup> tamnoljubičastog je obojenja te apsorbira na valnoj duljini od oko 520 nm.



Slika 2. Reakcija 2,2-difenil-pikrilhidrazilnog radikala i antioksidansa

Pri analitički relevantnim koncentracijama promjena u apsorbanciji prati Beer-Lambertov zakon. Nakon reakcije s uzorkom dolazi do obezbojenja reakcijske smjese i pada apsorbancije (Slika 3). Antioksidativna aktivnost uzorka izražava se u ekvivalentima aktivnosti standardnog antioksidansa, najčešće TROLOX-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkromanske kiseline). Nije neuobičajeno da se za standardizaciju koriste i galna kiselina, askorbinska kiselina, katehin i ostali spojevi sličnih svojstava, što uzrokuje probleme pri interpretaciji rezultata (Kedare i Singh, 2011; Abramović i sur., 2018).



Slika 3. UV-Vis spektri DPPH<sup>•</sup> te produkta reakcije terminacije, derivata 2,2-difenil-pikrilhidrazina (DPPH-R)

Uz sve pozitivne strane, ova metoda ipak ima nekoliko značajnih nedostataka. Osnovni nedostatak joj je, kao i kod svih ostalih *in vitro* kemijskih metoda određivanja antioksidativnog potencijala, slaba korelacija s *in vivo* učincima analiziranih spojeva. Nadalje, DPPH<sup>•</sup> može reagirati s Lewisovim bazama, kao i s kisikom što dovodi do pogreške pri mjerenju. Min i sur. (2006) pokazali su da apsorbancija DPPH<sup>•</sup> opada s izloženošću svjetlosti, a postoji i mogućnost interferencije s analitom pri mjerenju apsorbancije na zadanoj valnoj duljini (Kedare i Singh, 2011).

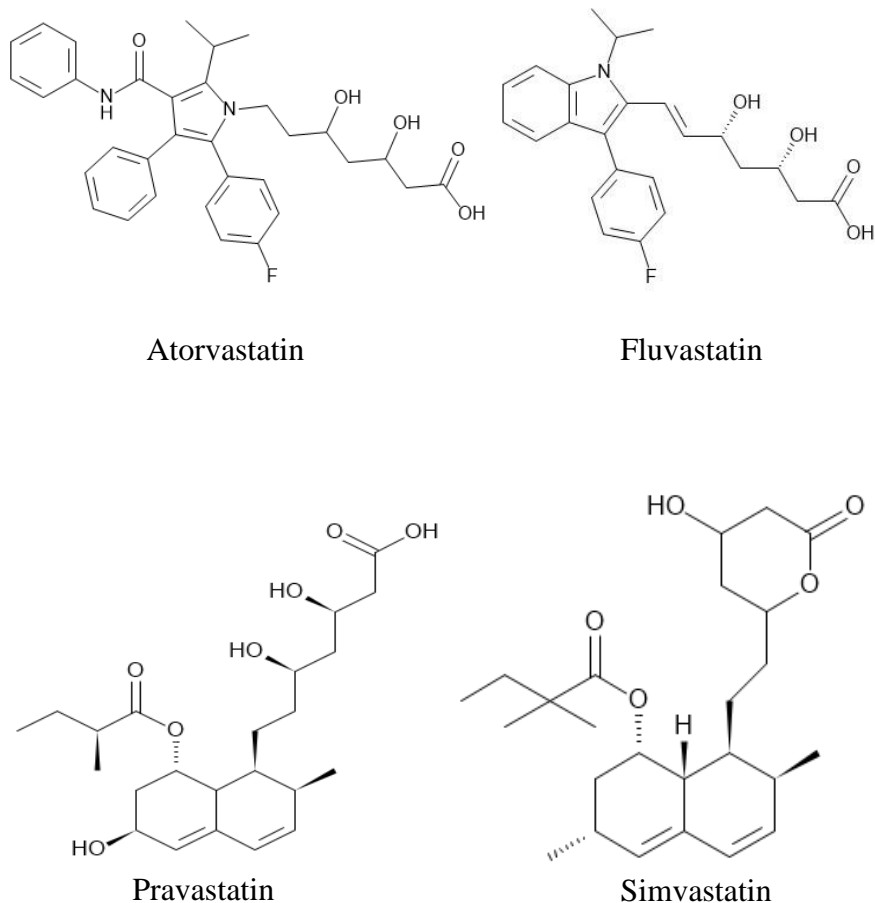
## 1.2. Statini

Statini su skupina lijekova koja djeluje na način da smanjuje sintezu kolesterola u jetri kompetitivno inhibirajući aktivnost enzima HMG-CoA reduktaze. Imitirajući prirodni supstrat (3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA), hidrofilnim laktonskim dijelom se vežu na aktivno mjesto ciljnog enzima, uz stvaranje dodatnih interakcija pomoću lipofilne (heksahidronaftalenske ili fluorofenilne) skupine. Na taj način usporavaju sintezu mevalonata, a posljedično i kolesterola. Svoj klinički učinak ispoljavaju tako da, s obzirom na smanjenu dostupnost novosintetiziranog kolesterola, uzrokuju pojačanu ekspresiju receptora za lipoprotein niske gustoće (eng. *low density lipoprotein*, LDL) na hepatocitima. Pojačana ekspresija receptora dovodi do povećane resorpcije LDL-a i ostalih apo-B lipoproteina u jetri, uključujući čestice bogate trigliceridima te sniženje razina tih čestica u plazmi (Catapano i sur., 2016).

Osnovna podjela statina izvodi se prema načinu dobivanja. Prirodni statini se dobivaju iz mikroorganizama, a jedini takav spoj koji se još uvijek nalazi u uporabi je lovastatin. Mevastatin nije odobren za uporabu na ljudima, ali se koristi kao prekursor u sintezi polusintetskog pravastatina. Drugi polusintetski derivat je simvastatin (Slika 4), sintetiziran metilacijom lovastatina na bočnom butiril-lancu. U skupinu potpuno sintetskih statina ubrajaju se atorvastatin, fluvastatin, rosuvastatin, pitavastatin te cerivastatin koji je povučen iz uporabe 2001. Prema lipofilnosti statini se dijele na hidrofilne (pravastatin, rosuvastatin) i lipofilne (svi ostali) (Sertić, 2013).

Farmakokinetička svojstva lijekova koji pripadaju skupini statina su izrazito heterogena. Biodostupnost varira u rasponu od 30 do 98% i nije u značajnoj korelaciji s drugim fizikalnim parametrima poput log P. Dobro se vežu za proteine plazme (>95%), uz pravastatin kao iznimku (43-55%). Svi se većim dijelom biotransformiraju putem CYP450 i eliminiraju hepatski, a najveći udio bubrežnog izlučivanja pokazuje pravastatin. Od svih statina, jedino atorvastatin ima dugačko poluvrijeme zadržavanja u plazmi (~16 sati), dok se ostali izlučuju relativno brzo ( $t_{1/2} < 3$  sata). Neovisno o farmakokinetičkim svojstvima statina, način primjene u praksi je za većinu bolesnika jednak, u jednoj dozi u večernjim satima. (Schachter, 2004.; Corsini i sur. 1999). Simvastatin, atorvastatin i lovastatin su se pokazali inhibitorima P-glikoproteina, dok naprimjer pravastatin nije pokazao inhibitornu aktivnost (Wang i sur. 2001).

Druga svojstva statina prikazana su u tablici 2. Treba uzeti u obzir da su podaci vezani uz lipofilnost dobiveni pomoću računalnih simulacija te da eksperimentalno dobivene vrijednosti mogu varirati ovisno o izvoru.



Atorvastatin

Fluvastatin

Pravastatin

Simvastatin

Slika 4. Strukturna formula analiziranih statina

### 1.2.1. Povijest statina

Prvim sintetiziranim statinom smatra se mevastatin (kompaktin, ML-236B), izoliran 1971. u Japanu iz plijesni *Penicillium citrinum*. Mevastatin i njegov analog lovastatin pokazali su se potentnim kompetitivnim inhibitorima HMG-CoA reduktaze, do 10000 puta većeg afiniteta za enzim nego supstrat HMG-CoA. Pozitivni rezultati u moduliranju serumskih koncentracija lipoproteina (smanjenje koncentracije beta-lipoproteina [LDL] i blagi porast koncentracije alfa-lipoproteina [HDL]) u ispitivanju učinkovitosti mevastatina kod životinja otvorili su put ispitivanjima na čovjeku te je mevastatin prvi put primijenjen u Sveučilišnoj bolnici u Osaki 1976. godine (Endo, 1992). Prvi statin koji je dobio odobrenje za uporabu u komercijalne svrhe bio je lovastatin, 1987. godine od strane FDA. (Food and Drug Administration). Od tada je nekoliko desetaka milijuna bolesnika liječeno statinima u svrhe primarne i sekundarne prevencije okluzivnih kardiovaskularnih događaja, a statini su se pokazali lijekovima od visoke koristi za javno zdravstvo (Harrington, 2017).

Tablica 2. Svojstva statina (Comptox.epa.gov, Drugbank.ca)

Lijek	Oblik dostupan u RH	DDD* prema HZZO	Lipofilnost	Potentnost terapije	Enzimi ključni za metabolizam
Atorvastatin	FOT**, tvrde kapsule	20 mg	lipofilan (log P= 5,41)	Srednja (do 20 mg/dan) ili visoka (40 do 80 mg/dan)	CYP 3A4, 3A5, 2C8
					UGT(uridindifosfat-glukurunozil transferaza) 1A1, 1A3
Fluvastatin	tablete s produljenim oslobađanjem	60 mg	lipofilan (log P= 3,91)	Niska (do 40 mg/dan p.o.) ili srednja (parenteralna primjena i više doze)	CYP 1A1, 2C8, 2C9, 2D6, 3A4, 3A5
					UGT 1A1, 2B7
Simvastatin	tablete, FOT	30 mg	lipofilan (log P= 4,72)	Niska (10 mg/dan) ili srednja (20 do 40 mg/dan)	CYP 3A4, 3A5, 2D6, 2C9, 2C19
					UGT 1A1, 1A3, 2B7
Rosuvastatin	tablete, FOT, tvrde kapsule	10 mg	hidrofilan (log P= 1,22)	Srednja (do 10 mg/dan) ili visoka (20 i više mg/dan)	CYP 2C9
Pravastatin	n/a***	n/a	hidrofilan (log P= 2,24)	Niska (do 20 mg/dan) ili srednja (40 i više mg/dan)	Glavni metaboliti nastaju raspadom lijeka u GIT-u, jednom kad se lijek apsorbira u sistemsku cirkulaciju izlučuje se nepromjenjen.

\*DDD- definirana dnevna doza

\*\*FOT-filmom obložene tablete

\*\*\*Lijek više nije dostupan na tržištu u Republici Hrvatskoj

### **1.2.2. Primjena statina**

Hrvatske smjernice za liječenje dislipidemija navode dislipidemijsku dijetu te ostale nefarmakološke mjere (smanjenje prekomjerne tjelesne mase, redovita tjelesna aktivnost) kao osnovnu mjeru liječenja. Ako se promjenom stila života ne ostvare ciljni rezultati, uvode se statini.

Glavna indikacija za liječenje statinima je hiperlipidemija u bolesnika s primarnom hiperkolesterolemijom ili kombiniranom hiperlipidemijom u kojoj dominira hiperkolesterolemija. Primjenjuju se također kod koronarnih bolesti srca te u sekundarnoj prevenciji kardiovaskularnih događaja (Francetić i sur., 2015).

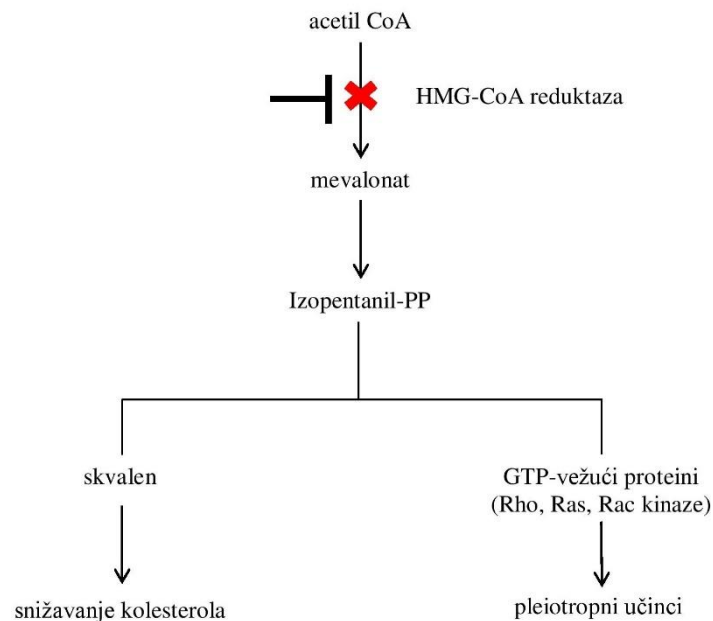
Na HZZO-ovoj listi lijekova trenutno se nalazi 156 lijekova pod 39 zaštićenih trgovačkih imena koji sadrže jedan od statina kao djelatnu tvar. Osim lijekova sa statinom kao samostalnom djelatnom tvari, postoje i kombinirani pripravci koji uz statin sadrže lijekove namijenjene za liječenje hiperkolesterolemije (npr. ezetimib), hipertrigliceridemije (npr. fenofibrat) i lijekove korištene u prevenciji kardiovaskularnih događaja (npr. amlodipin, perindopril).

Prema izvješću HALMED-a o potrošnji lijekova u Republici Hrvatskoj iz 2018. godine, terapijska skupina hipolipemika (C10 prema ATK klasifikaciji) u koju spadaju i statini na trećem je mjestu po potrošnji lijekova po DDD/1000 stanovnika/dan. Pojedinačno, atorvastatin, simvastatin i rosuvastatin se nalaze na popisu 50 najkorištenijih lijekova po DDD na 1000 stanovnika po danu, s time da je atorvastatin bio treći najkorišteniji lijek u Republici Hrvatskoj u 2018. Iz navedenih podataka može se zaključiti da su statini široko korišteni lijekovi od velike važnosti za javno zdravstvo ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

### **1.2.3. Nelipidni učinci statina**

Uz osnovni učinak na smanjenje razine kolesterola u plazmi, nizom je istraživanja (Antoniades i sur. 2011; Bleda i sur. 2011) dokazano da statini pozitivno utječu na endotelnu funkciju (povećavaju dostupnost NO), pokazuju imunomodulatorno djelovanje (snizuju razinu visoko osjetljivog c-reaktivnog proteina (hsCRP), koji je jedan od markera, ali i važan sastavni čimbenik upalnih procesa), povećavaju stabilnost plaka i usporavaju trombogenezu smanjujući dostupnost von Willebrandova faktora, faktora V i proteina C. Točnije, može se reći da uz učinke na razinu lipida u organizmu statini ostvaruju i tzv. “pleiotropne učinke” (Slika 5).

Klinički rezultat pleiotropnih učinaka statina je značajno brže sniženje kardiovaskularnog rizika kod bolesnika liječenih statinima u odnosu na bolesnike liječene drugim hipolipemicima. Inhibicijom sinteze mevalonata, osim razine kolesterola smanjuje se i dostupnost međuprodukata, među kojima su i izoprenoidi farnezil pirofosfat (FPP) i geranil pirofosfat (GGPP). Izoprenoidi imaju važnu ulogu u posttranslacijskoj modifikaciji signalnih proteina poput Ras, Rho i Rac (Fabijanić, 2010). *In vitro* studije pokazale su da primjena statina uzrokuje promjenu u aktivnosti navedenih signalnih proteina uz posljedično zaustavljanje stanične proliferacije i indukciju apoptoze. To saznanje se može pokazati korisnim u kočenju proliferacije fibroblasta i miofibroblasta, čija je abnormalna proliferacija prisutna kod aterosklerotskog oštećenja krvnih žila (Copaja i sur. 2011; Porter i sur. 2004). Pleiotropni učinci statina dokazani su i u *in vivo* studijama. Bonnet i sur. (2008) ustvrdili su pad koncentracije hsCRP u plazmi bolesnika liječenih atorvastatinom koji se pokazao ovisnim o dozi (55% u skupini bolesnika liječenoj atorvastatinom 80 mg, odnosno 14% u skupini liječenoj atorvastatinom 10 mg). Sličnim su se pokazali i rezultati studije koja je uključivala simvastatin i ezetimib, gdje je pad u koncentraciji hsCRP-a iznosio 64% u skupini koja je dobivala kombinaciju ovih dvaju lijekova u odnosu na skupinu koja je dobivala placebo. Međutim, zbog malog uzorka ispitanika i dvosmislenosti nekih rezultata, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se ustvrdio klinički učinak ovih saznanja (Kater i sur., 2010).



Slika 5. Pleiotropni učinci statina (preuzeto iz Fabijanić, 2010)

#### 1.2.4. Mišićno koštane nuspojave statina

Nuspojave koje se najčešće javljaju uz lijekove iz skupine statina su poremećaji mišićno koštanog sustava. Ti poremećaji mogu intenzitetom varirati od miopatije koja kao intervenciju obično zahtjeva samo prilagodbu doze statina do rhabdomiolize s zatajenjem bubrega kod koje je potrebno hitno bolničko liječenje. Pojavljuju se u 5-18% bolesnika liječenih statinima.

Glavnom fiziološkom osnovom ovih nuspojava smatra se nedostatak kolesterola u membranama mišićnih stanica, ali nisu isključeni drugi mehanizmi. Fabijanić (2010) navodi tri moguća uzroka:

1. Smanjena dostupnost kolesterola i ostalih izoprenoida u serumu i ostalim tkivima.
2. Poremećaj funkcije mitohondrija u miocitima.
3. Smanjena razina koenzima Q10 tj. ubikinona, sistemskog antioksidansa koji nastaje istim biosintetskim putem kao kolesterol.

Međutim, novije hipoteze uz smanjenje dostupnosti mevalonata, odnosno spojeva nastalih biosintezom iz mevalonata, kao mogućí uzrok nuspojava spominju i posljedično nakupljanje acetil-koenzima A (eng. *acetyl coenzyme A*, AcCoA). Analiza kompletnog ekspresoma i proteasoma ljudskih miocita tretiranih lipofilnim (simvastatin) i hidrofilnim (rosuvastatin) statinom, objavljena u časopisu Nature početkom tekuće godine (Grunwald i sur., 2020), ukazuje na promjenu ekspresije niza proteina koji sudjeluju u metaboličkom putu eikozanoida (npr. ciklooksigenaze, fosfolipaza A2 grupa 3, aldo-keto reduktaza 1D1 i sl.). Navedena promjena utječe na razinu dostupnih eikozanoida, specifično drastično smanjuje koncentraciju derivata omega 3, a povećava koncentraciju derivata omega 6 masnih kiselina, što je dokazano analizom supernatanta iznad statinima tretiranih miocita. S obzirom na to da se sve navedeno povezuje sa poremećajem u metabolizmu i smanjenjem sposobnosti razvoja miocita, kao potencijalno rješenje statinima izazvanih nuspojava u kliničkoj praksi navodi se suplementacija visokim dozama omega 3 masnih kiselina. Dakako, potrebna su daljnja *in vivo* ispitivanja ove teorije.

Korelacija između incidencije mišićno koštanih nuspojava statina i visine primjenjene doze je dokazana, a preduvjet za njihov nastanak bi mogli biti i drugi čimbenici poput genetskih polimorfizama. Dakako, incidencija raste i s primjenom lijekova koji inhibiraju citokromom P450 posredovan metabolizam statina čime je njihova razina u plazmi povećana (npr. antiretroviroci, azolni antifungici). Miopatije se biokemijski potvrđuju testom serumskih



aminaza, obično kreatin fosfokinaze (eng, *creatine kinase*, CK), ali mogu se javiti bolesnici koji osjete bol u mišićima bez klinički značajnog porasta razine CK.

Neovisno o ovoj, ali i ostalim skupinama nuspojava, statini predstavljaju neizostavan dio terapije u sekundarnoj prevenciji kardiovaskularnih događaja. U slučaju javljanja samo blažih oblika miopatija, terapija se pokušava nastaviti promjenom primjenjene doze ili lijeka, a tek kod težih oblika miopatija prelazi se na liječenje inhibitorima preproteina subtilizina-keksin peptidaze 9 (Fabijanić, 2010).

## 1.3 Ateroskleroza

### 1.3.1. Etiologija, patologija i epidemiologija bolesti

Ateroskleroza je multifaktorijalna sistemska krvožilna bolest tijekom koje dolazi do odlaganja lipida u stijenci arterija. Prema Američkom kardiološkom društvu (ACC, engl. *American college of cardiology*), dijeli se u 6 tipova (masne pjege, masne pruge, intermedijalne lezije, aterom, fibroaterom, komplicirane promjene). Patološki se očituje proliferacijom glatkomišićnih stanica, stvaranjem ateroma, otvrdnućem i ovapnjenjem stijenke arterija i suženjem ili aneurizmatiskim proširenjem njihova lumena. Najvažnije kliničke posljedice ateroskleroze uključuju ishemiju mozga, srca i donjih udova, no ateroskleroza može oštetiti i brojne druge organe tijela. (Damjanov i sur., 2018).

Današnji pogled na patogenezu ateroskleroze uključuje nekoliko važnih čimbenika u mehanizmu nastanka. Razvoj kroničnih sitnih oštećenja endotela krvnih žila uzrokuje povećanu propusnost i prijanjanje leukocita. Ulazak LDL-a i lipoproteina vrlo niske gustoće (eng. *very low-density lipoprotein*, VLDL) u žilnu intimu i njihova oksidacija uzrokuju transformaciju makrofaga i posljedično oštećenje vaskularnog endotela. Zbog oštećenja endotela, dolazi do adhezije trombocita i otpuštanja brojnih citokina i kemokina što uzrokuje migraciju stanica glatkog mišićja u intimu. Umnožavanje stanica glatkog mišićja, kao i svi prethodni čimbenici uzrokuju stvaranje izvanstaničnog matriksa s nakupljanjem kolagena i proteoglikana uz mikroskopske i makroskopske promjene na zahvaćenoj žili. Konačni rezultat je nastanak brojnih komplikacija koje uzrokuju gubitak funkcije krvne žile (Damjanov i sur., 2018).

Otpriblike polovina svih smrti u zapadnim zemljama uzrokovana je aterosklerozom (Damjanov i sur., 2018). U 2011. godini u Republici Hrvatskoj je radi infarkta miokarda (IM, šifra dijagnoze: I21) i cerebrovaskularnog inzulta (CVI, šifra dijagnoze I60-I69) zabilježeno

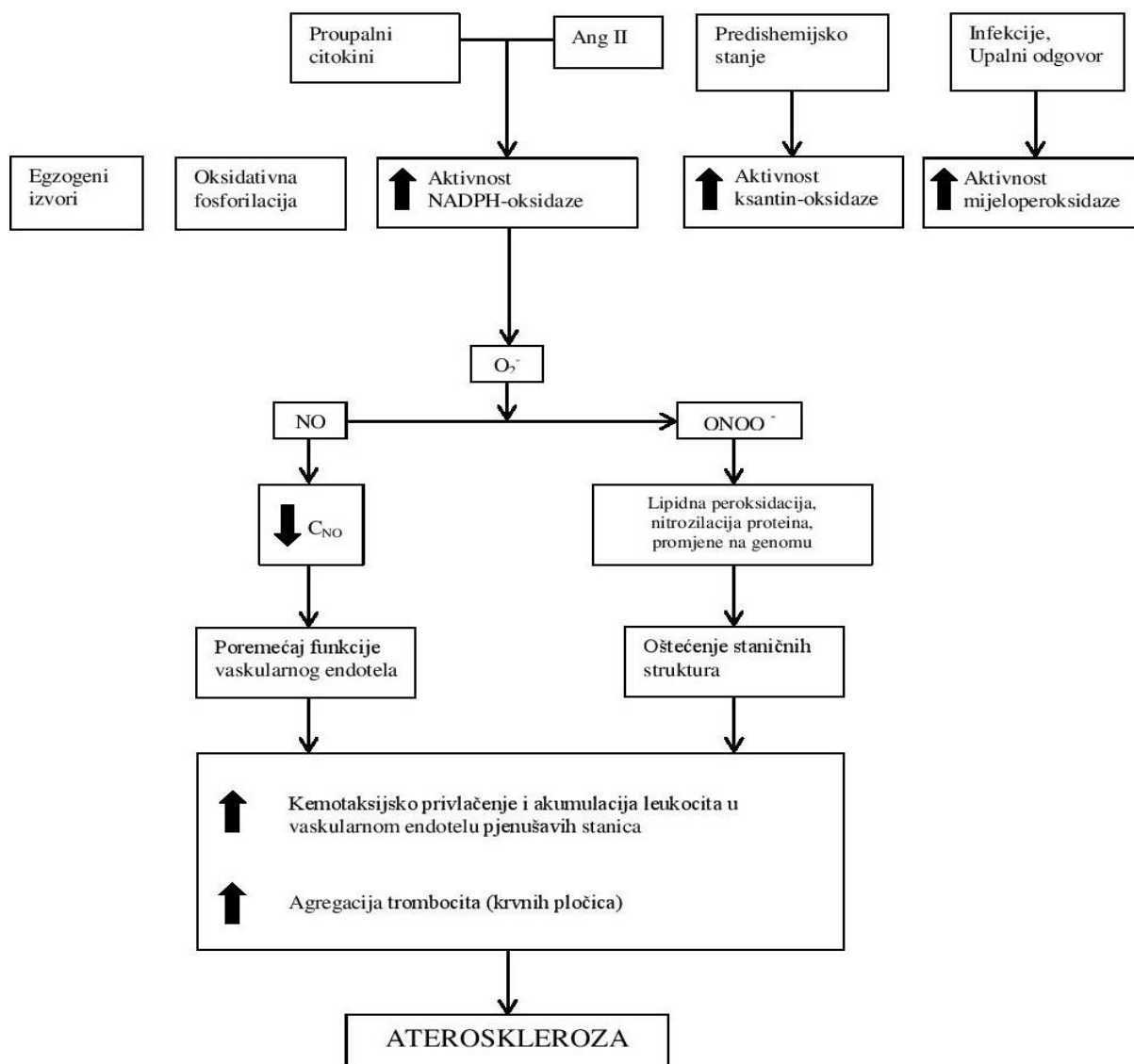
ukupno 25,614 hospitalizacija. Stopa hospitaliziranih osoba raste s dobi, a pretežito je viša u muškaraca u svim dobnim skupinama. Kod bolesnika hospitaliziranih radi IM letalitet je iznosio 11,9%, odnosno 24,7% kod bolesnika hospitaliziranih radi neodređenog CVI (Kralj i sur., 2013).

### **1.3.2. Uloga oksidativnog stresa u patogenezi ateroskleroze**

Za oksidativni stres se može reći da je prisutan u svakoj fazi ateroskleroze (Slika 6). Kod ateroskleroze, glavni endogeni izvori prooksidansa su enzimi respiratornog lanca u mitohondriju, eNOS, ksantin-oksidaža (XO, engl. *xanthine oxidase*) i NADPH-oksidaža (NOX, engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*). Iako u normalnim uvjetima enzimi proizvode većinu prooksidansa u ateromima i kardiovaskularnom sustavu općenito, ne smiju se zanemariti niti egzogeni čimbenici poput upalnog odgovora i ultraljubičastog zračenja.

Čestice oksidiranog LDL-a (oxLDL) nastaju oksidacijskim oštećenjima LDL-a, a ako se nalaze u povišenim koncentracijama u krvi uzrokuju kemotaksiju makrofaga, koji ih zatim uklanjaju fagocitozom. S obzirom na to da su, kao što je već navedeno, lizosomi makrofaga ispunjeni prooksidansima, u slučaju apoptoze makrofaga dolazi do izlivanja staničnog sadržaja i oksidativnih oštećenja okolnog tkiva. Kronična upala intime žilnog endotela nastala hiperprodukcijom prooksidansa rezultira oštećenjem funkcije i konstitucije žile te dodatnim kemotaksijskim privlačenjem makrofaga. Makrofagi imaju funkciju čišćenja oksidiranog LDL-a, produkta oksidativnog oštećenja LDL-a, nakon čega se talože u stijenci žile i pretvaraju u pjenušave stanice. Nakupljanje pjenušavih stanica uzrokuje oštećenje zahvaćene žile i nastanak aterosklerotskog plaka, čijim razvojem i oštećenjem dolazi do CVI i ostalih komplikacija ateroskleroze.

Općenito, smatra se da su RONS (engl. *reactive oxygen and nitrogen species*, reaktivne kisikove i dušikove vrste) jedan od pokretača aterosklerotskog oštećenja vaskularnog endotela (Yang i sur., 2017; Salisbury i Bronas, 2015).



Slika 6. Etiološki čimbenici prisutni u nastanku i razvoju ateroskleroze, a povezani s oksidativnim stresom (preuzeto i prilagođeno iz Salisbury i Bronas, 2015)

## 2. Obrazloženje teme

Komplikacije aterosklerozom uzrokovanih bolesti kao što su infarkt miokarda i cerebrovaskularni inzult su jedan od najčešćih uzroka smrti današnjice i velik teret kako za zdravstveni sustav, tako i za društvo u cjelosti. S obzirom da, kada se jednom pojave, uvelike umanjuju kvalitetu života bolesnika i zahtijevaju doživotnu terapiju lijekovima, jasna je važnost prevencije i kvalitetnog liječenja. Iako je patofiziološki mehanizam nastanka aterosklerotskih oštećenja krvnih žila kompliciran, mnogi uzročni čimbenici povezani su s oksidativnim stresom te se smatra da oksidativni stres pridonosi nastanku i razvoju ateroma.

Otkako su uvedeni u primjenu, statini su pokazali odlične rezultate u smanjivanju razine kolesterola u plazmi, a samim time i rizika od nastanka ponovnih okluzivnih kardiovaskularnih događaja. Njihova vrijednost za zdravstveni sustav proizlazi iz činjenice da osim glavnog farmakološkog mehanizma djelovanja, pokazuju niz imunomodulatornih pleiotropnih učinaka zbog kojih postižu veću učinkovitost u kliničkoj primjeni u usporedbi s drugim hipolipemicima.

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati i usporediti *in vitro* antioksidativnu aktivnost lijekova iz skupine statina (atorvastatina, fluvastatina, pravastatina i simvastatina) temeljem sposobnosti hvatanja 2,2-difenil-pikrilhidrazilnog radikala koristeći HPLC-DPPH metodu razvijenu na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova.

## 3. Materijali i metode

### 3.1 Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije

- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazin, DPPH, slobodni radikal, 95% (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina, TROLOX (Sigma-Aldrich, Švicarska)
- Metanol, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Pročišćena voda pripremljena WaterPro sustavom za pročišćavanje vode (WaterPro, Bedford, MA, SAD)

#### 3.1.2. Uzorci

- Atorvastatin, fluvastatin Na, pravastatin i simvastatin Na (Ph. Eur. Reference Standard)

#### 3.1.3. Radni instrumenti

- Sustav za pročišćavanje vode (Milipore, Bedford, Massachusetts, SAD)
- Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (Agilent 1100 Chromatograph, Agilent Technologies, WaldBronn, Njemačka)

#### 3.1.4. Pribor i posuđe

- Analitička vaga AG245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Boce za mobilnu fazu sustava za tekućinsku kromatografiju (DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj (Xtra TT, Elma Schmidbauer, Singen, Njemačka)
- Tresilica Lab Dencer- vortex (Ika- Werke GMBH&CO.KG, Njemačka)
- Filter za špricu (Chromafil Xtra 0,2  $\mu\text{m}$ , 25 mm, Macherey-Nagel GmbH CoKG, Njemačka)
- Automatske jednokanalne pipete podesivog volumena za pipetiranje uzoraka (Mettler Toledo Rainin, Švicarska)

- Kolona za tekućinsku kromatografiju XBridge C18, dimenzija 150 mm x 4,6 mm, veličina čestica 3,5  $\mu\text{m}$  (Waters, Milford, Connecticut, SAD)
- Tamne odmjerne tikvice klase A (ISOLAB, Wertheim, Njemačka)
- Eppendorf epruvete 2,0 mL (Eppendorf Corporate, Hamburg, Njemačka)

### 3.1.5. Računalni programi

- ChemStation (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Microsoft Office Excel (Microsoft, Seattle, Washington, SAD)
- MedChem Studio (Simulations Plus Inc., Lancaster, California, SAD)
- Statistica 12.1 (Starsoft Inc., SAD)

## 3.2 Metode

Određivanje antioksidativne aktivnosti statina provedeno je primjenom HPLC-DPPH metode.

### 3.2.1. Priprema mobilne faze

Mobilna faza je pripremljena miješanjem *metanola* čija čistoća odgovara kromatografskim zahtjevima i *ultra-čiste vode* dobivene pročišćavanjem pomoću WaterPro sustava (v:v = 80:20). Zatim je tako pripremljena otopina propuštena kroz sustav za vakuum filtraciju te degazirana 20 minuta korištenjem ultrazvučne kupelji.

### 3.2.2. Priprema ispitivanih otopina

Otopina statina: Otopina svakog pojedinačnog statina pripremljena je na način da je u Eppendorf epruvetu odvagana prikladna masa ispitivanog lijeka te otopljena u mobilnoj fazi tako da završna koncentracija svakog statina iznosi približno 1 mM u odmjernoj tikvici klase A od 10 mL.

DPPH otopina: DPPH otopina pripremljena je otapanjem prikladne mase (25 mg) ovog radikala u metanolu korištenjem tamne odmjerne tikvice klase A (25 mL) neposredno prije korištenja.

TROLOX otopina: Standardna otopine TROLOX-a pripremljena je otapanjem prikladne mase ovog sintetskog antioksidansa u metanolu tako da koncentracija iznosi 1 mM. Nakon toga, standardna otopina TROLOX-a korištena je za pripremu radnih standardnih otopina ovog antioksidansa pri izradi baždarnog pravca. Ukratko, standardna otopina antioksidansa razrijeđena je mobilnom fazom do željenih koncentracija radnih otopina TROLOX-a (0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25 i 0,30 mM).

### 3.2.3. HPLC-DPPH metoda

Za određivanje sposobnosti hvatanja DPPH radikala korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC). Parametri kromatografske analize su navedeni u tablici 3.

U Eppendorf epruvetu otpipetira se 1 mL otopine lijeka i 250  $\mu$ L DPPH otopine, zatim dobro promućka na Vortex mješalici te ostavi pri sobnoj temperature na tamnom mjestu. Nakon inkubacije od 30 minuta, otopina se filtrira kroz 0,20  $\mu$ m filter u tamni vial za HPLC te provede injektiranje i izokatna elacija prema kromatografskim uvjetima navedenim u Tablici 3. Sposobnost hvatanja DPPH radikala određena je iz razlike površine pika (AUC, engl. *Area Under the Curve*) početne otopine samog radikala (AUC<sub>0</sub>) i otopine radikala nakon reakcije s uzorkom (AUC<sub>UZORAK</sub>). Dobiveni rezultati izraženi su u ekvivalentima TROLOX-a (engl. *TROLOX Equivalent Antioxidant Capacity*, TEAC), a određivanje antioksidativne aktivnosti statina provedeno je u triplikatu.

Tablica 3. Kromatografski parametri primijenjene HPLC – DPPH metode

Instrument	Agilent 1100 Chromatograph
Detektor	Detektor s nizom dioda (engl. <i>diode array detector</i> , DAD)
Kolona	XBridge C18 (150 mm x 4,6 mm, veličina čestica 3,5 $\mu$ m)
Mobilna faza	metanol i ultra-čista voda (v:v = 80:20)
Temperatura kolone	(T) 25°C (77°F)
Volumen injektiranja	20 $\mu$ L
Protok	1 mL/min
Valna duljina detekcije	517 nm
Vrijeme zadržavanja DPPH	3,83 min
Ukupno vrijeme analize	4,50 min
Otapalo DPPH	Metanol
Otapalo za uzorke lijeka	metanol i ultra-čista voda (v:v = 80:20)

#### **3.2.4. Statistička obrada podataka**

Rezultati eksperimentalnog istraživanja obrađeni su računalnim programima Microsoft® Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, SAD) i Statistica 12.1 (StatSoft, Inc., SAD). Dobiveni podaci analizirani su primjenom deskriptivne statistike, a regresijskom analizom dobivena je jednadžbe pravca i pripadajući koeficijenti korelacije  $r$ .



## 4. Rezultati i rasprava

### 4.1. Validacija analitičke metode

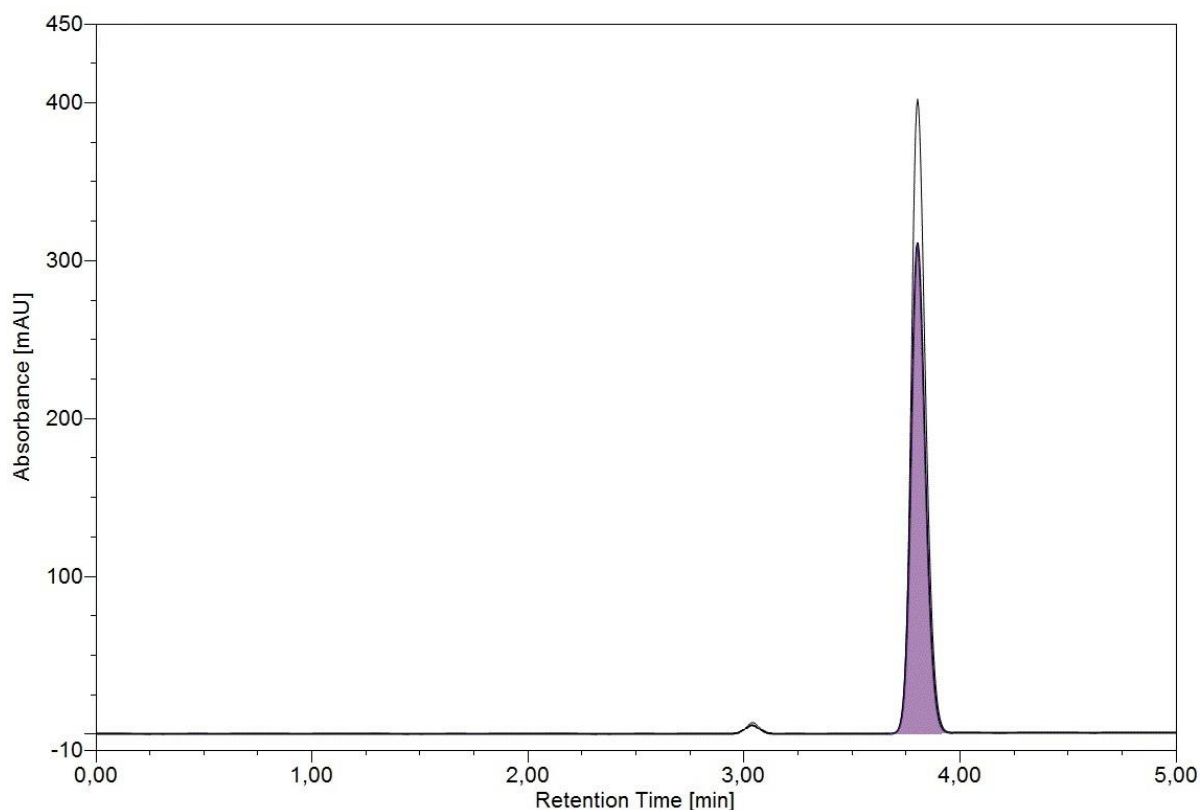
U ovom radu proveden je postupak validacija analitičke metode prema važećim ICH smjernicama ([www.ich.org](http://www.ich.org)). Analitičkim protokolima su propisani parametri koje je potrebno ispitati, kao i kriteriji prihvatljivosti koji moraju biti zadovoljeni kako bi postupak validacije bio uspješno proveden. U postupku validacije, ispitane su sljedeće značajke metode: linearnost, radno područje, točnost, preciznost, ponovljivost.

Na slici 7. prikazan je kromatogram otopine DPPH prije i nakon reakcije s ispitivanim statinom. Linearnost analitičke metode je sposobnost metode da unutar određenog radnog područja daje rezultate proporcionalne količini analita u uzorku ([www.ich.org](http://www.ich.org); Nigović i sur., 2014). U ovom radu linearnost opisane metode određena je mjerenjem jakosti analitičkog signala u ovisnosti o koncentraciji prethodno pripremljenih radnih otopina standarda TROLOX-a. Linearnost je ispitana na 6 različitih koncentracijskih razina unutar raspona od 0,05 do 0,30 mM, a mjerenja su provedena u triplikatu. Jednadžba linearnog regresijskog pravca iznosila je  $y = -3,0101x + 0,9997$ . Uvjet za linearnost metode prema važećim ICH smjernicama ([www.ich.org](http://www.ich.org)) zahtijeva da koeficijent korelacije regresijskog pravca bude veći od 0,999 kako bi se metoda mogla smatrati dovoljno linearnom. Vrijednost koeficijenta korelacije regresijskog pravca ( $r = -0,9998$ ) dobivena računalnim programom Microsoft Office Excel implicira da je postavljeni uvjet zadovoljen.

Točnost analitičke metode pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ovaj validacijski parametar ispituje se kao mjera pouzdanosti analitičke metode. Tijekom ispitivanja točnosti provedena su tri mjerenja radnih standardnih otopina sintetskog antioksidansa na tri različite koncentracijske razine (0,05 , 0,15 i 0,30 mM). Odabrane koncentracijske razine bile su unutar navedenog radnog područja (0,05 – 0,30 mM) i na taj način ispitana točnost kalibracijskog pravca u cijelom njegovom području. U validacijskom smislu, točnost predstavlja odstupanje od stvarne vrijednosti, a najčešće se izražava kao analitički prinos (engl. *recovery*) (Nigović i sur., 2014). U ovom radu analitički prinos za tri različite koncentracije standarda TROLOX-a kretao se u zadovoljavajućim granicama (96,6% - 106,8%).

Od ostalih parametara, u postupku validacije ispitivani su još preciznost (u vidu ponovljenih mjerenja uzoraka iz iste otopine, uzorkovanih pod propisanim uvjetima) i ponovljivost (kao

ponovljivost rezultata mjerenja iste standardne otopine 0,15 mM TROLOX-a) unutar istog radnog dana te između dva radna dana. Dobiveni rezultati izraženi su statističkom veličinom kao relativno standardno odstupanje (RSD; %) (Nigović i sur. 2014). RSD vrijednost iznosila je 4,08% tijekom prvog radnog dana, dok je srednja preciznost iznosila 5,75% između dva radna dana.



Slika 7. Kromatogram otopine DPPH prije reakcije (bijelo) i nakon reakcije sa ispitivanim statinom (ljubičasto).

#### 4.2 Određivanje antioksidativne aktivnosti statina

Po završetku validacije prethodno prikazane metode određena je antioksidativna aktivnost statina (atorvastatin, fluvastatin, pravastatin i simvastatina) u *in vitro* uvjetima kao sposobnost hvatanja slobodnog DPPH radikala.

U ovom radu antioksidativna aktivnost određena je iz razlike površine pika otopine samog slobodnog radikala i otopina uzoraka statina. Rezultati su radi standardizacije preračunati i izraženi na ekvivalent TROLOX-a, odnosno TEAC te prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti statina

Lijek	c (mM)	TEAC (mM)	RSD (%)
Atorvastatin	1,001	0,114	4,67
Fluvastatin	1,000	0,186	2,82
Pravastatin	1,000	0,094	3,75
Simvastatin	0,999	0,141	1,15

Na temelju obrađenih rezultata zaključujemo da sva četiri ispitana lijeka pokazuju značajnu *in vitro* antioksidativnu aktivnost tj. sposobnost hvatanja DPPH radikala. Rezultati su uspoređeni s dostupnim literaturnim radovima (Franzoni i sur. 2003; Umeda i sur. 2019).

Iako su rezultati mjerenja preračunati na TEAC u ovim radovima bitno različiti, što se može pripisati korištenju drugih reagensa (ispitivanju sposobnosti hvatanja drugih radikala) i metoda, navedeni radovi povrđuju implicirano, a to je da ispitivani statini posjeduju *in vitro* antioksidativnu aktivnost.

Zaključno, može se reći da statini osim već navedenih pozitivnih antihiperlipemičkih i imunomodulatornih učinaka imaju potencijal pozitivno djelovati na razine oksidativnog stresa u organizmu. Naročito kada se uzme u obzir da statini smanjuju razinu LDL čestica u žilnom endotelu, koje su zbog svojih svojstava podložne oksidaciji, a kao takve mogu uzrokovati upalni odgovor organizma i daljnju degradaciju funkcije endotela.

Međutim, kako bi se u potpunosti potvrdio antioksidativni učinak statina u ljudskom organizmu, potrebna su *in vivo* istraživanja. Također, sa sigurnošću se može zaključiti da iako statini posjeduju određenu antioksidativnu aktivnost, uporaba statina isključivo u svrhu prevencije/liječenja oksidativnog stresa bi bila neopravdana.

Treba istaknuti i da se HPLC-DPPH metoda pokazala veoma brzom i učinkovitom u ispitivanju antioksidativnog učinka statina.

## 5. Zaključak

Ciljevi ovog rada obrazloženi su u poglavlju 2. Iz dobivenih rezultata moguće je zaključiti da:

Ispitivani statini (atorvastatin, fluvastatin, pravastatin i simvastatin) pokazuju dobru sposobnost gašenja radikalne aktivnosti 2,2-difenil-pikrilhidrazilnog radikala.

Iako su antioksidativna svojstva navedenih spojeva dobro opisana, do sada nema dostupnih literaturnih podataka o antioksidativnoj aktivnosti statina u kojoj je korištena ista metodologija.

Predložena metoda je validirana prema svim važećim smjericama te je utvrđeno kako je metoda točna, linearna te ponovljiva.

Ispitivani statini posjeduju dobru *in vitro* antioksidativnu aktivnost, ali potrebna su dodatna istraživanja kako bi se procijenila njihova *in vivo* antioksidativna aktivnost.

## 6. Literatura

Abramovič H, Grobin B, Poklar Ulrih N, Cigić B. Relevance and standardization of in vitro antioxidant assays: ABTS, DPPH, and Folin-Ciocalteu. *J. Chem*, 2018, ID članka: 4608405.

Adler V, Yin Z, Tew KD, Ronai Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene*, 1999, 18, 6104-6111.

Antioksidansi, 2017, <https://www.inpharma.hr>, pristupljeno 14.2.2020.

Antoniades C, Bakogiannis C, Leeson P, Guzik TJ, Zhang MH, Tousoulis D, Antonopoulos AS, Demosthenous M, Marinou K, Hale A, Paschalis A, Psarros C, Triantafyllou C, Bendall J, Casadei B, Stefanadis C, Channon KM. Rapid, direct effects of statin treatment on arterial redox state and nitric oxide bioavailability in human atherosclerosis via tetrahydrobiopterin-mediated endothelial nitric oxide synthase coupling. *Circulation*, 2011, 124(3), 335-345.

Bioanalytical method validation M10, 2019, <https://www.ich.org>, pristupljeno 9.3.2020.

Bleda S, De Haro J, Florez A, Varela C, Esparza L, Acin F. Long-term pleiotropic effect of statins upon nitric oxide and C-reactive protein levels in patients with peripheral arterial disease. *Heart Asia*, 2011, 3 (1), 130-134.

Bonnet J, McPherson R, Tedgui A, Simoneau D, Nozza A, Martineau P, Davignon J. Comparative effects of 10-mg versus 80-mg atorvastatin on hsCRP in patients with stable coronary artery disease: Results of the CAP (comparative atorvastatin pleiotropic effects) study. *Clin Ther*, 2008, 30(12), 2298-2313.

Catapano AL, Graham I, De Backer G, Wiklund O, Chapman JM, Drexel H, Hoes AW, Jennings CS, Landmesser U, Pedersen TR, Reiner Ž, Riccardi G, Taskinen MR, Tokgozoglu L, Verschuren M, Vlachopoulos C, Wood DA, Zamorano JL, Cooney M. 2016 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidemias. *Eur Heart J*, 2016, 37(39), 2999-3058

Chang SK, Alasalvar C, Shahidi F. Weighing the benefits of dietary antioxidant supplements. *Food technol*, 2018, 72(4), 45-53.

CompTox Chemicals Dashboard, <https://comptox.epa.gov/dashboard>, pristupljeno 24.8.2020.

Chiong M, Leyton L, Lavandero S, Diaz-Araya G. Simvastatin induces apoptosis by a Rho-dependent mechanism in cultured cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011, 255(1), 57-64.

Corsini A, Bellosta S, Baetta R, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Ther*, 1999, 84(3), 413-428.

Damjanov i sur.. Patofiziologija, 5. Izdanje. Zagreb, Medicinska naklada, 2017, str 228-235.

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Phys rev*, 2002, 82, 47-95.

DrugBank, <https://go.drugbank.com>, pristupljeno 24.8.2020.

Dundar Y, Aslan R. Antioxidative stress. *Eastern J Med*, 2000, 5(2), 45-47.

Endo A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J Lipid Res*, 1992, 33(11), 1569-1582.

Fabijanić D. Pleiotropni učinci statina. *Medicus*, 2010, 19 (2), 163-169.

Francetić i suradnici. Farmakoterapijski priručnik, 7. izdanje. Zagreb, Medicinska naklada, 2015, str. 273-274.

Franzoni F, Quinones-Galvan A, Regoli F, Ferrannini E, Galetta F. A comparative study of the in vitro antioxidant activity of statins. *Int J Cardiol*, 2003, 90(2), 317-321.

Grunwald S.A., Popp O., Haafke S., Jedraszczak N., Grieben U., Saar K., Patone G., Kress W. Statin-induced myopathic changes in primary human muscle cells and reversal by a prostaglandin F2 alpha analogue. *Sci Rep*, 2020, 2158.

Gupta D. Methods for determination of antioxidant capacity: a review. *Int J Pharm Sci*, 2015, 6(2), 546-566.

Harrington RA. Statins – almost 30 years of use in the United States and still not quite there. *JAMA Cardiol*, 2(1), 66

Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants – superoxide dismutase (SOD); catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J*, 2018, 54(4), 287-293.

Izješće o potrošnji lijekova u Republici Hrvatskoj u 2018. godini, 2019, <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 17.2.2020.

Kater AL, Batista M, Ferreira S. Synergistic effect of simvastatin and ezetimibe on lipid and pro-inflammatory profiles in pre-diabetic subjects. *Diabetol Metab Syndr*, 2010, 2, Art. nr . 34

Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*, 2011, 48(4), 412-422.

Knight JA. Free Radicals: Their History and Current Status in Aging and Disease. *Ann Clin Lab*, 1998, 24(6), 331-343.

Kralj V., Sekulić K, Škerija M. Kardiovaskularne bolesti u Republici Hrvatskoj. Zagreb, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2013.

Ligouri I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*, 2018, 13, 757-772.

Makino Y, Yoshikawa N, Okamoto K, Hirota K, Yodoi J, Makino I, Tanaka H. Direct association with thioredoxin allows redox regulation of glucocorticoid receptor function. *J Biol Chem*, 1999, 274, 3182-3188.

Min DB, Lee JH, Ozcelik B. Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *J Food Sci*, 2006, 68(2), 487-490.

Moharram HA, Youssef MM. Methods for determining the antioxidant activity: a review. *Alex J Fd Sci & Technol*, 2014, 11(1), 31-42.

Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova-praktikum, 2014, 135-137.

Poljšak B, Milisav I. The neglected significance of “antioxidative stress”. *Oxid Med Cell Longev*, 2012. ID članka: 480895.

Porter KE, Turner NA, O'Regan DJ, Balmforth AJ, Ball SG. Simvastatin reduces human atrial myofibroblast proliferation independently of cholesterol lowering via inhibition of RhoA. *Cardiovasc Res*, 2004, 61(4), 745-755.

Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell signal*, 2012, 24(5), 981-990.

Salisbury D, Bronas U. Reactive oxygen and nitrogen species and impact on endothelial dysfunction. *Nurs res*, 2015, 64(1), 53-66.

Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fund Clin Pharmacol*, 2005, 19(1), 117-125.

Sertić M. (2013.) Nove kapilarno elektroforetske i kromatografske metode u analitici statina. Doktorski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet.

Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *J Exp Pharm*, 1997, 82, 291-295.

Umeda R, Takanari H, Ogata K, Matsumoto S, Kitano T, Ono K, Tokumaru O. Direct free radical scavenging effects of water-soluble HMG-CoA reductase inhibitors. *J Clin Biochem Nutr*, 2018, 64(12), 20-26.

Wang E, Casciano C.N., Clement R.P., Johnson W.W. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) characterized as direct inhibitors of p-glycoprotein. *Pharm Res*, 2001(6), 800-806

Yang X, Li Yang, Li Yanda, Ren X, Zhang X, Hu D, Gao Y, Xing Y, Shang H. Oxidative stress-mediated atherosclerosis: mechanisms and therapies. *Front Physiol*, 2017. ID článku: 600.



## 7. Sažetak/Summary

Otkako su prvi put primjenjeni u Osaki 1976. do danas, statini su se pokazali kao učinkovita, sigurna i svrsishodna skupina lijekova. Njihov značaj za javno zdravstvo najbolje se očituje u činjenicama da je prevalencija dislipidemija u stalnom porastu, a kardiovaskularne bolesti predstavljaju glavni uzrok mortaliteta u općoj populaciji. Kroz učinke na inhibiciju sinteze prekursora kolesterola i izoprenoida (važne za pleiotropne učinke statina), uzrokuju značajno brže smanjenje rizika od ponovljanja kardiovaskularnog događaja nego drugi antihiperlipemici.

Iako međusobno različitih fizikalnih svojstava, statini dijele zajednički farmakodinamički mehanizam djelovanja, što znači da se pri personalizaciji terapije ponajprije uzimaju u obzir razina serumskih lipida (LDL, HDL) radi odabira stupnja djelotvornosti, stanje bubrega odnosno jetre i postojeća terapija kako bi se izbjegle potencijalne interakcije lijekova.

Cilj ovog rada bio je ispitati antioksidativni učinak atorvastatina, fluvastatina, pravastatina i simvastatina mjereći njihovu sposobnost hvatanja 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala, u svrhu ispitivanja potencijalnih dodatnih pozitivnih učinaka.

Korištena metoda temelji se na mjerenju smanjenja apsorbancije DPPH do kojeg dolazi prilikom prijenosa elektrona s radikala na potencijalni antioksidans odnosno ispitivani statin. Svi uzorci pripremljeni su kao 1 mM otopine, analizirani u triplikatu s rezultatima izraženim u obliku antioksidativnog kapaciteta ekvivalentnog standardu TROLOX-a.

Temeljeno na rezultatima, atorvastatin, fluvastatin, pravastatin i simvastatin su pokazali mjerljivu *in vitro* antioksidativnu aktivnost.

Metoda analize pomoću HPLC-DAD sustava pokazala se brzom, pouzdanom i učinkovitom u određivanju antioksidativne aktivnosti lijekova iz skupine statina.

Ever since the first time they were used in Osaka in 1976 until present day, statins have shown to be an effective, useful and safe class of medicine. Their significance to public health is best manifested by a constant rise in prevalence of dyslipidemias in the modern society, as well as cardiovascular diseases being the most common reason of mortality in the general population. By inhibition of cholesterol and isoprenoid precursor synthesis, statins cause significantly faster reduction in the risk of coronary incident repetition through a number of so called pleiotropic effects.

Even though their physical attributes differ, statins share a common pharmacodynamic mechanism of action, which means that in personalizing the therapy other factors are taken into consideration, such as serum lipid levels (LDL, HDL), liver and kidney condition and present therapy so that potential interactions can be avoided.

The aim of this thesis was to assay the antioxidative effect of atorvastatin, fluvastatin, pravastatin and simvastatin by measuring their capacity to scavenge 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, in the function of testing the potential additional positive effects.

The method of use is based on measuring the decrease in absorbance of DPPH which occurs during the transfer of electrons from the radical to a potential antioxidant (the investigated statin molecules). All samples were prepared as 1 mM solutions, analysed in triplicates, and results expressed in the form of antioxidative capacity equivalent to TROLOX standards.

Based on the results, atorvastatin, fluvastatin, pravastatin and simvastatin have demonstrated a measurable *in vitro* antioxidative activity.

Method of analysis using HPLC-DAD system has presented itself to be quick, reliable and effective in assaying the antioxidative activity of medicines from the statin group.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova  
Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Određivanje antioksidativne aktivnosti statina HPLC-DPPH metodom

Luka Džanija

#### SAŽETAK

Otkako su prvi put primjenjeni u Osaki 1976. do danas, statini su se pokazali kao učinkovita, sigurna i svrsishodna skupina lijekova. Njihov značaj za javno zdravstvo najbolje se očituje u činjenicama da je prevalencija dislipidemija u stalnom porastu, a kardiovaskularne bolesti predstavljaju glavni uzrok mortaliteta u općoj populaciji. Kroz učinke na inhibiciju sinteze prekursora kolesterola i izoprenoida (važne za pleiotropne učinke statina), uzrokuju značajno brže smanjenje rizika od ponovljanja kardiovaskularnog događaja nego drugi antihiperlipemici. Iako međusobno različitih fizikalnih svojstava, statini dijele zajednički farmakodinamički mehanizam djelovanja, što znači da se pri personalizaciji terapije ponajprije uzimaju u obzir razina serumskih lipida (LDL, HDL) radi odabira stupnja djelotvornosti, stanje bubrega odnosno jetre i postojeća terapija kako bi se izbjegle potencijalne interakcije lijekova. Cilj ovog rada bio je ispitati antioksidativni učinak atorvastatina, fluvastatina, pravastatina i simvastatina mjereći njihovu sposobnost hvatanja 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala, u svrhu ispitivanja potencijalnih dodatnih pozitivnih učinaka. Korištena metoda temelji se na mjerenju smanjenja apsorbancije DPPH do kojeg dolazi prilikom prijenosa elektrona s radikala na potencijalni antioksidans, odnosno ispitivani statin. Svi uzorci pripremljeni su kao 1 mM otopine, analizirani u triplicatu s rezultatima izraženim u obliku antioksidativnog kapaciteta ekvivalentnog standardu TROLOX-a. Temeljeno na rezultatima, atorvastatin, fluvastatin, pravastatin i simvastatin su pokazali mjerljivu *in vitro* antioksidativnu aktivnost. Metoda analize pomoću HPLC-DAD sustava pokazala se brzom, pouzdanom i učinkovitom u određivanju antioksidativne aktivnosti lijekova iz skupine statina.

Rad je pohranjen u središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad sadrži: 32 stranice, 7 grafičkih prikaza, 4 tablice i 44 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: statini, antioksidativna aktivnost, HPLC-DPPH metoda, 2,2-difenil-pikrilhidrazilin

Mentor: **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Ko-mentor: **Dr. sc. Daniela Amidžić Klarić**, poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta  
**Dr. sc. Biljana Nigović**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-  
biokemijskog fakulteta  
**Dr. sc. Toma Keser**, poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-  
biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: prosinac 2020.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Study: Pharmacy  
Department of pharmaceutical analysis  
Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Determination of antioxidant activity of statins by HPLC-DPPH method

Luka Džanija

#### SUMMARY

Ever since the first time they were used in Osaka in 1976 until present day, statins have shown to be an effective, useful and safe class of medicine. Their significance to public health is best manifested by a constant rise in prevalence of dyslipidemias in the modern society, as well as cardiovascular diseases having the highest mortality in the general population. By inhibition of cholesterol and isoprenoid precursor synthesis, statins cause significantly faster reduction in the risk of coronary incident repetition through a number of so called pleiotropic effects. Even though their physical attributes differ, statins share a common pharmacodynamic mechanism of action, which means that in personalizing the therapy other factors are taken into consideration, such as serum lipid levels (LDL, HDL), liver and kidney condition and present therapy so that potential interactions can be avoided. The aim of this thesis was to assay the antioxidative effect of atorvastatin, fluvastatin, pravastatin and simvastatin by measuring their capacity to scavenge 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, in the function of testing the potential additional positive effects. The method of use is based on measuring the decrease in absorbance of DPPH which occurs during the transfer of electrons from the radical to a potential antioxidant (the investigated statin molecules). All samples were prepared as 1 mM solutions, analysed in triplicates, and results expressed in the form of antioxidative capacity equivalent to TROLOX standards. Based on the results, atorvastatin, fluvastatin, pravastatin and simvastatin have demonstrated a measurable *in vitro* antioxidative activity. Method of analysis using HPLC-DAD system has presented itself to be quick, reliable and effective in assaying the antioxidative activity of medicines from the statin group.

The thesis is deposited Central Library University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 32 pages, 7 figures, 4 tables and 44 references. Original is in Croatian language.

Keywords: statins, antioxidant activity, HPLC-DPPH method, 2,2-diphenyl-picrylhydrazine

Mentor: **Ana Mornar Turk, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Co-mentor: **Daniela Amidžić Klarić, Ph.D.** *Senior assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ana Mornar Turk, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Biljana Nigović, Ph. D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Toma Keser, Ph. D.** *Senior assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: December 2020.