

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
STUDIJE KLINIČKE MEDICINE**



Maja Đanić

**UTICAJ SOLI ŽUČNIH KISELINA NA PRODOR I
METABOLIZAM SIMVASTATINA U PROBIOTSKIM
BAKTERIJAMA**

Doktorska disertacija

Mentori:

Prof. dr Momir Mikov

Prof. dr Ljiljana Suvajdžić

Novi Sad, 2016.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Maja Đanić
Mentor: MN	Prof. dr Momir Mikov Prof. dr Ljiljana Suvajdžić
Naslov rada: NR	Uticaj soli žučnih kiselina na prodor i metabolizam simvastatina u probiotskim bakterijama
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski/engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Autonomna Pokrajina Vojvodina
Godina: GO	2016.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Srbija, 21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja 8 / stranica 156 / slika 44 / grafikona 13 / tabela 11 / referenci 214 / priloga 7)
Naučna oblast: NO	Farmacija, Medicina
Naučna disciplina: ND	Farmakologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	žučne kiseline i soli; simvastatin; probiotici; farmakokinetika; membranski transportni proteini; tečna hromatografija; crevna mikroflora
UDK	615.272.015.2:547.93 615.272.015.2:579.8

Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Srbija
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Interindividualne razlike u sastavu i aktivnosti crevne mikroflore mogu uticati na metabolizam lekova kao i na njihov konačan terapijski odgovor. Simvastatin je lek iz grupe statina i karakteriše ga izuzetno mala rastvorljivost u vodi, mala bioraspoloživost (<5%) i velike interindividualne razlike u terapijskom odgovoru čiji uzroci nisu u potpunosti objašnjeni. Poslednjih godina velika pažnja se posvećuje ispitivanjima žučnih kiselina u razvoju novih farmaceutskih formulacija zbog svoje uloge u solubilizaciji i modifikaciji prodora lekova kroz biološke membrane. Zbog svega navedenog, u fokusu našeg istraživanja su bile potencijalne interakcije između simvastatina, probiotskih bakterija i žučnih kiselina o kojima se vrlo malo zna, a od izuzetne su važnosti, zbog mogućeg uticaja na farmakokinetske i farmakodinamske osobine simvastatina, pa samim tim i na konačan terapijski odgovor kod pacijenta.</p> <p>Cilj istraživanja je bio da se ispita prodor i metabolizam simvastatina u probiotskim bakterijama kao i uticaj različitih žučnih kiselina na transport ovog leka u bakterijske ćelije. Takođe, cilj je bio da se ispita uticaj soli žučnih kiselina na distribicioni koeficijent simvastatina, kao i interakcije žučnih kiselina sa simvastatinom na nivou transportnih proteina probiotskih bakterija kako bi se objasnila priroda očekivanih interakcija.</p> <p>Identifikacija i kvantifikacija uzoraka vršena je metodom tačne hromatografije sa masenom spektrometrijom (LC-MS/MS). Korišćenjem programskih paketa VolSurf+ i Molinspiration, za identifikovane metabolite su izračunati molekularni deskriptori koji opisuju fizičko-hemijske i farmakokinetske osobine molekula. Određivanje distribucionog koeficijenta vršeno je <i>Shake-flask</i> metodom. Interakcije žučnih kiselina sa simvastatinom na nivou transportnih proteina probiotskih bakterija ispitane su doking studijama pomoću SwissDock programa.</p> <p>Prilikom dvadesetčetvoročasovne inkubacije sa probiotskim bakterijama uočen je statistički značajan pad koncentracije simvastatina u ekstracelularnom sadržaju. Ukupan sadržaj simvastatina, kao zbir ekstracelularnog i intracelularnog sadržaja, je tokom čitavog ispitivanog perioda bio statistički značajno niži u odnosu na kontrolnu grupu bez probiotika navodeći na zaključak da se deo simvastatina tokom vremena metabolisao pod dejstvom enzima ispitivanih bakterija. Detektovano je i identifikovano 8 metaboličkih produkata simvastatina. Na</p>

	<p>osnovu izračunatih vrednosti molekulskih deskriptora, očekuje se da će metabolit M-452, koji predstavlja hidroksilovani produkt simvastatinske kiseline, pokazati najbolje rezultate u pogledu fizičko-hemijskih osobina i bioraspoloživosti u biološkom sistemu. Žučne kiseline nisu dovele do statistički značajne modifikacije transporta simvastatina u/iz probiotskih bakterija. Ipak, u nekim vremenskim tačkama primećena je nešto veća koncentracija leka u ekstracelularnom prostoru u grupama sa žučnim kiselinama. Ove razlike se mogu delimično objasniti rezultatima određivanja distribucionog koeficijenta koji su pokazali da ispitivane žučne kiseline dovode do statistički značajnog smanjenja distribucionog koeficijenta simvastatina usled povećanja rastvorljivosti u vodenoj fazi. Rezultatima doking studija procenjeno je da ispitivane žučne kiseline imaju veći afinitet prema čak 80% <i>multidrug</i> transporteru ispitivanih bakterija u odnosu na simvastatin što govori o mogućnosti ostvarivanja interakcija žučnih kiselina sa ovim lekom na nivou transportnih proteina probiotskih bakterija.</p> <p>Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da probiotske bakterije imaju ogroman uticaj na sudbinu simvastatina u biološkom sistemu. Uzimajući u obzir činjenicu da probiotske bakterije ulaze u sastav normalne crevne flore i da svaki organizam poseduje specifičan bakterijski sastav, trebalo bi posvetiti više pažnje ispitivanju njegovog uticaja na farmakokinetiku lekova. Neophodna su dalja <i>in vivo</i> ispitivanja kako bi se utvrdila potencijalna farmakološka aktivnost identifikovanih metabolita simvastatina nastalih pod dejstvom enzimske aktivnosti probiotskih bakterija. Povećanje rastvorljivosti simvastatina pomoću žučnih kiselina otvara mogućnost za dalja istraživanja u cilju razvoja novih farmaceutskih formulacija sa poboljšanom bioraspoloživosti i farmakokinetičkim osobinama.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	23. 06. 2014.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	predsednik: član: član:

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
MEDICAL FACULTY**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Maja Đanić
Mentor: MN	Professor Momir Mikov, MD, PhD, Professor Ljiljana Suvajdžić, MD, PhD
Title: TI	The influence of bile salts on simvastatin transport and metabolism in probiotic bacteria
Language of text: LT	Serbian (latin)
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Autonomous Province of Vojvodina
Publication year: PY	2016.
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	Serbia, 21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Physical description: PD	(number of chapters 8 / pages 156 / pictures 44 / graphics 13 / tables 11 / references 214 / appendix y)
Scientific field SF	Pharmacy, Medicine
Scientific discipline SD	Pharmacology
Subject, Key words SKW	Bile Acids and Salts; Simvastatin; Probiotics; Pharmacokinetics; Membrane Transport Proteins; Chromatography, Liquid; Gastrointestinal Microbiome
UC	615.272.015.2:547.93 615.272.015.2:579.8

Holding data: HD	Library of Medical Faculty Novi Sad, Serbia 21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Note: N	
Abstract: AB	<p>Interindividual differences in the composition and activity of the gut microflora may affect the metabolism of drugs as well as their final therapeutic response. Simvastatin is drug from the group of statins and has extremely low water solubility, low bioavailability (<5%) and high interindividual differences in therapeutic response whose causes are not fully understood. In recent years, great attention has been paid to studies of bile acids in the development of new pharmaceutical formulations because of their role in the drug solubilization and modification of drug transport through biological membranes. Accordingly, interactions between simvastatin, probiotic bacteria and bile acids were the focus of our research due to great importance and potential influence on the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of simvastatin, and therefore the final therapeutic response in the patients.</p> <p>The aim of the study was to investigate the simvastatin transport and metabolism in probiotic bacteria as well as the effect of various bile acids on drug transport into the bacterial cell. Additionally, the aim was to investigate the influence of bile salts on the distribution coefficient of simvastatin, and the interactions of bile acids with simvastatin at the level of probiotic transport proteins in order to elucidate the nature of expected interactions.</p> <p>Identification and quantification of samples were performed with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Molecular descriptors that describe the physico-chemical and pharmacokinetic properties of identified metabolites were calculated using the software packages VolSurf+ and Molinspiration. Determination of the distribution coefficient was performed using <i>Shake-flask</i> method. Interaction of bile acids with simvastatin at the level of bacterial transport proteins were studied using docking studies with SwissDock program.</p> <p>During the twenty-four hours of incubation with probiotic bacteria, simvastatin concentrations in the extracellular content showed a statistically significant decrease. The total amount of simvastatin, as the sum of the extracellular and intracellular amount, during the whole study period, was significantly lower in comparison with control group without probiotics, suggesting that the part of simvastatin was metabolized by the enzymatic activity of studied bacteria. Accordingly, eight metabolic</p>

	<p>products of simvastatin were detected and identified. Based on the calculated values of molecular descriptors, it is expected that the metabolite M-452, which is the hydroxylated product of simvastatin acid, will show the best results in terms of physico-chemical properties and bioavailability in biological system. Bile acids did not show a significant influence on simvastatin transport into probiotic bacteria. However, in some time points, slightly higher drug concentrations in the extracellular medium in groups with bile acids were observed. These differences can be partly explained by the results of the determination of the distribution coefficients which showed that investigated bile acids lead to a statistically significant decrease in simvastatin distribution coefficient due to increased solubility in the aqueous phase. The results of docking studies estimated that studied bile acids have stronger affinities for the 80% of bacterial multidrug transporters compared to simvastatin indicating the possibility of achieving the interactions of bile acids with simvastatin at the level of transport proteins of probiotic bacteria.</p> <p>Based on the obtained results it could be concluded that probiotic bacteria have great influence on the fate of simvastatin in a biological system. Taking into account the fact that probiotic bacteria are the normal part of gut microflora and that each individual has specific bacterial fingerprint, more attention should be paid on studying its influence on drug pharmacokinetics. Further <i>in vivo</i> studies are required in order to determine potential pharmacological activity of identified simvastatin metabolites. Increased water solubility of simvastatin with bile acids may open the possibility for further investigations with the aim of development of new pharmaceutical formulation with improved bioavailability and pharmacokinetic properties</p>
Accepted on Senate on: AS	June 23, 2014
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>president:</p> <p>member:</p> <p>member:</p>

Zahvalnica

Ovu stranicu koristim da se zahvalim svima koji su mi svojim nesebičnim trudom i zalaganjem pomogli prilikom izrade doktorske disertacije kao i mog naučnog usavršavanja.

Neizmernu zahvalnost na ukazanom poverenju, dragocenim savetima, posvećenom vremenu i razumevanju dugujem svom dragom mentoru prof. dr Momiru Mikovu koji je strpljivo od prvog dana svojim znanjem i idejama usmeravao moj rad na disertaciji, kao i celokupan istraživački rad, pružajući iskrenu, prijateljsku podršku. Želim da mu se zahvalim i kao rukovodiocu projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom „Interakcije ksenobiotika i uticaj na sisteme u biomedicini“, III 41012, u okviru kog je urađena sama disertacija, što mi je omogućio da postanem deo tima i načinim svoje prve korake u svetu nauke. Takođe, zahvaljujem se svojoj mentorki prof. dr Ljiljani Suvajdžić na divnoj saradnji, velikom razumevanju i korisnim savetima tokom izrade doktorske disertacije.

Srdačno se zahvaljujem prof. dr Svetlani Goločorbin-Kon na bezrezervnoj pomoći u svakoj prilici, zalaganju, nesebičnom pružanju ogromnog znanja i izuzetnim smernicama kojima je unapređena disertacija. Veliku zahvalnost dugujem doc. dr Saši Vukmiroviću na prijateljskoj i uspešnoj saradnji, dragocenim stručnim savetima i ogromnoj pomoći prilikom izvođenja HPLC i LC-MS analiza. Takođe zahvalnost dugujem i velikom stručnjaku iz oblasti masene spektrometrije, Silviju Kečkešu na svim korisnim savetima, stručnoj pomoći i znanju koje mi je nesebično preneo. Posebno se zahvaljujem prof. dr Dejanu Orčiću na izdvojenom vremenu, divnoj saradnji i izuzetnim savetima prilikom interpretacije masenih spektara. Dugujem veliku zahvalnost članovima komisije za ocenu doktorske disertacije na čelu sa prof. dr Karmen Stankov kao predsednikom, koji su detaljnim pregledom rukopisa i unetim sugestijama, poboljšali sadržaj ove teze.

Od srca se zahvaljujem svim članovima Katedre za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, na divnoj saradnji, prijateljskoj atmosferi i podršci tokom svih ovih godina. Želim da se zahvalim svojim kolegicama Milici, Ani i Jovani na moralnoj podršci i pomoći tokom pisanja disertacije, a posebnu zahvalnost dugujem svojim dragim kolegama Nebojši i Bojanu na безусловnoj pomoći, savetima i svim naučnim i nenaučnim diskusijama koje smo vodili i koje su ovaj put učinile lakšim i lepšim. Takođe, veliko hvala i svim mojim prijateljima van fakulteta na razumevanju i podršci tokom svih ovih godina.

A moja najveća podrška i najjači vetar u leđa su bili i biće moja porodica, suprug Marko, sestra Tijana i moji roditelji. Beskrajno im se zahvaljujem na bezgraničnoj ljubavi, razumevanju i nemejljivoj moralnoj podršci koju mi svakodnevno pružaju! Hvala vam što ste oduvek verovali u mene. Vi ste ti koji svaki moj uspeh čine potpunim!

Maja Đanić

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Simvastatin	3
1.1.1. Područje primene statina	3
1.1.2. Mehanizam delovanja statina	3
1.1.3. Poreklo i predstavnici statina.....	4
1.1.4. Farmakokinetičke karakteristike statina	6
1.1.5. Simvastatin – farmaceutsko-hemijske i farmakokinetičke osobine.....	6
1.1.6. Nečistoće simvastatina	8
1.1.7. Analitičke metode za ispitivanje simvastatina i njegovih nečistoća.....	9
1.2. Crevna mikroflora i probiotici.....	12
1.2.1. Uloga i sastav crevne mikroflore.....	12
1.2.2. Probiotici	14
1.2.3. Uloga crevne mikroflore i probiotika u metabolizmu lekova.....	16
1.2.4. Transportni proteini crevne mikroflore i probiotika.....	23
1.3. Žučne kiseline.....	25
1.3.1. Sinteza i enterohepatička cirkulacija žučnih kiselina u organizmu.....	25
1.3.2. Hemijska struktura žučnih kiselina	28
1.3.3. Uloga žučnih kiselina u organizmu	30
1.3.4. Uticaj žučnih kiselina na modifikaciju transporta lekova kroz biološke membrane	31
1.4. Bioraspoloživost lekova i biofarmaceutski sistem klasifikacije lekova	33
1.5. Distribucionni koeficijent i penetracija lekova kroz biološke membrane	36
1.5.1. Metode određivanja lipofilnosti.....	37
1.6. Doking studije i njihova primena u proučavanju transporter-lek interakcija.....	39
2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	42
3. EKSPERIMENTALNI DEO	43
3.1. Ispitivanje prodora i metabolizma simvastatina u probiotskim bakterijama bez prisustva i u prisustvu žučnih kiselina.....	44
3.1.1. Supstance i reagensi	44
3.1.2. Priprema radnih i standardnih rastvora.....	44
3.1.3. Eksperimentalne grupe	45
3.1.4. Protokol i priprema uzoraka	47

3.1.5. LC-MS/MS analiza.....	48
3.1.6. MetaPrint2D analiza.....	52
3.1.7. Računarsko modelovanje: određivanje molekulskih deskriptora u proceni farmakokinetičkih osobina identifikovanih metabolita simvastatina	52
3.2. Ispitivanje uticaja žučnih kiselina na distribicioni koeficijent simvastatina u sistemu oktanol/pufer.....	54
3.2.1. Supstance i reagensi	54
3.2.2. Priprema standardnih i radnih rastvora.....	54
3.2.3. <i>Shake-flask</i> metoda određivanja distribucionog koeficijenta simvastatina	55
3.2.4. Hromatografsko određivanje simvastatina	56
3.2.5. Kompleksacija simvastatina i žučnih kiselina - <i>in silico</i> analiza.....	58
3.3. <i>In silico</i> ispitivanje interakcija simvastatina i žučnih kiselina sa probiotskim bakterijama na nivou transportera - doking studije	59
3.3.1. Transportni proteini - baza podataka i 3D strukture.....	59
3.3.2. Ligandi.....	59
3.3.3. Doking studija	60
3.4. Statistika	61
4. REZULTATI	62
4.1. Prodor simvastatina u probiotske bakterije	62
4.2. Metabolizam simvastatina pod uticajem probiotskih bakterija	64
4.2.1. Rezultati MetaPrint2D analize.....	64
4.2.2. Hromatogrami detektovanih metaboličkih produkata simvastatina	65
4.2.3. Strukture detektovanih metabolita.....	67
4.2.4. Strukturna interpretacija metabolita simvastatina pomoću LC-MS/MS analize	68
4.2.5. Uticaj probiotika na sadržaj metabolita simvastatina - seminkvantitativna analiza	83
4.2.6. Računarsko modelovanje: molekularni deskriptori u predikciji farmakokinetičkih osobina identifikovanih metabolita simvastatina	85
4.3. Uticaj žučnih kiselina na prodor simvastatina u probiotske bakterije	88
4.4. Uticaj soli žučnih kiselina na distribicioni koeficijent simvastatina	91
4.4.1. Uticaj soli žučnih kiselina na distribicioni koeficijent simvastatinske kiseline	93
4.4.2. Uticaj soli žučnih kiselina na distribicioni koeficijent simvastatin laktone	93
4.4.3. Kompleksacija simvastatina i žučnih kiselina	94
4.5. Doking studija ispitivanja interakcija simvastatina i žučnih kiselina sa probiotskim bakterijama na nivou transportera	97

4.5.1. Transporteri	97
4.5.2. Ligandi.....	100
4.5.3. Doking analiza.....	100
5. DISKUSIJA.....	103
5.1. Prodor simvastatina u probiotske bakterije	104
5.2. Metabolizam simvastatina u probiotskim bakterijama.....	106
5.2.1. Identifikovani metaboliti simvastatina	107
5.2.2. Semikvantitativna analiza metabolita.....	115
5.2.3. Računarsko modelovanje: molekulski deskriptori u predikciji farmakokinetičkih osobina identifikovanih metaboličkih produkata simvastatina	116
5.3. Uticaj žučnih kiselina na transport simvastatina u probiotske bakterije	120
5.4. Uticaj soli žučnih kiselina na distribicioni koeficijent simvastatina	121
5.4.1. Kompleksacija simvastatina sa žučnim kiselinama.....	123
5.5. <i>In silico</i> ispitivanje interakcija simvastatina i žučnih kiselina sa probiotskim bakterijama na nivou transportera - doking studije	124
6. ZAKLJUČAK	127
7. LITERATURA	130
8. PRILOG	149

LISTA SKRAĆENICA

1,4 VDW	1,4 <i>Van Der Waals-ove</i> energije
ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i> – ATP-vezujući kasetni transporteri
AM1	<i>Austin Model 1</i> – semiempirijska metoda za kvantne proračune molekulske elektronske strukture
AMDIS	<i>Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System</i>
ASBT	<i>Apical Sodium-dependent Bile Acid Transporter</i> – apikalni natrijum zavisni transporter žučnih soli
ATP	adenozin trifosfat
BCRP	<i>Breast Cancer Resistent Protein</i> – protein rezistencije na lekove otkriven u ćelijama raka dojke, ABCG2
BRENDA	<i>BRAunschweig ENzyme Database</i> – naučna baza o enzimima
BSEP	<i>Bile Salt Export Pump</i> – pumpa za izbacivanje žučnih soli, ABCB11
BSH	<i>Bile Salt Hydrolase</i> – hidrolaze žučnih soli
BSK	Biofarmaceutski Sistem Klasifikacije
CA	<i>Cholic Acid</i> – holna kiselina
CACO2	prodor kroz Caco-2 ćelije
CDCA	<i>Chenodeoxycholic Acid</i> – henodeoksiholna kiselina
CYP450	citohrom P450
D	distribucionni koeficijent
DAD	<i>Diode Array Detector</i>
DCA	<i>Deoxycholic Acid</i> – deoksiholna kiselina
DMT	<i>Divalent Metal Transporter</i>
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
Eb	<i>Bend energy</i> – energija savijanja
Ed	dipol-dipol energije
Es	<i>Strech energy</i> – energija istežanja
Esb	<i>Strech-Bend energy</i> – energija istežanja-savijanja
ESI	<i>Electrospray Ionisation</i> – elektrosprej jonizacioni izvor
ESI-MS	elektrosprej jonizaciona – masena spektrometrija
Et	<i>Torsion energy</i> – energija uvijanja

FXR	farnezoid X receptor
GCDCA	<i>Glycochenodeoxycholic Acid</i> – glikohenodeoksiholna kiselina
HBA	<i>Hydrogen Bond Acceptor</i> – broj akceptora vodoničnih veza
HBD	<i>Hydrogen Bond Donor</i> – broj donora vodoničnih veza
HMG–CoA	3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> – visokoefikasna tečna hromatografija
HPTLC	<i>High Performance Thin Layer Chromatography</i> – visokoefikasna tankoslojna hromatografija
HSA	<i>Hydrophobic Surface Area</i> – hidrofobna površina molekula
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i> – međunarodna konferencija za harmonizaciju
IT	<i>Ion Trap</i> – jonska zamka
KMK	kritična micelarna koncentracija
KVB	kardiovaskularne bolesti
LCA	<i>Lithocholic Acid</i> – litoholna kiselina
LC–MS/MS	tečna hromatografija sa spregnutom masenom spektrometrijom
LDL	<i>low density lipoprotein</i> – lipoproteini niske gustine
logD	logaritmaska vrednost distribucionog koeficijenta
logP	logaritmaska vrednost particionog koeficijenta
MATE	<i>Multidrug & Toxic Compound Efflux</i> superfamilija
MDR	<i>Multidrug Resistance</i> – višestruka rezistencija na lekove
MetStab	<i>Metabolic Stability</i> – metabolička stabilnost
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MKC	<i>Monoketocholic Acid</i> – monoketoholna kiselina
MM2	molekulsko mehanički proračuni
MOP	<i>Multidrug/Oligosaccharidyl-lipid/Polysaccharide</i>
MOPAC	<i>Molecular Orbital PACkage</i> – kompjuterski program dizajniran da implementira semiempirijske algoritme kvantne mehanike kao što su AM1, PM3, MINDO, MNDO i drugi
MRP	<i>Multidrug Resistance Proten</i> – protein višestruke rezistencije na lekove
MS	<i>Molecular Surface Area</i> – molekulska površina
Mw	<i>Molecular weight</i> – molekulska masa

NaC	<i>Sodium Cholate</i> – natrijum holat
NaDC	<i>Sodium Deoxycholate</i> – natrijum deoksiholat
NaMKC	<i>Sodium 12-Monoketocholate</i> – natrijum 12-monoketoholat
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> – nuklearna magnetna rezonanca
NOR	<i>Normalised Occurrence Ratio</i>
NPC1L1	<i>Niemann-Pick C1-Like 1</i>
NTCP	<i>Sodium/Taurocholate Cotransporting Polypeptide</i> – natrijum/tauroholat kotransportni polipeptid
OATP	<i>Organic Anion-Transporting Polypeptide</i> – organski anjonski transportni polipeptid
OST	<i>Organic Solute Transporter</i> – organski rastvorljivi transporter
P	particioni koeficijent
PB	<i>Protein Binding</i> – vezivanje za proteine plazme
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> – fosfatni pufer
P-gp	P-glikoprotein, ABCB1
PHSAR	odnos polarne i hidrofobne površine molekula
PM3	<i>Parameterized Model number 3</i> – semiempirijska metoda za kvantne proračune molekulske elektronske strukture
PP	pirofosfat
PSA	<i>Polar Surface Area</i> – polarna površina molekula
PSAR	odnos polarne površine molekula i ukupne površine molekula
QSAR	<i>Quantitative Structure Activity Relationship</i> – kvantitativni odnosi strukture i aktivnosti
RND	<i>Resistance-Nodulation Division superfamily</i>
SAS	<i>Solvent Accessible Surface Area</i> – površina molekula dostupna rastvaraču
SCFA	<i>Short Chain Fatty Acids</i> – kratkolančane masne kiseline
SD	standardna devijacija
SEV	<i>Solvent-Excluded Volume</i> – zapremina molekula nedostupna rastvaraču
SMR	<i>Small Multidrug Resistance</i>
SOLY	<i>Solubility</i> – intrinzička rastvorljivost
SVK	simvastatinska kiselina
SVL	simvastatin lakton

SZO	Svetska Zdravstvena Organizacija
TCA	<i>Taurocholic Acid</i> – tauroholna kiselina
TCDC	<i>Taurochenodeoxycholic Acid</i> – taurohenodeoksiholna kiselina
TLCA	<i>Taurolithocholic Acid</i> – tauroolitholna kiselina
UDCA	<i>Ursodeoxycholic Acid</i> – ursodeoksiholna kiselina
VD	<i>Volume of Distribution</i> – volumen distribucije

1. UVOD

Peroralna aplikacija lekova predstavlja najčešći i najjednostavniji način primene lekova. Nakon peroralne primene, lek je izložen brojnim fizičkim, hemijskim i biološkim promenama koje utiču na njegovu sudbinu u organizmu. Lekovi koji se peroralno aplikuju, poželjno je da imaju dobru bioraspoloživost, kao i male interindividualne i intraindividualne varijacije u terapijskom odgovoru. Individualne razlike u farmakološkom odgovoru dovode do ozbiljnih kliničkih problema, od kojih su najvažniji otežano lečenje, neželjene reakcije na lekove i interakcije među lekovima (Stojančević et al., 2013a; Ma & Lu, 2011; Patterson & Turnbaugh, 2014).

Sve veći broj dokaza upućuje na to da ove razlike nisu samo genetski determinisane (Grbović et al., 2007), već da su i posledica interindividualnih razlika u sastavu i aktivnosti crevne mikroflore (Saad et al., 2012; Mikov, 1994; Stojančević et al., 2013a; Sousa et al., 2008). Naime, pored održavanja intestinalne homeostaze, crevna mikroflora je prepoznata kao poseban biosistem sa visokim kapacitetom za metabolizam lekova. Stoga, interakcije crevne mikroflore sa peroralno unetim lekovima mogu da rezultuju značajnom promenom njihove farmakološke aktivnosti (Kang et al., 2013). Budući da crevna mikroflora ima ogroman značaj za celokupno ljudsko zdravlje, u uslovima disbioze koja se javlja kao rezultat neodgovarajuće ishrane, radioterapije, tretmana antibioticima i stresnih situacija, kako bi se očuvao balans, postoje pokušaji da se modifikuju njena struktura i aktivnost. Jedan od pristupa je i primena probiotika, odnosno bakterija koje normalno ulaze u sastav crevne mikroflore (De Preter et al., 2011). Pored dobro proučenih i ispitanih efekata probiotika na ljudsko zdravlje, novije studije ukazuju na to da probiotske bakterije mogu uticati na biološku raspoloživost istovremeno primenjenih lekovitih supstanci i dovesti do varijacija u njihovoj terapijskoj efikasnosti (Stojančević et al., 2013a). S obzirom na posledice koje tom prilikom mogu nastati, ova oblast postaje fokus brojnih istraživanja.

Prema dostupnim podacima Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO), kardiovaskularne bolesti (KVB) predstavljaju jedan od vodećih uzroka globalnog morbiditeta i mortaliteta. S obzirom na podatak da u našoj zemlji veliki broj stanovnika boluje od dislipidemija i KVB, primena medikamenata koji se koriste u njihovom lečenju dobija poseban značaj.

Brojne studije potvrdile su nedvosmislen značaj statina u snižavanju kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta (Blauw et al., 1997; Fonarow et al., 2005; Mozaffarian et al., 2004; Reiner et al., 2016). Novija istraživanja ukazuju na delotvornost probiotičkih bakterija u smanjenju ukupnog i LDL holesterola (Ooi & Liong, 2010; Pavlović et al., 2012; Kumar et al., 2012; Madjd et al., 2015). Budućnost njihove upotrebe najverovatnije leži u kombinovanoj terapiji sa već postojećim terapijskim pristupima (Jones et al., 2013). Jedan od najčešće propisivanih lekova iz grupe statina u terapiji hiperholesterolemije jeste simvastatin. Ovaj lek karakteriše izuzetno mala bioraspodivnost (<5%) ali i velike interindividualne razlike u terapijskom odgovoru čiji uzroci nisu u potpunosti objašnjeni (Karlson et al., 2016; Kaddurah-Daouk et al., 2011).

Poslednjih godina, velika pažnja se posvećuje ispitivanju žučnih kiselina zbog svoje uloge u solubilizaciji i modifikaciji prodora lekova kroz biološke membrane, kako paracelularnim tako i transcelularnim putem, kao i zbog činjenice da se u fiziološkim uslovima nalaze u intestinalnom traktu (Stojančević et al., 2013b). Na taj način, žučne kiseline mogu da menjaju farmakokinetiku lekovitih supstanci što utiče na njihov konačan terapijski odgovor.

Zbog svega navedenog, u fokusu našeg istraživanja su bile interakcije između simvastatina, probiotika i žučnih kiselina o kojima se vrlo malo zna, a od izuzetne su važnosti zbog potencijalnog uticaja na farmakokinetičke i farmakodinamske osobine simvastatina, pa samim tim i na konačan terapijski odgovor kod pacijenta.

1.1. Simvastatin

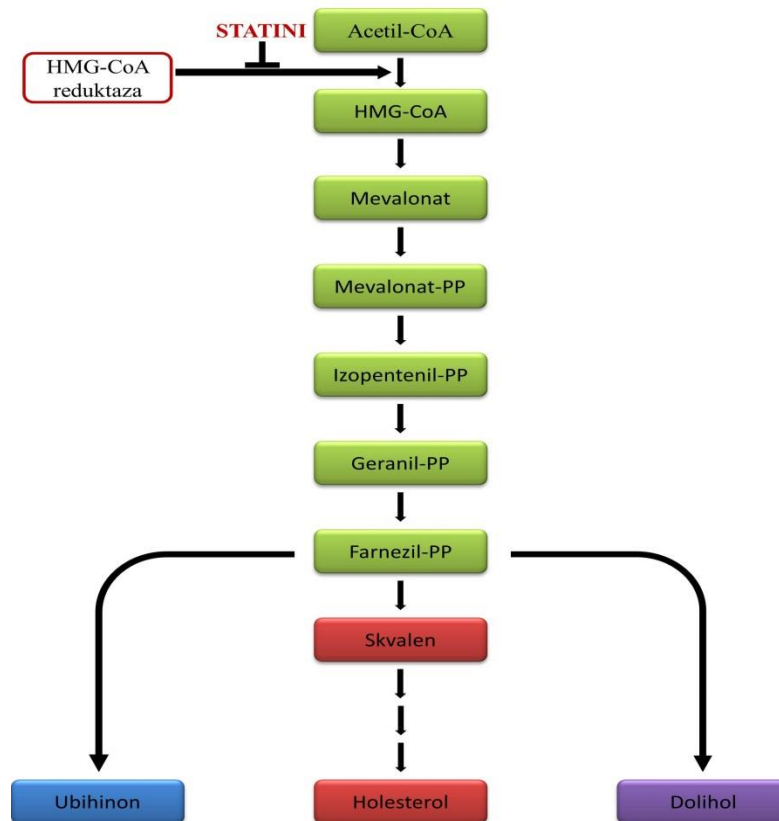
1.1.1. Područje primene statina

Kardiovaskularne bolesti (KVB) predstavljaju jedan od najčešćih uzročnika morbiditeta i mortaliteta u svetu. Prema prognozama SZO, do 2030. godine, smrtnost od KVB će se povećati sa trenutnih 21,9% na 26,3%. Brojne studije su pokazale nedvosmislen, značaj statina u snižavanju kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta (Blauw et al., 1997; Fonarow et al., 2005; Mozaffarian et al., 2004; Reiner et al., 2016). Kako indikacije za primenu ove grupe lekova spadaju u domen i primarne i sekundarne prevencije, danas su statini izrazito propisivana grupa lekova i njihova potrošnja je u velikom porastu (Kitzmiller et al., 2013), a u nekim zemljama, kao što je Velika Britanija, mogu se kupiti i bez recepta.

S obzirom na to da u našoj zemlji, veliki deo populacije pati od nekog oblika dislipidemije, primena lekova koji se koriste u njihovom lečenju dobija poseban značaj. Prema Nacionalnom vodiču za dijagnostikovanje i lečenje lipidskih poremećaja statini predstavljaju prvi izbor u terapiji stanja sa dominantno povišenim vrednostima ukupnog i LDL holesterola, bez obzira da li se radi o primarnim ili sekundarnim poremećajima (Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje lipidskih poremećaja, 2012). Empirijski posmatrano, potrebno je pravilno koristiti ove lekove, kako bi se obezbedila njihova potpuna i pravilna iskorišćenost, a sa druge strane dugotrajna i bezbedna upotreba po bolesnika. Oni su najefikasniji od svih hipolipemika, ali postoje razlike između pojedinih predstavnika statina.

1.1.2. Mehanizam delovanja statina

Svoje delovanje statini ostvaruju inhibicijom 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) reduktaze, ključnog enzima u sintezi holesterola u jetri, koji omogućava konverziju acetil koenzima A (AcCoA) u mevalonsku kiselinu (Bonetti et al., 2003; Stancu & Sima, 2001). Na **Slici 1** je prikazan put mevalonata i sinteze holesterola kao i mesto delovanja HMG-CoA reduktaze.



Slika 1. Put mevalonata i sinteze holesterola kao i mesto delovanja statina (Tobert, 2003).
(HMG-CoA - 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A, PP - pirofosfat)

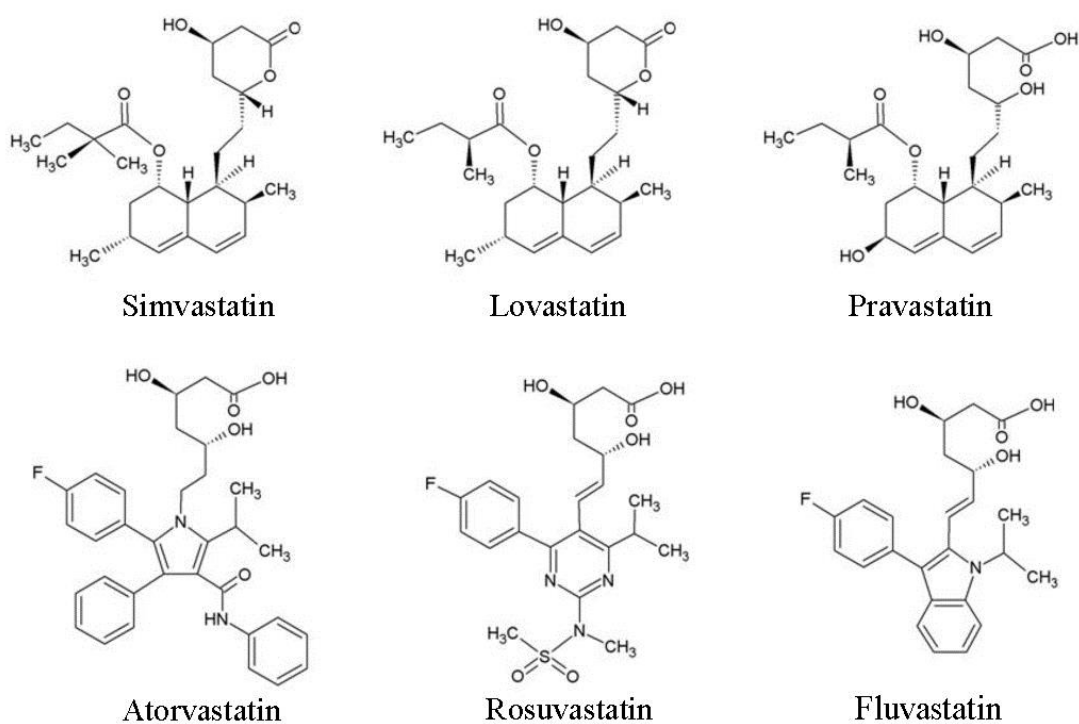
Dakle, statini ometaju sintezu holesterola u jetri što istovremeno dovodi do povećane ekspresije lipoproteina niske gustine (eng. *low density lipoproteins*, LDL) - receptora na membrani hepatocita i posledičnog privlačenja čestica bogatih LDL-holesterolom iz plazme u jetru. Ovim mehanizmom se objašnjava snižavanje serumskih vrednosti ukupnog i LDL holesterola, dokazanih faktora rizika za proces ateroskleroze i koronarnu bolest (Weng et al., 2010). Od velike važnosti su i brojni drugi tzv. plejotropni efekti statina kao što su pozitivan uticaj na endotelnu funkciju, promena i stabilizacija aterosklerotskog plaka, smanjenje oksidativnog stresa i inflamacije i inhibicija trombogenog odgovora što se takođe odražava na smanjenje kardiovaskularnog rizika (Palinski, 2001).

1.1.3. Poreklo i predstavnici statina

Statine su 1971. godine otkrili Akira Endo i Masao Kuroda iz Tokija, ispitujući određene mikroorganizme, i otkrivši da luče supstance koje se ponašaju kao inhibitori enzima drugih mikroorganizama. Te supstance su zapravo služile za odbranu određenih plesni od drugih gljivica. Došlo se na ideju da bi takve supstance mogle blokirati i enzim koji u ljudskoj

jetri čini deo mehanizma za sintezu holesterola. Prvo takvo jedinjenje bio je mevastatin (ML-236B), molekul koji luči plesan *Penicillium citrinum* (Endo, 2008). Godine 1976. farmaceutska kompanija Merck & Co zainteresovala se za ova eksperimentalna jedinjenja i uključila se u istraživanja. Nedugo nakon toga, iz plesni *Aspergillus terreus* izolovan je lovastatin (mevinolin, MK803), prvi statin koji je prošao sva klinička istraživanja i postao lek (Jeger & Dieterle, 2012). Nakon velikog uspeha lovastatina usledio je dolazak i drugih statina - simvastatin, pravastatin, cerivastatin, atorvastatin, fluvastatin i rosuvastatin.

Poreklo statina je različito: lovastatin je produkt dobijen biosintezom iz kulture gljivica *Aspergillus terreus*, simvastatin i pravastatin su polusintetski derivati nastali modifikacijom molekula lovastatina, dok su fluvastatin, atorvastatin i rosuvastatin dobijeni sintetskim postupcima (Kumar Basniwal & Jain, 2012). Predstavnici statina predstavljeni su na **Slici 2**.



Slika 2. Predstavnici statina (Wong & Poon, 2010)

Iako svi statini imaju isti mehanizam delovanja, oni se međusobno razlikuju prema fizičko-hemijskim svojstvima, kao i farmakokinetским parametrima koji iz navedenih svojstava proizilaze.

1.1.4. Farmakokinetičke karakteristike statina

Prema lipofilnosti statini se dele na lipofilne (atorvastatin, lovastatin, simvastatin) i hidrofilne (pravastatin, rosuvastatin). Većina statina se relativno brzo resorbuje nakon peroralne primene, a maksimalnu koncentraciju postižu za manje od 4 sata. Svi statini ulaze u hepatocite pomoću transportnih proteina, pretežno putem organskog anjonskog transportnog polipeptida (eng. *organic anion-transporting polypeptide*, OATP; SLCO) što omogućuje brz prodor u jetru i hidrofilnim oblicima koji zbog svojih osobina sporije difunduju kroz lipidnu ćelijsku membranu. Lipofilni statini podložni su u većoj meri presistemskoj eliminaciji, pretežno putem citohroma P450 (CYP450), zbog čega ih odlikuje slabija bioraspodivnost (5-20%) od hidrofilnih statina. Svi predstavnici ove grupe, osim pravastatina, vežu se u velikom procentu za proteine plazme, pa je sistemska izloženost nevezanom, farmakološki aktivnom leku, vrlo mala. Poluvreme eliminacije je individualno, a kreće se u rasponu od manje od 4 sata do više od 15 sati. Izuzev pravastatina koji se odlikuje izrazitim renalnim klirensom, preostali statini i njihovi metaboliti dominantno se izlučuju preko žuči i fecesa. Vreme potrebno za postizanje maksimalnog efekta statina kreće se od 4 do 6 nedelja (Frishman & Horn, 2008; Gazerro et al., 2012).

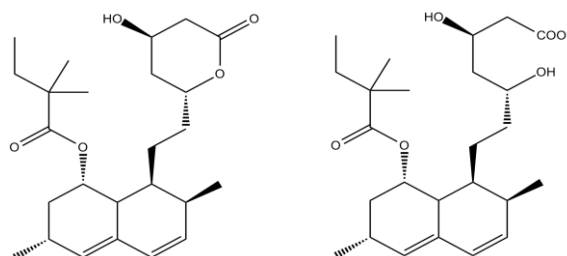
Uočeno je da među pacijenatima postoje značajne razlike u terapijskom odgovoru na ove lekove čiji razlog nastanka nije u potpunosti razjašnjen (Sirtori et al., 2012). One se delimično mogu pripisati genetskim razlikama (Kitzmiller et al., 2013), ali pretpostavlja se da i drugi faktori mogu biti uključeni kao što je metabolizam lekova pod dejstvom crevne mikroflore o čemu će se upravo i diskutovati u ovom radu.

1.1.5. Simvastatin – farmaceutsko-hemijske i farmakokinetičke osobine

Simvastatin, (1S,3R,7S,8S,8aR)-8-[2-[(2R,4R)-4-hidroksi-6-oksotetrahidro-2H-piran-2-il]etil]-3,7-dimetil-1,2,3,7,8,8a-heksahidronaftalen-1-il 2,2-dimetilbutanoat, je semisintetski statin, derivat produkata gljivica. Predstavlja široko propisivani lek iz grupe statina, koji se primenjuje peroralno kao prolek u obliku laktona (SVL) (Kumar Basniwal & Jain, 2012).

Aktivacija ovog leka se vrši u *in vivo* uslovima otvaranjem laktonskog prstena i nastankom β -hidroksi simvastatinske kiseline (SVK). Ova konverzija u aktivnu formu dešava se pomoću nespecifičnih karboksiesteraza u intestinalnom zidu, jetri, a delimično i u plazmi neenzimskom hidrolizom (Tubic-Grozdaniš et al., 2008). Procesi interkonverzije jednog oblika u drugi su reverzibilni, mada ne u istoj meri. Stepem hidrolize SVL u SVK je oko deset

puta veći od konverzije SVK u SVL, što ukazuje da je favorizovano stvaranje aktivnog oblika tj. kiseline (Prueksaritanont et al., 2005). Hemijske strukture SVL i SVK prikazane su na **Slici 3**.



Slika 3. Hemijske strukture simvastatin laktona i simvastatinske kiseline

Simvastatin je visoko liposolubiln lek čiji stepen apsorpcije iznosi 65-85%. Veže se za proteine plazme u visokom procentu (>95%). Maksimalnu koncentraciju postiže za 1.3-2.4 sata. Poluvreme izlučivanja iznosi 1.9-3h (Gazzerro et al., 2012). Simvastatin je podložan ekstenzivnom metabolizmu u jetri pretežno putem CYP3A4 enzima (>80%), a mali doprinos imaju i CYP3A5 i CYP2C8 (<20%) (Prueksaritanont et al., 2003). Pokazano je da je ovaj lek supstrat za membranske transportne proteine u crevima i jetri kao što su P-glikoprotein (P-gp; ABCB1), protein višestruke rezistencije na lekove (eng. *multidrug resistance-associated protein*, MRP) 2 (ABCC2) i OATP1B1 (SLCO1B1) (Chen et al., 2005).

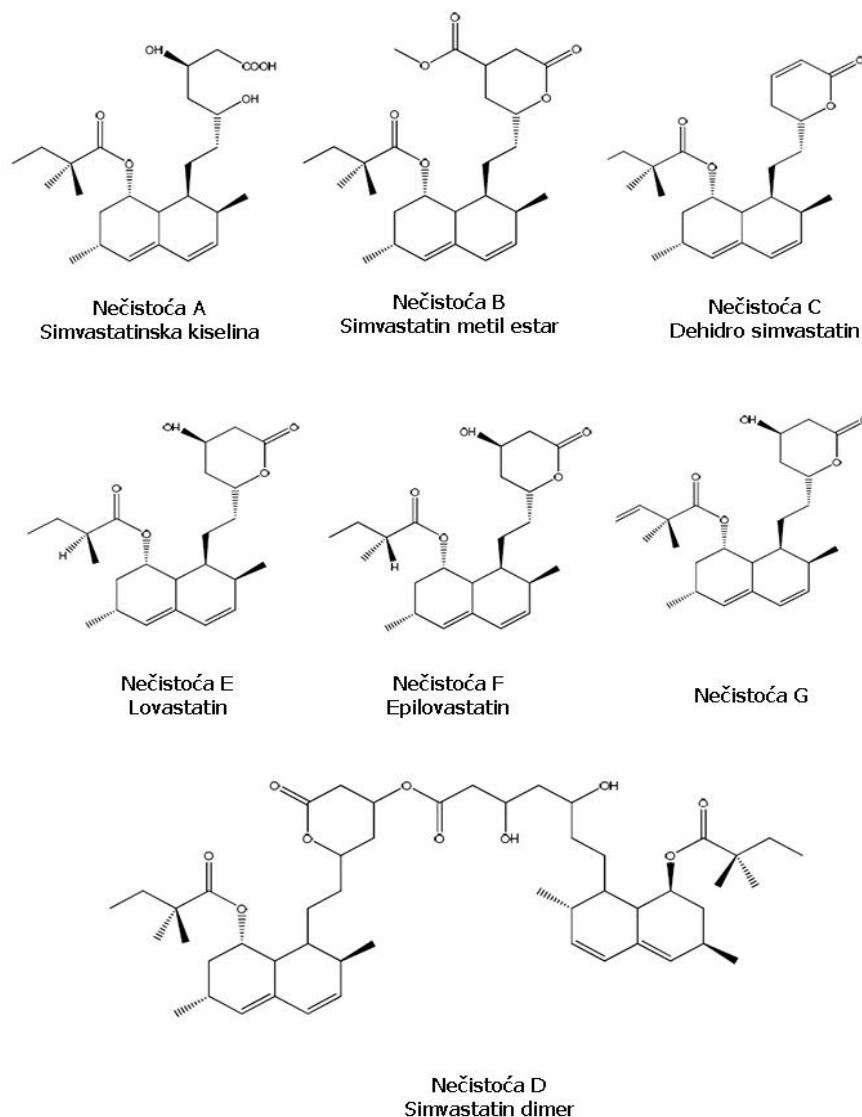
Pored aktivnog oblika, SVK, iz plazme su izolovani i njeni 6-hidroksi, 6-hidroksimetil i 6-egzometilen derivati. Simvastatin se većim delom izlučuje putem žuči (78-97%), a u manjoj meri bubrezima (13%) (Gazzerro et al., 2012).

Prema biofarmaceutskom sistemu klasifikacije (BSK) simvastatin spada u drugu klasu jedinjenja koja se odlikuju visokom permeabilnošću i niskom rastvorljivošću u vodi (<1,4 mg/L u vodi). Kod ove grupe lekova, brzina rastvaranja je ograničavajući faktor za biološku raspoloživost. Usled toga, kao i zbog izražene presistemske eliminacije u crevima i jetri, bioraspoloživost simvastatina iznosi manje od 5% (Kumar Basniwal & Jain, 2012). Stoga se ulažu veliki naponi kako bi se povećala rastvorljivost simvastatina u vodi što bi kao posledicu imalo i povećanje njegove bioraspoloživosti (Karolewicz et al., 2014).

1.1.6. Nečistoće simvastatina

Prema zvaničnim ICH (eng. *International Conference on Harmonization*) smernicama, nečistoće lekova predstavljaju bilo koju stranu komponentu prisutnu u novoj aktivnoj farmaceutskoj supstanci ili farmaceutskom doziranom obliku u količini većoj od 0.1% ili 0.05% (u odnosu na vrednost maksimalne dnevne doze) koja ne predstavlja hemijski entitet definisan kao nova aktivna farmaceutska supstanca ili ekscipijens u farmaceutskom doziranom obliku. Nečistoće mogu da potiču od polaznog materijala, mogu nastati kao intermedijeri ili sporedni produkti tokom sinteze aktivne supstance, mogu biti degradacioni produkti nastali tokom procesa proizvodnje i/ili tokom perioda čuvanja i transporta gotovog farmaceutskog doziranog oblika. Pored toga, u farmaceutskim proizvodima nečistoće mogu nastati i prilikom interakcija aktivne supstance sa ostalim ekscipijensima formulacije ili kontaktnom ambalažom (Bari et al., 2007).

Zbog specifičnog puta sinteze, važećim farmakopejskim propisima definisano je čak sedam nečistoća simvastatina: simvastatin hidrosi kiselina (nečistoća A), simvastatin metil ester (nečistoća B), dehidro simvastatin (nečistoća C), simvastatin dimer (nečistoća D), lovastatin i epilovastatin koji su stereoizomeri (nečistoće E i F, redom), i nečistoća G (European Pharmacopoeia, 2009). Na **Slici 4** su prikazane strukture svih nečistoća.



Slika 4. Nečistoće simvastatina definisane Evropskom farmakopejom (European Pharmacopoeia, 2009)

1.1.7. Analitičke metode za ispitivanje simvastatina i njegovih nečistoća

Razvijene su brojne metode za ispitivanje statina i njihovih nečistoća u biološkom materijalu i farmaceutskim oblicima. Razlike u strukturama i hemijskim osobinama statina, kao i činjenica da se u terapiji međusobno ne kombinuju različiti statini, rezultovale su razvojem pojedinačnih analitičkih metoda za pojedine statine. Ipak, razvoj analitičkih procedura koje nisu ograničene na analizu samo jednog statina može biti od velikog značaja u kontroli kvaliteta lekova. S obzirom na činjenicu da se dislipidemijski poremećaji obično leče različitim kombinacijama lekova, velika pažnja posvećuje se i razvoju metoda za simultanu determinaciju statina sa istovremeno primenjenim lekovima kao što su fibrati, nikotinska kiselina, holestiramin i drugi (Novakova et al., 2008; Kumar Basniwal & Jain, 2012).

Prvu metodu za određivanje simvastatina u krvnoj plazmi, zasnovanu na visokoefikasnoj tečnoj hromatografiji (eng. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC), opisali su Carlucci i saradnici (1992). Kumar Basniwal i Jain (2012) dali su pregled analitičkih metoda za određivanje simvastatina za period 1990-2012. Većina metoda (63%) zasnovana je na HPLC-u, 19% pripada spektrofotometrijskim metodama, 8% visokoefikasnoj tankoslojnoj hromatografiji (eng. *High Performance Thin Layer Chromatography*, HPTLC), 5% su elektrohemijske metode i enzimski testovi, 3% su gasno-masene analize i preostalih 2% čine ostale metode. Kako su terapijske koncentracije statina u krvi veoma niske, metoda izbora za kvantifikaciju statina i njihovih metabolita u biološkim tečnostima jeste tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom (LC-MS/MS).

Imajući u vidu problem interkonverzije laktonskog oblika u kiselinu i obrnuto, posebna pažnja posvećuje se odabiru mobilne faze za hromatografsku analizu kao i vremenu čuvanja uzoraka. Pokazano je da se degradacija simvastatina tokom studija stabilnosti dešava prema kinetici pseudo-prvog reda. Degradacija je pH zavisna i mnogo izraženija u alkalnoj nego u kiseloj sredini (Álvarez-Lueje et al., 2005). Yang i Hwang (2006) su pokazali da se laktonski oblik može gotovo potpuno transformisati u oblik kiseline u alkalnom rastvoru pripremljenom sa 25% ili 50% acetonitrila. U metanolnom alkalnom rastvoru, laktonski oblik može takođe da se potpuno konvertuje ali se konverzija nastavlja do metil estra hidroksi kiseline, pri čemu stepen konverzije raste sa porastom udela metanola. Izlaganje svetlosti takođe utiče na degradaciju simvastatina. U kiseloj sredini, interkonverzija između laktonskog i oblika kiseline na sobnoj temperaturi je smanjena, dok je pri istim uslovima u slučaju izlaganja sunčevoj svetlosti, ubrzana. Optimalan pH mobilne faze, gde je interkonverzija minimalna, iznosi oko 4,5 (Nigović et al., 2012).

Poseban značaj u razvoju lekova zauzima određivanje profila nečistoća u aktivnim supstancama i farmaceutskim proizvodima, s obzirom na to da njihovo prisustvo u malim količinama može dovesti do promene efikasnosti, aktivnosti ili stabilnosti leka, pojave neželjenog dejstva ili pak toksičnosti (Bari et al., 2007). U zvaničnim ICH smernicama postoje striktno smernice za identifikaciju i kvantifikaciju tragova nečistoća u lekovima. Ispitivanje nečistoća u sirovinama i farmaceutskim preparatima predstavlja poseban analitički izazov zbog sličnosti u fizičko-hemijskim osobinama sa aktivnom supstancom i zbog toga što se nalaze u izuzetno malim količinama. Zato je neophodno imati dovoljno selektivnu i osetljivu metodu farmaceutske analize.

Nekoliko hromatografskih metoda razvijeno je u cilju identifikacije i kvantifikacije poznatih nečistoća simvastatina, dok se nekoliko studija bavilo karakterizacijom nepoznatih nečistoća pomoću LC-MS/MS analize i nuklearno-magnetno-rezonantne (NMR) spektroskopije (Malenović et al., 2006; Bertacche et al., 2007; Plumb et al., 2007; Reddy et al., 2009).

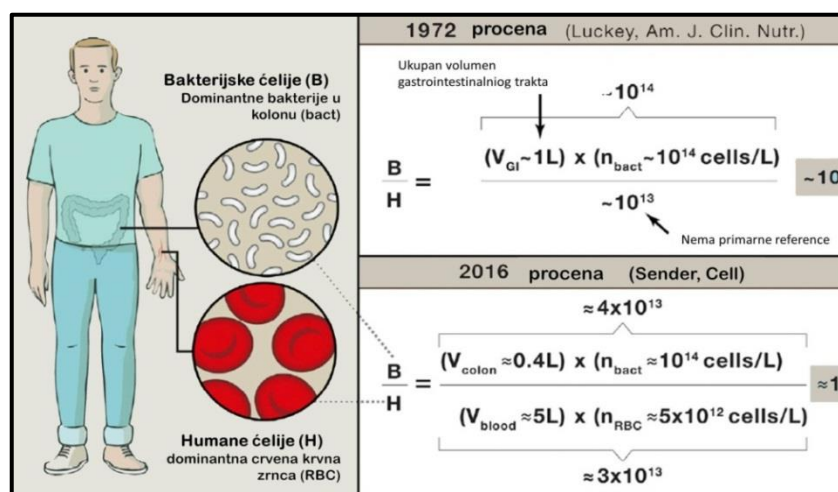
1.2. Crevna mikroflora i probiotici

1.2.1. Uloga i sastav crevne mikroflore

Na 400 kvadratnih metara površine creva, nalazi se preko 500 vrsta mikroorganizama, koje nazivamo crevnom mikroflorom (Lee & Hase, 2014; Stojančević et al., 2013a). Gastrointestinalni trakt predstavlja složeni ekosistem u kome se uspostavlja ravnoteža između domaćina i crevne mikroflore.

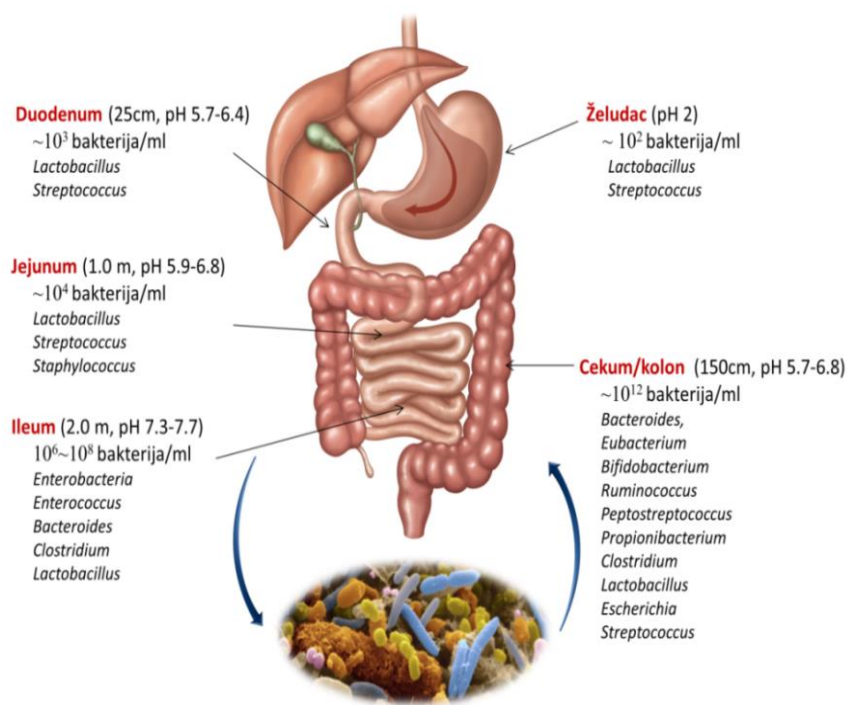
Intestinalni trakt fetusa u uterusu je sterilan. Izgradnja normalne crevne flore započinje nakon prolaska novorođenčadi kroz porođajni kanal pod dejstvom mikroflore majke. Dojenje bebe majčinim mlekom takođe pomaže u nastanku i očuvanju normalne crevne flore, jer se tako jača i imunološki sistem bebe. Do četvrte godine života kolonizacija i sazrevanje crevne mikroflore su završeni (Vrieze et al., 2010). Crevna flora kod odraslih ljudi je relativno stabilna, a na njen konačni sastav utiču genotip domaćina i činioci okoline (Li & Jia, 2013).

Do nedavno je važio opšte prihvaćeni i nekritički citirani podatak da broj bakterija u ljudskom organizmu nadmašuje broj humanih ćelija više od deset, pa čak i sto puta. U nedavno objavljenom istraživanju, Sender i saradnici (2016) došli su do zapanjujućih rezultata kojima su opovrgnuli ovu godinama staru pretpostavku utvrdivši da je odnos bakterijskih prema humanim ćelijama zapravo 1:1. Na **Slici 5**, prikazano je poređenje procene odnosa broja bakterija prema broju humanih ćelija prema staroj (Luckey, 1972) i aktuelnoj literaturi (Sender et al., 2016). Ono što su ovi naučnici i sami istakli je da ovakav podatak ni u kom slučaju ne treba da umanja značaj bakterijske populacije u organizmu čoveka.



Slika 5. Poređenje procene odnosa broja bakterija prema broju humanih ćelija prema staroj (Luckey, 1972) i aktuelnoj literaturi (Sender et al., 2016). Slika preuzeta iz reference (Sender et al., 2016) i modifikovana.

Preko 80% crevne bakterijske populacije kod ljudi čine anaerobi iz reda Firmicutes (Gram-pozitivni), Bacteroidetes (Gram-negativni) i Actinobacteria (Gram-pozitivni). Među njima dominira red Firmicutes koji sadrži više od 200 rodova uključujući rodove *Lactobacillus*, *Bacillus* i *Clostridium* (Vrieze et al., 2010). Broj mikroorganizama raste na putu od želuca ka debelom crevu, a razlikuje se i njihov sastav u pojedinim segmentima gastrointestinalnog trakta (Marik, 2012; Sartor, 2008) što je ilustrovano na **Slici 6**.



Slika 6. Sastav i raspored crevne mikroflore po sekcijama u okviru gastrointestinalnog trakta kod čoveka

Crevna mikroflora igra važnu ulogu u sazrevanju imunološkog sistema, razvoju normalne crevne morfologije, održavanju funkcije crevne sluznice, kao i u odbrani od brojnih alergena. Takođe, pomaže u prevenciji infekcija patogenim mikroorganizmima (Clemente et al., 2012).

Crevna mikroflora učestvuje u metabolizmu brojnih endogenih supstanci u organizmu kao što su bilirubin, holesterol, žučne kiseline, steroidni hormoni, masne kiseline, vitamin B12 i K. Fermentacijom ugljenih hidrata od strane anaerobnih bakterija u crevima, nastaju kratkolančane masne kiseline, uglavnom sirćetna, propanska i butanska, koje utiču na intestinalni epitelni transport, metabolizam u crevima, a uz to obezbeđuju energiju za srce, mišiće, mozak i bubrege. Bakterije u crevima učestvuju i u metabolizmu proteina i lipida iz hrane (Flint et al., 2012).

S obzirom na to da crevna mikroflora ima veoma važne uloge u organizmu čoveka, promene u njenom sastavu i aktivnosti mogu dovesti do narušavanja zdravlja domaćina. Brojni faktori, kao što su antibiotska terapija, stres, zračenje, promene navika u ishrani i načinu života, izmenjena peristaltika creva, mogu dovesti do disbioze tj. narušavanja biološke ravnoteže između patogenih mikroorganizama i fiziološke tj. korisne mikroflore u organizmu čoveka (Myers, 2004). Promena u sastavu crevne mikroflore povezana je i sa različitim bolestima kao što su inflamatorna bolest creva (Stojančević et al., 2012), dijabetes (Al-Salami et al., 2012b), bolesti jetre i kolorektalni karcinom (Li & Jia, 2013).

Narušena ravnoteža crevne mikroflore može da se modifikuje unošenjem živih mikroorganizama tj. probiotika, koji svojom aktivnošću doprinose očuvanju i unapređenju zdravlja (Stojančević et al., 2013a).

1.2.2. Probiotici

Prema definiciji SZO, probiotici su živi mikroorganizmi, koji primenjeni u adekvatnoj količini, ispoljavaju pozitivne efekte na zdravlje domaćina (Joint FAO/WHO Working Group, 2007). Prva istraživanja probiotika sproveo je početkom 20. veka ruski istraživač, Élie Metchnikoff koji je u proizvodnju fermentisanog mleka uveo soj *Lactobacillus bulgaricus*. On je pretpostavio da se fiziološki proces starenja može usporiti promenom sastava crevne flore upotrebom jogurta obogaćenog *Lactobacillus* sojem. Ova istraživanja su dovela do naših prvih saznanja o rodu *Lactobacillus* (Metchnikoff, 2004). U periodu između kasnih 30-ih i kasnih 50-ih godina 20-og veka, došlo je do stagnacije istraživanja u ovoj oblasti usled brojnih ratova sa kojima se svet suočio. Ponovni interes za proučavanje probiotika javlja se krajem 50-ih godina 20-og veka, kada se uvodi koncept probiotika (Vasiljevic & Shah, 2008). Mikrobiolozi Goldin i Gorbrach su utvrdili kriterijume koje idealni probiotik treba da zadovolji (Gorbach, 2002):

- pripadnost vrsti ili soju koji se normalno nalazi u intestinalnom traktu
- sposobnost adherencije za ćelije crevnog epitela i kolonizacija creva sprečavajući vezivanje patogena
- rezistencija na nizak pH želudačnog soka i na žučne soli
- sposobnost produkcije antimikrobnih supstanci
- ispoljavanje pozitivnih efekata na zdravlje domaćina
- visok nivo bezbednosti po zdravlje čoveka

Oni su 1985. godine izolovali iz ljudskog digestivnog trakta probiotik *Lactobacillus rhamnosus GG* i nazvali ga prema svojim inicijalima (LGG). On danas predstavlja najistraženiji probiotik. Postoje dokazi o njegovom pozitivnom efektu u lečenju gastrointestinalnih oboljenja, kao i o sposobnosti jačanja imunološkog sistema (Gorbach, 2002).

Kombinacije različitih bakterijskih sojeva danas se koriste kao komercijalni probiotici, mada se najčešće primenjuju Gram-pozitivne bakterije iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus GG*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*), koje su i deo normalnog sastava crevne mikroflore (Kleerebezem & Vaughan, 2009; Pavlović et al., 2012; Stojančević et al., 2013a). Na tržištu se mogu naći različiti preparati probiotika, sa jednom ili više vrsta probiotskih bakterija, u količini od 1 do 20 milijardi (10^9 - 20×10^9) fizioloških bakterija u jednoj kapsuli.

Probiotici pomažu varenje hrane i resorpciju hranljivih materija, učestvuju u sintezi pojedinih vitamina, onemogućavaju ili ometaju naseljavanje štetnih mikroorganizama, a pomažu i normalnu pokretljivost organa za varenje. Pokazano je da probiotici imaju ulogu u jačanju imunološkog sistema, prevenciji kancera, metaboličkih poremećaja, poseduju antioksidativno, antihipertenzivno delovanje, ublažavaju simptome dermatitisa, artritisa i alergijskih reakcija (Ferreira et al., 2011). Od nedavno su probiotici našli primenu i u autoimunim bolestima kao što je tip 1 dijabetesa. Mogući mehanizmi delovanja uključuju antiinflamatorno delovanje koje rezultuje smanjenjem progresije bolesti i njenih komplikacija, što može biti posledica normalizacije narušene ravnoteže crevne mikroflore (Al-Salami et al., 2012b). Savremena istraživanja ukazala su i na mogućnost upotrebe probiotika u prevenciji i terapiji hiperholesterolemije kod ljudi (Pavlović et al., 2012; Ooi & Liong, 2010).

Iako je precizan mehanizam delovanja nepoznat, pretpostavlja se da svoje pozitivne efekte na zdravlje domaćina probiotici ispoljavaju različitim mehanizmima: preko antibakterijskih supstanci (bakteriocini i dr.), produkcijom nespecifičnih antimikrobnih supstanci, podstičući produkciju antimikrobnih jedinjenja od strane domaćina (defenzin), direktnom enzimskom aktivnošću u crevnom lumenu, smanjenjem luminalnog pH, inhibicijom bakterijske adherencije i kompeticijom za nutrijente. Postoje dokazi da za ispoljavanje pojedinih efekata nisu potrebne žive bakterije već su dovoljne integralne

komponente bakterijske ćelije kao što su fragmenti peptidoglikana ili deoksiribonukleinske kiseline (DNK) (Oelschlaeger, 2010).

1.2.2.1. Hipoholesterolemijski efekat probiotika

Još 1974. godine, naučnici Mann i Spoerry, primetili su da stanovnici afričkog plemena Massai imaju znatno niži nivo lipida u krvi pripisujući ga pojačanom unosu fermentisanog mleka (Mann & Spoerry, 1974). Nakon toga, posumnjalo se da snižavanju holesterola zapravo doprinose živi laktobacili koji ulaze u sastav fermentisanog mleka (Speck, 1976). Ovaj efekat probiotika je postao očigledniji otkrićem sposobnosti laktobacila da vrše dekonjugaciju žučnih kiselina i asimilaciju holesterola (Gilliland & Speck, 1977; Gilliland et al., 1985).

Pretpostavlja se da hipoholesterolemijski efekat probiotici ostvaruju brojnim molekularnim mehanizmima uključujući efekte na nivou membranskih proteina, enzimske regulacije, kao i genske ekspresije tokom transkripcije odnosno translacije, ali su potrebna dalja istraživanja kako bi se predložene hipoteze potvrdile. Predloženi su sledeći mehanizmi kojima probiotici ostvaruju hipoholesterolemijski efekat (Pavlović et al., 2012):

- Dekonjugacija žučnih soli pomoću enzima hidrolaze žučnih soli (eng. *Bile Salt Hydrolase*, BSH, EC 3.5.1.24),
- Asimilacija i inkorporacija holesterola u membrane probiotika,
- Koprecipitacija holesterola sa dekonjugovanim žučnim kiselinama,
- Konverzija holesterola u koprostanol,
- Produkcija masnih kiselina kratkih lanaca (eng. *short chain fatty acids*, SCFA),
- Smanjenje ekspresije NPC1L1 (eng. *Niemann-Pick C1-Like 1*) proteina na membrani enterocita.

Osim direktnog uticaja na snižavanje holesterola, pozitivne efekte na metabolizam lipida probiotici ispoljavaju i tako što regulišu sastav crevne mikroflore koji je uglavnom narušen kod ljudi sa poremećenim metabolizmom lipida (Million et al., 2012).

1.2.3. Uloga crevne mikroflore i probiotika u metabolizmu lekova

Dugo vremena, jetra se smatrala glavnim organom odgovornim za metabolisanje lekova. Međutim, 70-tih godina 20-og veka dokazana je i uloga intestinalnog trakta u ovom procesu (Breckenridge, 1977). Pored enzima prisutnih u crevnom lumenu i enterocitima,

utvrđeno je da ogroman metabolički kapacitet poseduje i crevna mikroflora (Mikov 1994; Stojančević et al., 2013a). Naime, pored održavanja intestinalne homeostaze, crevna mikroflora je prepoznata kao poseban biosistem sa visokim potencijalom za metabolizam lekova. Uticaj crevne mikroflora na metabolizam leka se ostvaruje putem sledećih mehanizama (Saad et al., 2012):

- Sekrecija enzima koji dovode do modifikacije hemijske strukture molekula leka,
- Sekrecija metaboličkih produkata koji interreaguju sa metabolizmom leka,
- Modifikacija aktivnosti i nivoa crevnih i jetrenih enzima,
- Modulacija ekspresije metaboličkih gena.

Stoga, interakcije crevne mikroflora i probiotika sa peroralno unetim lekovima mogu da rezultuju u značajnoj promeni njihove farmakološke aktivnosti. Brojnim studijama je pokazano da su interindividualne i intraindividualne razlike u terapijskom odgovoru posledica upravo metabolizma lekova pod dejstvom crevne mikroflora (Mikov, 1994; Wilson & Nicholson, 2009; Clemente et al., 2012; Gonzalez et al., 2011; Breckenridge, 1977). Naime, svaka osoba ima specifičan bakterijski sastav (eng. „*fingerprint*“) koji doprinosi interindividualnim razlikama u terapijskom odgovoru. Interesantno je da je sastav crevne mikroflora unutar jednog organizma relativno stabilan tokom života, ali ipak postoje situacije koje privremeno ili trajno mogu da izmene sastav crevne mikroflora, kao što su različite bolesti, stres, terapija antibioticima ili primena nekih drugih lekova, prekomerna konzumacija alkohola, izlaganje toksinima (Sekirov et al., 2010), što dovodi do intraindividualnih razlika u metabolisanju lekova.

Kako bi istakli uticaj mikrobioma na odgovor leka, Saad i saradnici (2012) predložili su termin farmakomikrobiomika. Ipak, većina studija koja se bavi ispitivanjem mikrobiom-lek interakcija ne uzima u obzir razlike u kompoziciji crevne mikroflora između pojedinaca ili populacije, iako su ove varijacije osnova farmakomikrobiomike. Primenjuje se nekoliko pristupa za ispitivanje metaboličke aktivnosti crevne mikroflora u biotransformaciji lekova, kao što su poređenje metaboličkog profila konvencionalnih i „*germfree*“ miševa, odnosno miševa bez normalne bakterijske flore, biohemijski testovi metaboličke aktivnosti u kulturama ćelija kao i tzv. *population-based* pristupi koji podrazumevaju ispitivanje korelacije između kompozicije crevne mikroflora i terapijskog odgovora na lek u populaciji (Saad et al., 2012).

Primena probiotika može promeniti dejstvo druge lekovite supstance jednim od dva mehanizma: modifikacijom farmakološkog efekta lekovite supstance bez promene

koncentracije u telesnim tečnostima (farmakodinamske interakcije) i promenom koncentracije lekovite supstance koja dospeva na mesto delovanja (farmakokinetičke interakcije). Farmakokinetičke interakcije se mogu javiti na nivou apsorpcije, distribucije, metabolizma i izlučivanja pri čemu dejstvo lekovitih supstanci, usled interakcije, može biti oslabljeno ili pojačano. Apsorpcija lekovite supstance u prisustvu probiotika može biti ubrzana, odložena, smanjena ili povećana usled fizioloških promena, kao i usled fizičkih i/ili hemijskih interakcija. Interakcije sa probioticima mogu dovesti do promene rastvorljivosti, hemijske stabilnosti i/ili permeabilnosti lekovite supstance što kao posledicu može da ima izmenjen farmakološki i bezbednosni profil leka. Pokazano je da probiotske bakterije utiču na ekspresiju i funkciju različitih proteina i membranskih transportera drugih bakterija u crevima (Stojančević et al., 2013a). S obzirom na posledice koje tom prilikom mogu nastati, ova oblast postaje fokus brojnih istraživanja.

1.2.3.1. Primeri metabolisanja lekova pod dejstvom crevne mikroflore i probiotika

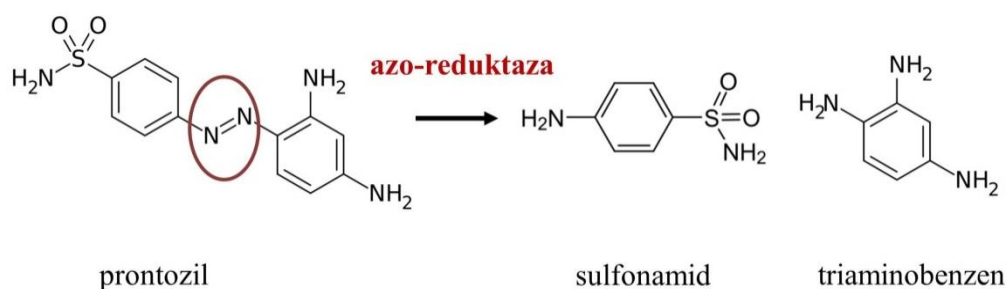
Lekovi koji u većem procentu mogu biti izloženi crevnoj mikroflori su oni koji se uzimaju peroralno, slabo su rastvorljivi, i/ili imaju malu permeabilnost, i dosežu do nižih partija gastrointestinalnog trakta gde je crevna mikroflora najbrojnija. Transformacije lekova koja se dešavaju pod dejstvom crevne mikroflore mogu da rezultuju nastankom odgovarajućih aktivnih, neaktivnih, pa čak i toksičnih metabolita, menjajući na taj način farmakološki i bezbednosni profil peroralno aplikovanih lekova (Stojančević et al., 2013a).

Nasuprot jetri koja je prvenstveno odgovorna za metaboličke reakcije oksidacije i konjugacije, mikroflora creva je uglavnom uključena u reduktivne i hidrolitičke reakcije. Prisustvo hidrolitičkih enzima crevne mikroflore omogućava dekonjugaciju, reapsorpciju i oslobađanje slobodnog leka ili njegovih metabolita, produžavajući mu na taj način poluvreme života u krvi putem enterohepatičke cirkulacije. Pored toga, crevne bakterije ekspimiraju različite enzime uključene u reakcije dekarboksilacije, dehidroksilacije, dealkilacije, acetilacije i deacetilacije, denitracije, N-demetilacije, dehalogenacije, deaminacije, otvaranja tiazolskog prstena, kao i u metabolizam glutation konjugata ksenobiotika izlučenih u žuč (Sousa et al., 2008).

Istraživanja metaboličke aktivnosti crevne mikroflore do nedavno su bila fokusirana pretežno na prirodne proizvode u formi glikozida, koji se dejstvom pomenutih enzima hidrolitički razgrađuju (Kang et al., 2013). Ulozi crevne mikroflore u metabolizmu lekova veća pažnja od strane farmaceutske industrije posvećuje se tek nakon nesrećnog slučaja 1993.

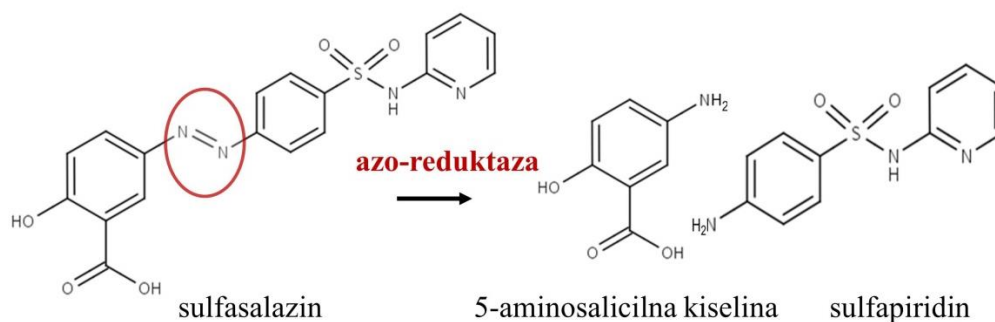
godine sa antivirusom sorivudinom, čiji je metabolit, (E)-5-(2-bromovinil) uracil, nastao pod dejstvom crevne mikroflore, doveo do interakcija sa istovremeno primenjenim citostatikom 5-fluorouracilom, što je rezultovalo smrtnim slučajevima kod 18 pacijenata (Okuda et al., 1998). Tako je sorivudin ubrzo po puštanju u promet i povučen sa tržišta.

Prontozil, prvi komercijalno dostupni antibakterijski lek, jedan je od prvih primera aktivacije leka uz pomoć azo-reduktaza crevne mikroflore koje ga konvertuju u aktivni sulfonamid (Slika 7). Ova reakcija se odigrava u dva koraka - formiranje hidrazo jedinjenja, a potom sledi redukcija nitro-grupe nakon čega nastaje aktivni metabolit (Gingell et al., 1969).



Slika 7. Aktivacija prontosila pomoću azoreduktaza crevne mikroflore

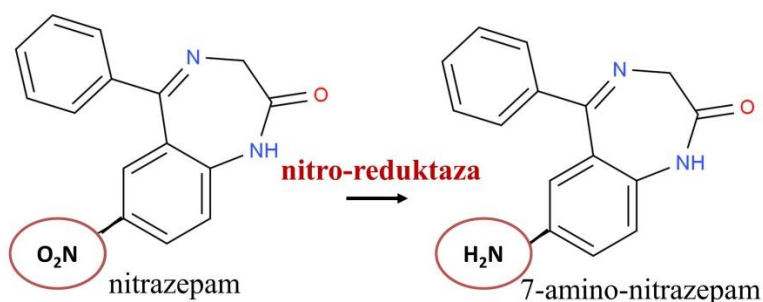
Crevna mikroflora takođe ima ključnu ulogu i u aktivaciji sulfasalazina. Naime, molekul sulfasalazina se sastoji iz dva dela, 5-aminosalicilne kiseline i sulfapiridina koji su spojeni azo-vezom. Samo mali deo peroralno unetog sulfasalazina se apsorbuje. Većina leka ide do kolona gde podleže azo-redukciji pri čemu se kida azo-veza i osobađaju se sulfapiridin, za koga je pokazano da je efikasan u reumatoidnom artritisu, i 5-aminosalicilna kiselina koja predstavlja aktivni agens u inflamatornoj bolesti creva (Slika 8) (Lee et al., 2012; Mikov et al., 2006).



Slika 8. Aktivacija sulfasalazina pomoću azo-reduktaza i formiranje 5-aminosalicilne kiseline i sulfapiridina

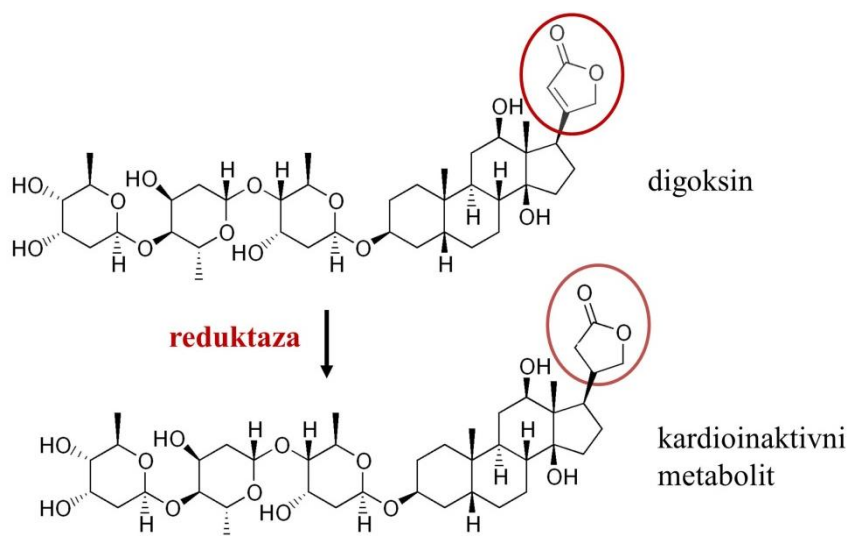
Uobičajene mete bakterijskih enzima su i nitro-grupe, koje podležu redukciji do primarnih amina. Još 1967. godine, u toku inkubacije hloramfenikola sa crevnim bakterijama, detektovano nekoliko reakcija kao što su konverzija nitro-grupe do primarnog aromatičnog amina i hidroliza amidne veze (Holt, 1967). Reakcije nitro-redukcije pod dejstvom crevne mikroflore uočene su kod lekova kao što su nitrazepam, klonazepam, mizonidazol, koji u svojoj hemijskoj strukturi sadrže nitro-grupe (Grundmann, 2010).

Takeno i Sakai (1991) su pretpostavili da teratogenost nitrozepama može biti upravo posledica ove reakcije i nastanka 7-amino-nitrazepama (**Slika 9**).



Slika 9. Nitro-redukcija nitrazepama i nastanak teratogenog metabolita

Od velikog interesa za farmaceutsku industriju predstavljaju nepredvidive posledice reakcija posredstvom crevne mikroflore, kao što je izostanak efekta leka. Tako je kod kardiotioničnog leka digoksina utvrđeno da pod dejstvom reduktaza crevnih bakterija dolazi do značajne konverzije digoksina do kardioinaktivnih metabolita kod kojih je laktonski prsten redukovan (**Slika 10**) (Butler et al., 1983).

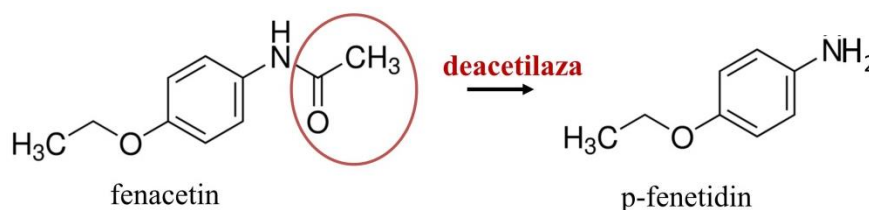


Slika 10. Redukcija digoksina do kardioinaktivnog metabolita

Crevna mikroflora takođe igra ulogu i u redukciji jedinjenja koja sadrže sumpor. Tako je uočeno da dolazi do redukcije sulfoksid jedinjenja, kao što je sulindak, do sulfidnih metabolita (Strong et al., 1984).

Hidroliza laktuloze pod dejstvom enzima crevne mikroflore dovodi do nastanka mlečne i sirćetne kiseline smanjujući pri tom pH crevnog sadržaja koji posledično stimuliše sekreciju vode u crevni lumen, odnosno dovodi do aktivacije laktuloze u terapiji opstipacije (Grundmann, 2010).

Primer reakcije deacetilacije pod dejstvom bakterijskih deacetilaza, ustanovljen je kod jednog od prvih sintetskih analgetika, fenacetina. Ovaj lek pokazuje brzu i skoro potpunu resorpciju iz gastrointestinalnog trakta i metaboliše se do acetaminofena u jetri. Ipak, mali deo podleže reakciji deacetilacije pod dejstvom bakterijskih enzima u crevima pri čemu dolazi do formiranja p-fenetidina (**Slika 11**). Nastanak p-fenetidina, korelira sa nastankom methemoglobinemije i nefritisa koji predstavljaju neke od komplikacija primene fenacetina (Smith & Griffiths, 1974). Ovaj lek je zbog pomenutih neželjenih efekata povučen sa tržišta 1983. godine.



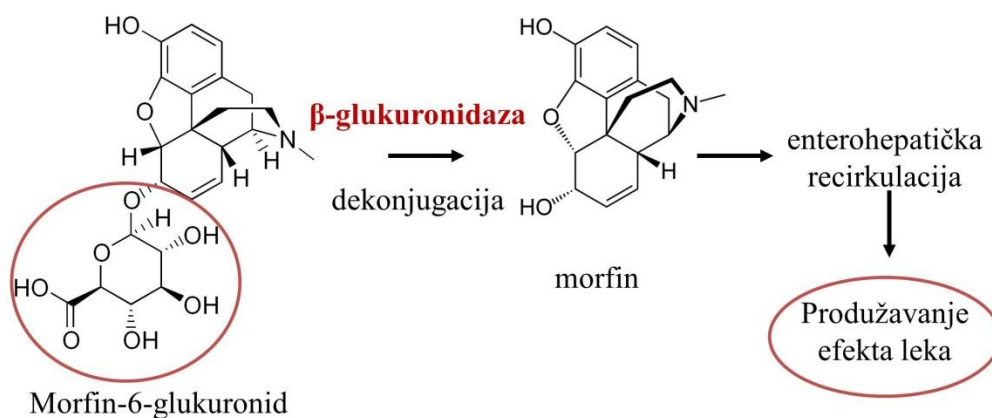
Slika 11. Deacetilacija fenacetina i formiranje p-fenetidina

Pokazano je i da se deo dekarboksilacije L-dope, koja je neophodna za njenu aktivaciju, dešava upravo u crevima pomoću enzima crevne mikroflore (Goldin et al., 1973).

Pretpostavlja se da je slaba apsorpcija ranitidina iz kolona delimično posledica aktivnosti crevne mikroflore usled cepanja NO veze i gubitka atoma kiseonika (Basit et al., 2004).

Crevna mikroflora je takođe odgovorna za dekonjugaciju morfin-6-glukuronida. Metabolički put morfina podrazumeva kojugaciju u jetri do morfin-6-glukuronida, koji predstavlja aktivni oblik leka i do morfin-3-glukuronida, koji je neaktivan. Uklanjanjem polarne konjugovane grupe morfin-6-glukuronida uz pomoć glukuronidaza crevne mikroflore, ponovo se oslobađa slobodan lek i omogućava se reapsorpcija. Na taj način dolazi do

enterohepatičke recirkulacije, produžavanja poluvremena eliminacije i odlaganja ekskrecije lekova, što ima uticaja na konačnu bioraspodivnost (**Slika 12**) (Stain-Textier et al., 1998).



Slika 12. Dekonjugacija morfin-6-glukuronida i oslobađanje aktivnog leka

1.2.4. Transportni proteini crevne mikroflore i probiotika

Kao sve biološke membrane, i bakterijske membrane u svom osnovnom hemijskom sastavu sadrže proteine, lipide i ugljene hidrate. U manjoj količini ima i nukleinskih kiselina, poliamina, neorganskih jona i vezane vode. Procentni odnos lipida i proteina zavisi od vrste membrana. Bakterijske ćelije su okružene najmanje jednim slojem lipida i citoplazmatskom membranom koja sprečava influks lekova u ćeliju. Gram-pozitivne bakterije su okružene tankim zidom sačinjenim od peptidoglikana koji pruža manji otpor difuziji manjih molekula. Gram-negativne bakterije imaju dodatnu membranu sa spoljašnje strane koja je manje permeabilna za lipofilne lekove (Nikaido, 1994).

Membranski transportni sistemi prisutni su kako kod eukariotskih tako i kod prokariotskih ćelija. S obzirom na njihovu značajnu ulogu u farmakokinetici lekova, veliki broj studija posvećen je ispitivanju transporta lekova kroz biološke membrane putem transportnih proteina, kao i ispitivanju faktora koji mogu da na njega utiču (Stojančević et al., 2013a; Yang et al., 2011a; Al-Salami et al., 2008). Većina studija bavi se ispitivanjem eukariotskih transporterata, pre svega na nivou intestinalnog trakta i krvno-moždane barijere. Poznato je da eukariotski transporteri u pogledu proteinskih sekvenci imaju svoje bliske homologe u prokariotskim organizmima, što za posledicu ima i srodnu supstratnu specifičnost (Kourtesi et al., 2013). Bakterijski transporteri su do sada prvenstveno proučavani u pogledu rezistencije na antibiotike i druge lekove s obzirom da aktivnim efluksom, izbacujući lek iz ćelije, smanjuju koncentraciju antibiotika u bakterijskoj ćeliji ispod minimalnih inhibitornih koncentracija (Mathur & Singh, 2005).

Mada pojedini transporteri prenose specifičan tip supstrata, većina transporterata učestvuje u transportu raznovrsnih klasa lekova sa znatno različitim hemijskim strukturama (tzv. *multidrug* transporteri). Prema sličnosti aminokiselinskih sekvenci, podela bakterijskih transporterata se može izvršiti na 2 velike grupe: ABC (eng. *ATP-Binding Cassette*) transporteri i sekundarni transporteri. Sekundarni transporteri se dalje dele na (Putman et al., 2000; Kourtesi et al., 2013):

- MFS (eng. *Major Facilitator Superfamily*) superfamilija,
- MATE (eng. *Multidrug & Toxic Compound Efflux*) superfamilija,
- RND (eng. *Resistance-Nodulation Division*) superfamilija,
- SMR (eng. *Small Multidrug Resistance*) superfamilija.

Transporteri koji pripadaju ABC porodici koriste energiju dobijenu hidrolizom ATP-a, dok sekundarni *multidrug* transporteri koriste transmembranski elektrohemijski gradijent. Za razliku od eukariotskih ABC transportera koji vrše efluks, prokariotski ABC transportni proteini imaju i uloge influks i efluks transportera. Nasuprot eukariotskim ćelijama gde *multidrug* transporteri uglavnom pripadaju ABC familiji, većina do sada poznatih bakterijskih *multidrug* transportera pripada sekundarnim transporterima (Putman et al., 2000). Samo neki od njih, kao što su LmrA i LmrCD transporteri bakterije *Lactococcus lactis*, HorA transporter kod *Lactobacillus brevis* i BmrA kod *Bacillus subtilis* pripadaju ABC porodici. MFS superfamilija predstavlja najveću grupu sekundarnih transportera u koju se ubrajaju dobro proučeni *multidrug* transporteri Bmr i Blt kod *Bacillus subtilis* i LmrP kod *Lactococcus lactis* (Putman et al., 2000).

Jedan od osnovnih mehanizama opstanka bifidobakterija i laktobacila u inetstinalnoj sredini u prisustvu žučnih soli i antibakterijskih peptida je upravo posledica prisustva MDR (eng. *multidrug resistance*) efluks proteina (Gueimonde et al., 2009). Ovakvi transporteri, koji su sposobni izbacuju žučne kiseline iz ćelije, pronađeni su kod Gram-pozitivnih bakterija *Lactococcus lactis* (Zaidi et al., 2008) i *Lactobacillus johnsonii* (Elkins & Savage, 2003). Kod bakterije *Lactobacillus plantarum* identifikovan je protein čija je ekspresija indukovana žučnim kiselinama (Bron et al., 2004). Margolles i saradnici (2006) su identifikovali i okarakterisali dva MDR transportera kod bakterije *Bifidobacterium breve*, BbmAB i BbmR, koji doprinose rezistenciji na antibiotike. Pokazano je da Ctr transporter iz grupe MDR proteina učestvuje u izbacivanju holata iz ćelije kod bakterije *Bifidobacterium longum*, doprinoseći rezistenciji na ova jedinjenja, ali i na brojne antibiotike (Price et al., 2006).

Kao što je pomenuto, predstavnici svih grupa transportnih proteina su eksprimirani i u ćelijama sisara (Kourtesi et al., 2013). Tako su npr. BmrA transporter kod *Bacillus subtilis*, i LmrA transporter kod *Lactococcus lactis*, homologni transporteri humanog P-gp (Li & Nikaido, 2009) i poseduju sličnu specifičnost za lekove. Pokazano je da je HorA *multidrug* eksporter, koji ima 53% sličnosti u aminokiselinskoj sekvenci sa LmrA kod *Lactococcus lactis*, odgovoran za rezistenciju bakterije *Lactobacillus brevis* na izo-alfa-kiseline kao antibakterijske komponente prisutne u hmelju (Sakamoto et al., 2001).

1.3. Žučne kiseline

1.3.1. Sinteza i enterohepatička cirkulacija žučnih kiselina u organizmu

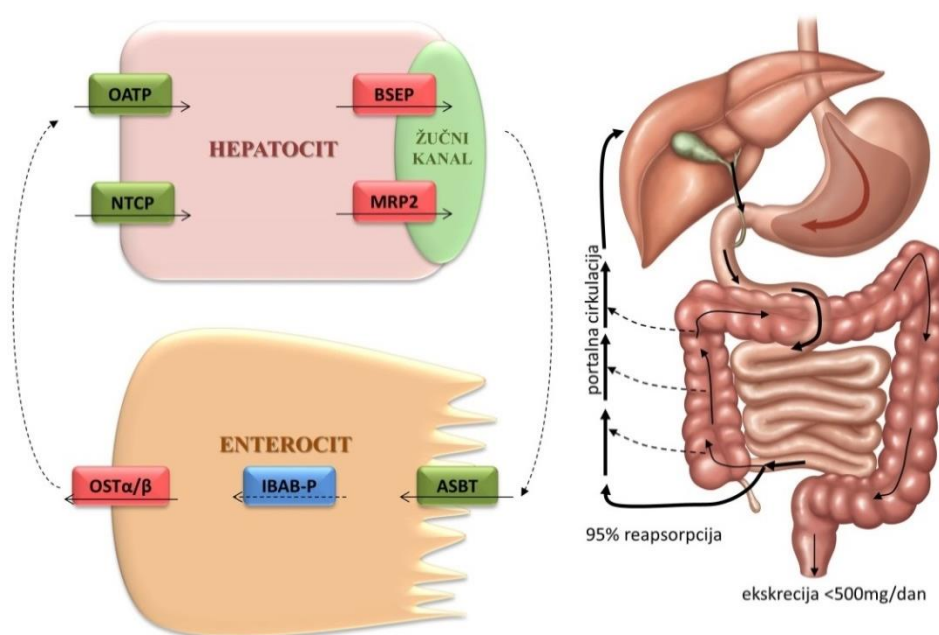
Žučne kiseline su steroidna jedinjenja koja se sintetišu iz holesterola u jetri i skladište u žučnoj kesici, a oslobađaju se iz žučne kese u lumen creva kao odgovor na obrok bogat mastima. U crevima se nalaze u obliku mešanih micela koje sadrže holesterol, fosfolipide i žučne soli koje su umetnute između polarnih glava fosfolipida. Ove micelle olakšavaju varenje i resorpciju lipida i liposolubilnih vitamina (Mikov & Fawcett, 2006; Monte et al., 2009; Mukhopadhyay & Maitra, 2004).

Primarne žučne kiseline koje nastaju u jetri su holna (CA) i henodeoksiholna kiselina (CDCA). Sekundarne žučne kiseline, deoksiholna (DCA) (3α , 12α -dihidroksi- 5β -holna) i visoko toksična, litoholna (LCA) (3α -monohidroksiholna), nastaju od CA i CDCA, mikrobiološkim transformacijama u digestivnom traktu, reakcijama 7-dehidroksilacije (Mikov & Fawcett, 2006; Kuhajda et al., 2007). Druge promene u molekulima žučnih kiselina uključuju oksidacije hidroksilnih do keto grupa, epimerizacije C-3, C-7 ili C-12 hidroksilnih grupa do odgovarajućih epimera, kao i izomerizaciju veza u A/B prstenovima. Kako primarne, tako i sekundarne žučne kiseline mogu da se konjuguju sa glicinom ili taurinom pri čemu nastaju konjugati tj. soli žučnih kiselina, koji su manje toksični, sa izraženijim hidrofilnim karakteristikama i nižom vrednosti pKa, što olakšava formiranje micela u duodenumu (Stanimirov et al., 2015). Koncentracija žučnih kiselina u tankom crevu varira od 2-3 mM, do 6-10 mM nakon obroka (Small et al., 1972). U ljudskom organizmu, najzastupljenije su CA, CDCA i DCA i to u obliku konjugata sa glicinom (75%) ili taurinom (25%) (Mukhopadhyay & Maitra, 2004).

Žučne kiseline ulaze u proces enterohepatičke recirkulacije pri čemu se oko 90-95% ponovo reapsorbuje u cirkulaciju. Enterohepatička recirkulacija je složen proces koji se odvija 6 do 15 puta na dan (Sievänen, 2007). Pre sekrecije u žuč, žučne kiseline se aktiviraju preko AcCoA i konjuguju sa taurinom ili glicinom. Za razliku od nekonjugovanih žučnih kiselina koje mogu da difunduju kroz membrane, konjugovane zahtevaju nosače pa se iz hepatocita izlučuju u žučne kanaliće preko pumpe za izbacivanje žučnih soli (eng. *bile salt export pump*, BSEP; ABCB11) i MRP2 proteina koji se nalaze na apikalnoj strani hepatocita. Zajedno sa žuči, ove kiseline dospevaju u lumen tankog creva. U tankom crevu i kolonu konjugovane žučne kiseline podležu dekonjugaciji pod dejstvom bakterijskih hidrolaza žučnih soli, a potom

pod dejstvom enzima crevne mikroflore nastaju sekundarne žučne kiseline (Hofmann, 2011; Small et al., 1972; Stanimirov et al., 2015). U predelu ileuma veći deo žučnih kiselina ulazi u enterocite preko apikalnog natrijum zavisnog transportera žučnih soli (eng. *Apical Sodium-dependent Bile acid Transporter*, ASBT; SLC10A2) koji se nalaze na apikalnoj strani enterocita. Kada uđu u enterocit, žučne kiseline aktiviraju farnesoid X receptor (FXR) (Stojančević et al., 2012), čijom aktivacijom dolazi do ekspresije organskog rastvorljivog transportera (eng. *Organic Solute Transporter*, OST) α i β , preko kojih žučne kiseline napuštaju enterocit i ulaze u portalnu cirkulaciju.

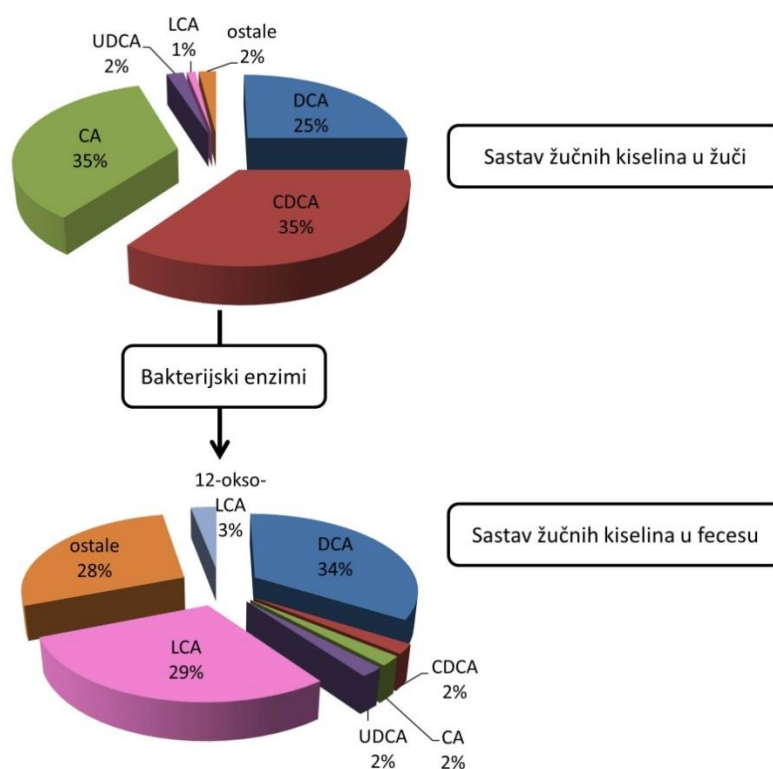
Iz portalne cirkulacije žučne kiseline ponovo dospevaju u jetru i to konjugovane žučne kiseline posredstvom bazolateralnog natrijum/tauroholat kotransportnog polipeptida (eng. *Sodium/Taurocholate Cotransporting Polypeptide*, NTCP; SLC10A1), dok se nekonjugovane preuzimaju putem OATP transportera koji se nalaze na sinusoidalnoj membrani hepatocita. U jetri se ponovo hidrosiliraju u primarne žučne kiseline. Dalje, iz hepatocita, posredstvom BSEP transportera, žučne kiseline se ponovo izlučuju u žučne kanaliće i na taj način započinje novi ciklus enterohepatičke recirkulacije (**Slika 13**) (Klaassen & Aleksunes, 2010; Hofmann, 2011; Stanimirov et al., 2015).



Slika 13. Proces enterohepatičke recirkulacije žučnih kiselina i transportni proteini uključeni u ovaj proces

Manji deo žučnih kiselina se nakon dekonjugacije u kolonu izlučuje iz tela putem fecesa. Dnevno se ovim putem izluči manje od 0,5 g žučnih kiselina (Sievänen, 2007).

S obzirom da crevna mikroflora može transformisati žučne kiseline u veliki broj različitih derivata, normalni ljudski feces sadržati znatno veći broj različitih žučnih kiselina koje potiču od primarnih žučnih kiselina, holne i henodeoksiholne kiseline. Poređenje sastava žučnih kiselina u žučnoj kesi u fecesu kod zdravih osoba, ilustruje obim metaboličke aktivnosti mikroflore u debelom crevu (**Slika 14**) (Ridlon et al., 2006). Kako se biotransformacija žučnih kiselina odvija isključivo dejstvom crevne mikroflore, u različitim poremećajima metabolizma, u kojima postoji poremećaj sastava crevne mikroflore, postoji i izmenjen sastav žučnih kiselina u lumenu creva Interreagujući sa žučnim kiselinama u lumenu creva i modifikujući njihov metabolizam, intestinalne bakterije mogu da izmene i farmakokinetiku brojnih farmakološki aktivnih supstanci (Pavlović et al., 2012; Stojančević et al., 2013a).

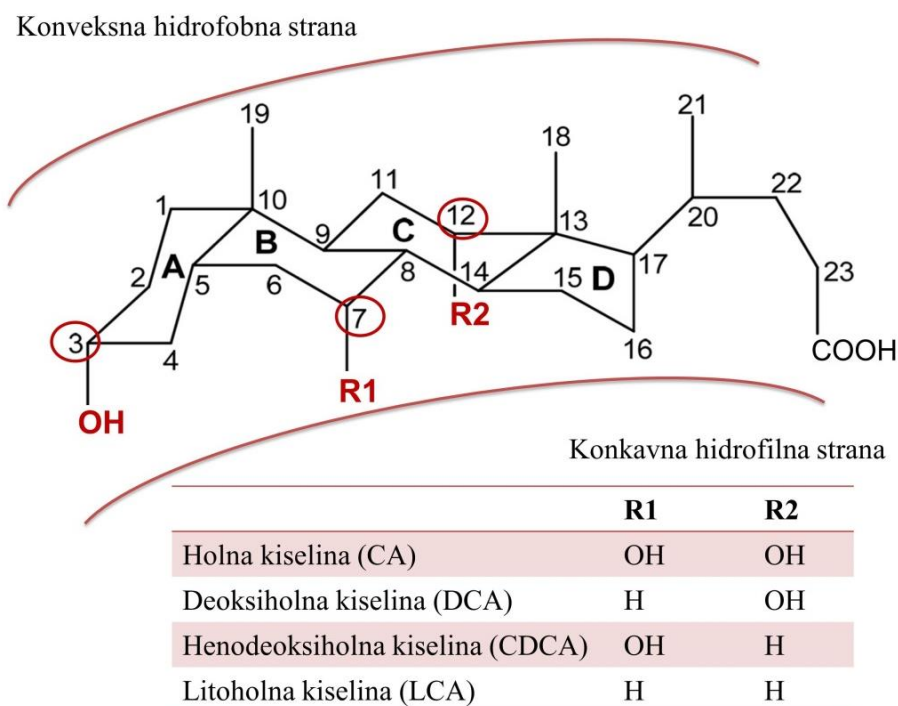


Slika 14. Sastav žučnih kiselina u žuči i fecesu prema kod zdravih osoba, prema referenci Ridlon et al., 2006

CDCA - henodeoksiholna kiselina; DCA - deoksiholna kiselina; LCA - litholna kiselina; UDCA - ursodeoksiholna kiselina. Ostale žučne kiseline se odnose na okso- i 3β -hidroksi derivate sekundarnih žučnih kiselina

1.3.2. Hemijska struktura žučnih kiselina

U hemijskom pogledu, sve žučne kiseline se sastoje iz dva dela: rigidnog steroidnog skeleta i kratkog alifatičnog bočnog lanca. Steroidni skelet predstavlja ciklopentanoperhidrofenantrensku strukturu sastavljenu iz tri šestočlana (A, B i C) i jednog petočlanog prstena (D). Veza A/B prstenova u *cis* položaju ukazuje na 5 β seriju, dok *trans* položaj karakteriše 5 α seriju. Alifatični bočni lanac zakačen je na prsten D i završava se karboksilnom grupom (**Slika 15**) (Mikov & Fawcett, 2006; Kuhajda et al., 2007; Monte et al., 2009).



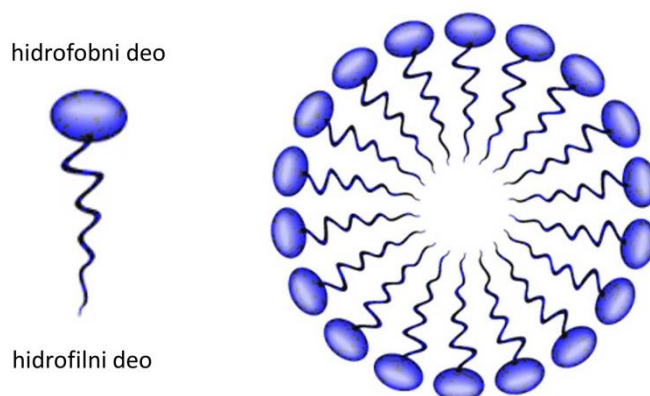
Slika 15. Hemijske strukture primarnih (CA i DCA) i sekundarnih žučnih kiselina (CDCA i LCA)

Na steroidnom skeletu se razlikuje konkavna (α) i konveksna (β) strana tj. površina. Žučne kiseline imaju jednu, dve ili tri hidroksilne grupe u položajima 3, 7 i 12. Kako su hidroksilne grupe uglavnom orijentisane ka konkavnoj (α) strani, ona je hidrofilna tj. predstavlja polarni deo molekula, dok β strana, na kojoj su postavljene metil grupe, ima hidrofobne karakteristike (Mikov & Fawcett, 2006; Kuhajda et al., 2007; Monte et al., 2009). Na **Slici 15** su predstavljene hemijske strukture primarnih (CA i DCA) i sekundarnih (CDCA i LCA) žučnih kiselina.

Balans između hidrofobnog i hidrofilnog dela razlikuje se među različitim predstavnicima žučnih kiselina što objašnjava razlike u interakcijama žučnih kiselina sa drugim supstancama kao što je npr. solubilizacija fosfolipida, holesterola i drugih lipida (Monte et al., 2009).

1.3.2.1. Micele žučnih kiselina

Amfifilnost žučnih kiselina koja potiče od razdvojenosti hidrofilnih i hidrofobnih grupa na steroidnom skeletu čini osnovu za građenje micelarnih agregata u vodenim rastvorima. Kada se nalaze u odgovarajućoj koncentraciji, žučne kiseline imaju sposobnost samoasocijacije i formiranja micela. Ova koncentracija se naziva kritična micelarna koncentracija (KMK) i karakteristika je svake pojedinačne žučne kiseline. Postoje jednostavne micelle (primarne), koje se sastoje od 2 do 8 monomera, povezanih hidrofobnim interakcijama nepolarnih β -strana steroidnih prstenova. Primarne micelle mogu dalje da agregiraju u sekundarne micelle povezivanjem hidroksilnih grupa vodoničnim vezama (**Slika 16**) (Kuhajda et al., 2007; Carey & Small, 1972; Roda et al., 1983).



Slika 16. Šematski prikaz micela žučnih kiselina

Formiranje primarnih i sekundarnih agregata žučnih soli zavisi i od pH vrednosti rastvora, temperature, prisustva katjona, vodoničnih veza, kao i same strukture molekula (Simonović & Momirović, 1997).

Vrednosti KMK dihidroksi žučnih kiselina su uglavnom ispod 5 mM, dok je za trihidroksi derivate ova vrednost nešto viša i iznosi od 10 do 15 mM. Smatra se da vrednost KMK raste sa porastom broja OH grupa, s obzirom dolazi do smanjivanja hidrofobne dodirne površine molekula (Roda et al., 1983).

Poznavanje KMK žučnih kiselina je važno za predikciju njihovih farmakološko-toksikoloških osobina. Naime, KMK je indikator membrano-toksične osobine žučnih kiselina. Iznad svoje KMK, žučne kiseline mogu da stupe u interakcije sa ćelijskom membranom što dovodi do narušavanja njenog integriteta (Posa, 2011).

U farmakološkim studijama su od sve većeg interesa keto derivati žučnih kiselina (Yang et al., 2009b; Yang et al., 2011b; Kuhajda et al., 2009; Golocorbin-Kon et al., 2009; Djanic et al., 2016b), s obzirom na to da uvođenje keto grupe dovodi do povećanja KMK i time do smanjenja membrano-toksičnog efekta. Povećanje vrednosti KMK sa povećanjem keto grupa u molekulu ispitivanih žučnih kiselina može biti objašnjeno ometanjem formiranja micela odnosno redukovanom asocijacijom. Prisustvo keto grupa redukuje hidrofobnu površinu, što vodi ka povećanju vrednosti KMK (Posa et al., 2007b).

1.3.3. Uloga žučnih kiselina u organizmu

Najpoznatija uloga žučnih kiselina je u apsorpciji masti i liposolubilnih vitamina zahvaljujući svojim deterdžentskim svojstvima. Pored toga, žučne kiseline obavljaju i mnoge druge važne fiziološke funkcije, kao što su modulacija sekrecije enzima pankreasa i uticaj na oslobađanje holecistokinina. Žučne kiseline imaju i antimikrobnu aktivnost i sprečavaju prekomeran razvoj bakterija u tankom crevu. Danas je poznato da žučne kiseline deluju i kao signalni molekuli koji kroz aktivaciju nuklearnih receptora (FXR) i membranskog TGR5 receptora, ne samo da regulišu svoju sopstvenu sintezu, već vrše i modulaciju metaboličkih puteva u koje su uključeni lipoproteini, glukoza, lekovi (Stojančević et al., 2012; Stanimirov et al., 2012; Stepanov et al., 2013; Stanimirov et al., 2015). Poznato je da aktivacijom FXR-a, žučne kiseline poboljšavaju insulinsku senzitivnost i hiperlipidemiju kod dijabetičnih miševa (Stanimirov et al., 2012).

Pored toga, zna se da žučne kiseline olakšavaju transport molekula kroz biomembrane i da poboljšavaju farmakokinetičke osobine lekova čija je apsorpcija nepotpuna i koji imaju malu biološku raspoloživost nakon oralne primene. Kao supstance koje poboljšavaju farmakokinetičke i farmakodinamske osobine lekova, a pri tom i same ispoljavaju farmakološke efekte, već su prisutne u pojedinim farmaceutskim preparatima i sasvim je izvesna budućnost njihove terapijske primene (Stojančević et al., 2013b).

1.3.4. Uticaj žučnih kiselina na modifikaciju transporta lekova kroz biološke membrane

Poslednjih godina postoji povećano interesovanje za ispitivanje uticaja žučnih kiselina na prodor lekova kroz biološke barijere. Žučne kiseline su zahvaljujući svojoj amfifilnoj prirodi, emulgujućim sposobnostima, kao i prirodnom poreklu dobri kandidati za promociju prodora različitih lekova kroz biološke membrane što je potvrđeno brojnim studijama (Yang et al., 2011a; Yang et al., 2011b; Lalić-Popović et al., 2013; Mikov et al., 2004; Al-Salami et al., 2008; Golocorbin-Kon et al., 2009).

Dosadašnja ispitivanja su pokazala da žučne kiseline potpomažu intestinalnu resorpciju, resorpciju preko kože, sluzokože obraza, oka i nosa, rektalnu i plućnu resorpciju, kao i prolazak kroz krvno moždanu barijeru. Uočeno je da žučne kiseline povećavaju transport hidrofilnih lekova paracelularnim putem, a hidrofobnih i paracelularnim i transcelularnim putem (Stojančević et al., 2013b; Mikov et al., 2004). Smatra se da se pri niskim, submicelarnim koncentracijama, molekuli žučnih kiselina umeću između fosfolipidnih slojeva u sastavu ćelijskih membrana, menjajući im na taj način propustljivost. Pri višim koncentracijama formiraju se mešovite micelle žučnih kiselina i komponenti ćelijske membrane, što narušava integritet membrane. Oštećenje ćelijskih membrana i proširenje *zonula occludens* između ćelija olakšava penetraciju lekova paracelularnim putem. Transcelularnu resorpciju, žučne kiseline mogu da poboljšaju povećanjem rastvorljivosti lekova i njihovog stepena disolucije ali i uticajem na transportne proteine (Meaney & O'Driscoll, 2000; Sharma et al., 2005, Stojančević et al. 2013b).

Pokazano je da neke žučne kiseline inhibišu aktivnost P-gp i na taj način smanjuju aktivni efluks supstrata ovog transportera. *In vitro* ispitivanjima je pokazano da CA, DCA i tauroholna kiselina (TCA) nemaju efekta na funkciju P-gp, dok monoketoholna (MKC), tauroolitholna (TLCA), taurohenodeoksiholna (TCDCA), glikohenodeoksiholna (GCDCA) i ursodeoksiholna kiselina (UDCA) dovode do inhibicije transporta lekova posredovanog P-gp (Mazzanti et al., 1994). Proučavajući efekat žučnih kiselina na transcelularni transport rodamina 123 kroz krvno moždanu barijeru, Yang i saradnici (Yang et al., 2011a) su potvrdili da 12-MKC deluje kao inhibitor P-gp. Ovo nije jedini transportni protein na koji žučne kiseline mogu da ispolje svoje efekte. Al-Salami i saradnici (2008) su u *in vitro* ispitivanjima utvrdili da 12-MKC deluje kao inhibitor efluksnog MRP3 (ABCC3) transportera i prenosa gliklazida u smeru od mukoze ka serozi. Uticaj submicelarnih koncentracija žučnih kiselina na smanjenje transcelularne permeacije metotreksata ostvaruje se kombinovanim efektima na

protein rezistencije na lekove otkrivenog u ćelijama raka dojke (eng. *Breast Cancer Resistance Protein*, BCRP; ABCG2), MRP2 i MRP3 transportne proteine (Chen et al., 2012).

Pokazano je da su hidrofobnije žučne kiseline jači promotori transporta kroz biološke membrane (Stojančević et al., 2013b). Od posebnog interesa u ispitivanju promocije transporta su keto derivati žučnih kiselina, a među njima se ističu keto derivati CA, 7-MKC i 12-MKC, kod kojih je hidroksilna grupa zamenjena keto grupom na poziciji 7, odnosno 12 (Yang et al., 2009). Iako su neke studije pokazale slabiji promotorni efekat keto derivata u odnosu na CA, prednost primene ovih jedinjenja leži u tome što poseduju daleko nižu toksičnost (Posa et al., 2007a).

S obzirom na to da bakterijske ćelije takođe poseduju specifične membrane i brojne membranske transportere, kao i zbog činjenice da se žučne kiseline u fiziološkim uslovima nalaze u intestinalnom traktu, postoji mogućnost uticaja žučnih kiselina na prodor lekova u probiotske bakterije na nivou intestinalnog trakta, o čemu do sada nisu vršena ispitivanja.

1.4. Bioraspoloživost lekova i biofarmaceutski sistem klasifikacije lekova

U osnovi ispitivanja koja proizvođač sprovodi tokom razvoja nove farmaceutske formulacije, u cilju dokazivanja efikasnosti i bezbednosti, nalazi se ispitivanje biološke raspoloživosti preparata (Petronijević et al., 2006). Bioraspoloživost predstavlja jedan od najznačajnijih farmakokinetičkih parametara leka i odnosi se na udeo primenjene doze koji u neizmenjenom obliku dospeva u sistemsku cirkulaciju i postaje raspoloživ na mestu delovanja leka. Kako je krajnji terapijski efekat primenjenog leka, najčešće, funkcija njegove koncentracije u sistemske cirkulaciji, raspoloživost leka iz farmaceutskog oblika je kritičan faktor koji određuje njegovu kliničku efikasnost. Razni faktori utiču na bioraspoloživost leka i obuhvataju fizičko-hemijske karakteristike lekovite supstance, faktore formulacije, kao i fiziološke faktore na nivou gastrointestinalnog trakta. Mala bioraspoloživost leka može biti posledica hemijske ili metaboličke degradacije leka pre apsorpcije, slabe apsorpcije iz gastrointestinalnog trakta usled loše rastvorljivosti ili nedovoljne lipofilnosti, kao i metabolisanja leka tokom prve faze (Shargel & Yu, 2015).

Tradicionalni pristup ispitivanju bioraspoloživosti podrazumeva strogo kontrolisano, skupo i dugotrajno *in vivo* ispitivanje na ljudima. Razvojem BSK i procenom resorpcije lekovitih supstanci na osnovu njihove rastvorljivosti, permeabilnosti kroz membrane i brzine rastvaranja iz farmaceutskog preparata, proširene su mogućnosti za sagledavanje *in vivo* ponašanja lekova i postavljena osnova za savremeni pristup ispitivanju bioraspoloživosti (Petronijević et al., 2006). BSK definiše rastvorljivost i/ili permeabilnost kao ograničavajuće faktore koji utiču na resorpciju i bioraspoloživost. U okviru pomenutog sistema klasifikacije, formirane su četiri grupe lekova (**Tabela 1**) (Kansara et al., 2015).

Tabela 1. Biofarmaceutski sistem klasifikacije lekova

BSK klasa	Rastvorljivost	Permeabilnost
I	Visoka	Visoka
II	Niska	Visoka
III	Visoka	Niska
IV	Niska	Niska

Rastvorljivost supstanci u vodi je jedna od ključnih stavki u razvoju novih hemijskih entiteta kao uspešnih lekovitih supstanci. Neophodno je da supstanca bude dovoljno rastvorljiva u vodi da dostigne željene koncentracije u sistemske cirkulaciji i ispolji

očekivani farmakološki odgovor (Kumar & Singh, 2013; Kansara et al., 2015). Potrebno je istaći da se predložena klasifikacija zasniva, ne na fizičko-hemijskoj rastvorljivosti lekovite supstance, koja predstavlja maksimalnu količinu supstance koja se može rastvoriti u određenoj zapremini rastvarača, već na tzv. farmakološkoj (fiziološkoj, gastrointestinalnoj) rastvorljivosti koja zavisi od terapijske doze aplikovanog leka (Emami, 2006).

Permeabilnost, pored rastvorljivosti i brzine rastvaranja lekovite supstance iz farmaceutskog preparata, ima ključnu ulogu u procesu apsorpcije lekovite supstance. Transcelularna permeabilnost (P_m) lipofilnih supstanci zavisi od odnosa njene rastvorljivosti u lipidnom sloju intestinalnih membrana i rastvorljivosti u vodenom medijumu. Ona je definisana sledećom jednačinom,

$$P_m = \frac{K_p D_m}{L_m}$$

gde P_m predstavlja koeficijent permeabilnosti, K_p particioni koeficijent supstance u sistemu oktanol-voda, D_m membranski difuzitet i L_m debljinu membrane. Iz navedene jednačine vidi se da će permeabilnost kroz neku membranu za određenu supstancu zavisiti od fluidnosti te membrane i particionog koeficijenta supstance. Lekovita supstanca se smatra visoko permeabilnom ukoliko je ispitivanjem kod ljudi utvrđeno da poseduje stepen resorpcije veći od 90%. Pored visokog stepena resorpcije supstanca mora pokazivati i stabilnost u intestinumu i mora biti poznat mehanizam transporta supstance kroz ćelijske membrane.

Prema pravilu Lipinskog, da bi ispitivana supstanca ispoljila odgovarajuću apsorpciju i permeabilnost, mora da zadovolji najmanje tri od sledeća četiri kriterijuma: da ne sadrži više od 5 donora vodoničnih veza (*hydrogen bond donor*, HBD) (izražava se kao suma OH- i NH-grupa), da nema više od 10 akceptora vodoničnih veza (*hydrogen bond acceptor*, HBA) (izražava se kao suma N i O), da ima molekulsku masu ispod 500 Da i da je logaritamska vrednost particionog koeficijenta (logP) manja od 5 (Lipinski et al., 2012).

Najinteresantnija je druga grupa lekova prema BSK, jer se u nju svrstava najveći broj lekovitih supstanci. Tu spadaju supstance koje odlikuje niska i spora rastvorljivost, ali visoka permeabilnost. Veliki broj farmakološki aktivnih supstanci koje su već u upotrebi, kao i onih čija se potencijalna primena u farmakoterapiji tek istražuje, ima ograničenu rastvorljivost u vodi, odnosno u biološkim tečnostima. Kod pomenute grupe u koju spada i simvastatin, brzina rastvaranja lekovite supstance predstavlja ograničavajući faktor za resorpciju i biološku

raspoloživost što može biti razlog većih interindividualnih razlika. Različite pristupi se primenjuju kako bi se kompenzovala slaba rastvorljivost supstanci, kao što su formulacije amorfnih čvrstih formi, nano čestice, mikro-emulzije, čvrste disperzije, formiranje soli kao i formiranje kompleksa rastvorljivih u vodi. Trenutno samo 8% novih kandidata lekova ispunjava kriterijume permeabilnosti i rastvorljivosti (Kumar & Singh, 2013; Kansara et al., 2015).

1.5. Distribicioni koeficijent i penetracija lekova kroz biološke membrane

Još davne 1872. godine, Berthelot i Jungfleisch su definisali particioni koeficijent kao ravnotežnu raspodelu supstance između dva nemešljiva rastvarača pri konstantnoj temperaturi (Berthelot & Jungfleisch, 1872).

Particioni koeficijent (eng. *intrinsic lipophilicity*, koeficijent raspodele, P) je fizičko-hemijska karakteristika jedinjenja koja predstavlja važan parametar za razumevanje njenog biološkog ponašanja u organizmu. Veoma je značajan u farmaceutskoj industriji s obzirom da predstavlja kvantitativnu meru afiniteta leka za biološke membrane (Acree et al., 2012; Shawahna & Rahman, 2011).

Particioni koeficijent je parametar koji karakteriše afinitet jedinjenja u nejonizovanom obliku (neutralni oblik molekula) prema lipidnoj odnosno vodenoj fazi u sistemu organskog rastvarača i vode. Naročito pogodan organski rastvarač za modelovanje procesa raspodele kroz biološke membrane je n-oktanol. Naime, kao i biološke membrane molekul oktanela sadrži i nepolarne i polarne delove tj. u svojoj strukturi ima dugi alkilni lanac koji se sastoji od osam hidrofobnih ugljenikovih atoma i jednu hidrofilnu primarnu alkoholnu grupu zahvaljujući kojoj može da se ponaša i kao donor i kao akceptor protona u vodoničnoj vezi (Bhat et al., 2002).

S obzirom na to da je opseg vrednosti particionog koeficijenta veoma velik najčešće se izražava kao logaritam količnika koncentracija rastvorka u dve tečne faze, koje se ne mešaju i može se predstaviti sledećom formulom:

$$\log P = \log \frac{[\text{nejonizovani oblik}]_{\text{oktanol}}}{[\text{nejonizovani oblik}]_{\text{voda}}}$$

gde su:

$[\text{nejonizovani oblik}]_{\text{oktanol}}$ - koncentracija nejonizovanog oblika leka u oktanolu

$[\text{nejonizovani oblik}]_{\text{voda}}$ - koncentracija nejonizovanog oblika leka u vodenoj fazi

Particioni koeficijent tačno opisuje samo particiju neutralnih molekula. Kako su lekovite supstance većinom slabi elektroliti koji delimično jonizuju prilikom rastvaranja u vodenom medijumu, njihov stepen jonizacije i rastvorljivost obično znatno variraju u zavisnosti od pH sredine. Kod ovih lekova raspodela između dva rastvarača zavisi od pKa (konstanta lekovite supstance) i pH (faktor sredine), a opisana je veličinom koja se naziva distribicioni koeficijent (Berthod & Carda-Broch, 2004; Shawahna & Rahman, 2011; Mälkiä

et al., 2004). Distribucionni koeficijent (D) predstavlja odnos ukupne količine leka u lipidnoj i vodenoj fazi, bez obzira na oblik u kom se nalazi, umnoženog fiksnim odnosom zapremina faza. Distribucionni koeficijent leka može se predstaviti u logaritamskom obliku (logD) sledećom jednačinom:

$$\log D = \log \frac{[\text{nejonizovani oblik}]_{\text{oktanol}} + [\text{jonizovani oblik}]_{\text{oktanol}}}{[\text{nejonizovani oblik}]_{\text{voda}} + [\text{jonizovani oblik}]_{\text{voda}}}$$

gde su:

$[\text{nejonizovani oblik}]_{\text{oktanol}}$ - koncentracija nejonizovanog oblika leka u oktanolu

$[\text{nejonizovani oblik}]_{\text{voda}}$ - koncentracija nejonizovanog oblika leka u vodi

$[\text{jonizovani oblik}]_{\text{oktanol}}$ - koncentracija jonizovanog oblika leka u 1-oktanolu

$[\text{jonizovani oblik}]_{\text{voda}}$ - koncentracija jonizovanog oblika leka u vodi

LogD, kao mera lipofilnosti, trenutno se mnogo koristi u modelima kvantitativnog odnosa strukture i aktivnosti (eng. *Quantitative Structure-Activity Relationship*, QSAR) za predviđanje farmakoloških osobina molekula. Ovi modeli definišu relaciju između fizičko-hemijskih svojstava supstanci sa njihovom biološkom aktivnošću (Hughes et al., 2008). Pokazano je da lekovite supstance sa vrednošću logD u opsegu od 0 do 3 imaju optimalan balans između rastvorljivosti i permeabilnosti koji je neophodan da bi se supstanca dobro apsorbavala i imala dobru bioraspodeljivost. Visoko lipofilna jedinjenja ($\log D > 5$) imaju nisku rastvorljivost, slabu oralnu apsorpciju koja je ograničena raspodelom između ćelijske membrane i vodene sredine, visok stepen vezivanja za proteine plazme i izražen metabolizam u jetri. S druge strane, supstance koje imaju logD manji od nule su veoma hidrofilna jedinjenja što ograničava njihov transport kroz enterocite i kod njih je više izražen renalni klirens (Di & Kerns, 2003; Li et al., 2005).

Utvrđivanjem distribucionog koeficijenta dobijaju se *in vitro* podaci koji ukazuju na ponašanje leka u organizmu što značajno doprinosi proceni i predviđanju svojstava i ponašanja molekula, kao i smanjenju potreba za *in vivo* eksperimentima na životinjama u farmaceutskim istraživanjima.

1.5.1. Metode određivanje lipofilnosti

Klasičan način eksperimentalnog određivanja particionog koeficijenta, koji je sve do danas ostao standard u istraživanjima, je metod mućkanja (eng. *shake-flask*). On se izvodi tako što se ispitivana supstanca mućka u sistemu dva rastvarača koji se međusobno ne mešaju.

Nakon uspostavljanja ravnoteže, kada se faze razdvoje, meri se koncentracija ispitivane supstance u svakoj od faza nekom od instrumentalnih metoda.

Ipak, nedostaci koje metoda pokazuje su brojni. Kao glavni nedostatak, ističe se dužina trajanja određivanja $\log P$. Osim toga, moguće je da se odrede samo $\log P$ čije se vrednosti kreću u uskom intervalu od -2.5 do 4.5. Kod suviše malih ili suviše velikih $\log P$ koncentracije jedinjenja u odgovarajućoj fazi ostaju ili blizu ili ispod limita detekcije mernog instrumenta.

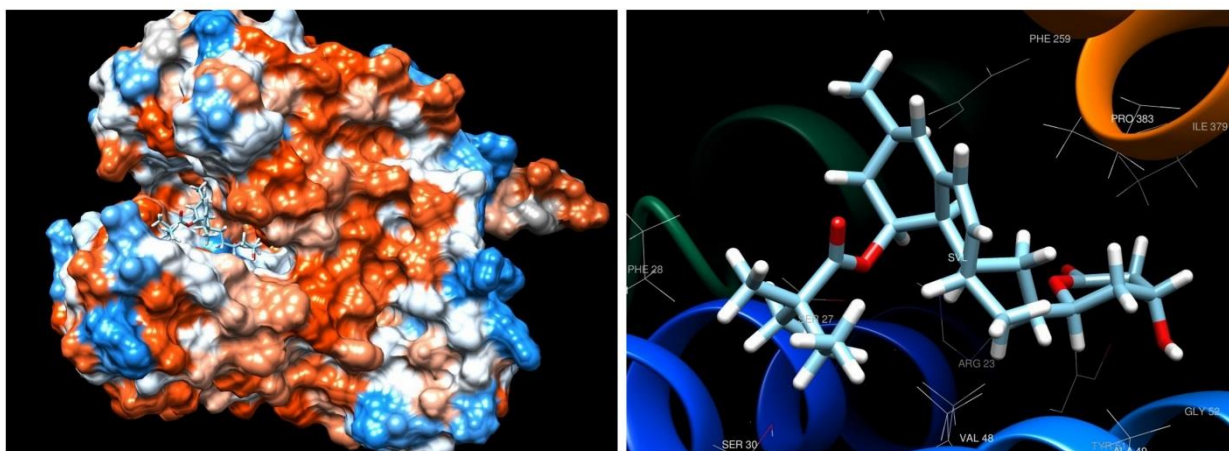
Pored direktnog određivanja metodom mućkanja, lipofilnost je moguće odrediti i indirektnim metodama. Za izrazito hidrofилne ili izrazito hidrofobne supstance $\log P$ se određuje dvofaznom potenciometrijskom titracijom. Preduslov za primenu potenciometrijske titracije je da supstanca jonizuje u vodenom rastvoru, što je slučaj kod većine lekova.

Hromatografske metode određivanja vrednosti particionog koeficijenta pogodne su bez obzira da li je reč o supstanci koja jonizuje ili ne jonizuje. Mogućnost primene hromatografskih metoda leži u činjenici da se separacijom analita između mobilne i stacionarne faze simuliraju dinamički procesi raspodele koji se odigravaju u organizmu - apsorpcija, distribucija i eliminacija. Ove metode omogućavaju brzo i lako određivanje lipofilnosti supstanci na osnovu retencionih parametara i uz relativno male količina uzorka (Berthod & Carda-Broch, 2004; Hartmann & Schmitt, 2004).

Pored eksperimentalnog određivanja, vrednosti $\log P$ i $\log D$ za neko jedinjenje mogu da se predvide *in silico* metodama. Računske metode zasnivaju se na pristupu fragmentacione, odnosno, atomske analize. Fragmentacione konstante, definišu doprinos pojedinih fragmenata u molekulu dok atomske metode, sa druge strane, definišu doprinos pojedinačnih atoma u molekulu. Postoje i metode zasnovane na odgovarajućim osobinama molekula (Property-Based Methods), gde se izračunavanje zasniva na empirijskim zavisnostima ili na osnovu 3D strukture molekula (Kellogg et al. 1992; Pearlman 1987; Leo 1993). Danas postoji veliki broj softverskih paketa za izračunavanje lipofilnosti na osnovu hemijske strukture.

1.6. Doking studije i njihova primena u proučavanju transporter-lek interakcija

U polju molekuskog modelovanja, doking (metoda uklapanja) predstavlja metod pomoću kog se kompjuterski simulira interakcija i predviđa preferirana orijentacija (eng. *binding mode*) jednog molekula u odnosu na drugi kad su vezani tako da formiraju stabilni kompleks (Lengauer & Rarey, 1996) (Slika 17). Pored predviđanja geometrije potencijalnog kompleksa, u okviru molekuskog dokinga postoji i funkcija koja predviđa afinitet liganda za protein, kao i jačinu veze koja utiče na stabilnost kompleksa.



Slika 17. Primer molekuskog uklapanja ispitivanog molekula u ciljnom proteinu (vizualizacija postignutog kompleksa pomoću programa UCSF Chimera)

Prilikom izvođenja doking studija primenjuju se algoritmi koji se zasnivaju na funkciji procene (eng. *scoring function*), kojom se procenjuje koliko je energetski povoljna određena orijentacija ispitivanog molekula pri interakciji sa ciljnim makromolekulom. Molekulski doking se može definisati kao problem optimizacije, kojom se dobija najbolja moguća orijentacija liganda vezanog za ciljni molekul definisane trodimenzionalne strukture, tj. ostvaruje najniža energija interakcije, a to znači i najstabilniji kompleks. Vezivanje liganda i ciljnog molekula se ostvaruje pomoću intermolekulskih sila, kao što su jonske veze, vodonične veze i Van der Valsove sile, dok je ireverzibilno kovalentno vezivanje veoma retko u biološkim sistemima (Taylor et al., 2002).

U zavisnosti od pristupa prilikom molekuskog uklapanja, postoji doking krutih struktura gde su strukture liganda i ciljnih makromolekula rigidne strukture i fleksibilni doking u kome ligand i/ili vezivno mesto mogu da poseduju izvesnu konformacionu fleksibilnost (Sousa et al., 2006).

Stepen u kom će rezultati dokinga simulirati interakciju u biološkom sistemu zavisi od mnogo faktora kao što su kvalitet trodimenzionalne strukture ciljnog makromolekula, konformacione slobode prilikom dokinga, simulacije efekata rastvarača i okruženja, funkcije procene i drugi faktori vezani za samu metodologiju dokinga (Guvench & MacKerell, 2009).

Doking ima važnu ulogu u racionalnom dizajnu lekova, jer se često koristi za predviđanje orijentacije vezivanja malih molekula, odnosno kandidata lekova, u njihovim ciljnim proteinima kako bi se predvideo afinitet i aktivnost molekula (Kitchen et al., 2004).

Prepoznavanje uticaja membranskih transportnih proteina na farmakokinetiku i terapijsku efikasnost lekova ukazalo je na neophodnost razmatranja transporta lekova već u ranim fazama razvoja lekova (Erić & Kalinić, 2015). Stoga, regulatorne agencije u Evropi i Americi zahtevaju karakterizaciju interakcije novih lekova sa nizom membranskih transportera, kao i ispitivanje uticaja afiniteta lekova za transportere na eventualne interakcije među lekovima (Maeda & Sugiyama, 2013).

Metode molekulskog dokinga našle su posebno mesto u proučavanju interakcija transportnih proteina i njihovih supstrata. Iako je do sada sekvencioniran veliki broj proteina, trodimenzionalne strukture visoke rezolucije dobijene na osnovu difrakcije X-zraka kao i NMR analizom, dostupne su za mali broj membranskih proteina, što je posledica brojnih problema koji se javljaju u procesu njihovog izolovanja, prečišćavanja, solubilizacije i kristalizacije. Zato se za predikciju 3D struktura ovih proteina primenjuje homologno ili *ab initio* modeliranje (Roy et al., 2010). Homologno modeliranje je vrsta komparativnog modeliranja proteina koje koristi prethodno rešene strukture kao polazne tačke (Xiang Z, 2006). Za razliku od njega, princip *ab initio*, ili *de novo* metode modeliranja proteina teže izgradnji trodimenzionalnog modela proteina „od nule“, odnosno više su bazirani na fizičkim principima nego na prethodno rešenim strukturama (Hardin et al., 2002).

S obzirom na brojne dokaze o uticaju P-gp proteina na farmakokinetiku raznih lekova, ovaj transportni protein je predmet mnogih istraživanja. Erić i Kalinić (2015) dali su pregled istraživanja u oblasti razvoja računarskih modela za predviđanje transporta P-gp-om u poslednjih deset godina sa posebnim osvrtom na metode molekulskog uklapanja. Dolgih i saradnici (2011) izvršili su doking 126 jedinjenja u strukturu mišjeg P-gp i poredili rezultate dobijene pristupom u kome je molekul posmatran kao rigidan sa pristupom u kom su bočni lanci aminokiselina vezivnog mesta tretirani kao fleksibilni. Tom prilikom, autori su utvrdili da je fleksibilnost od krucijalnog značaja za uspeh predviđanja kao i da se ovom metodom dobija kvalitativno slaganje između stepena transporta jedinjenja i energije vezivanja

izračunate dokingom. Autori su takođe zaključili da su fizičko-hemijske osobine supstrata od većeg značaja za energiju vezivanja od interakcije sa specifičnim aminokiselinama. Zeino i saradnici (2014) poredili su rezultate dokinga 22 supstrata, 26 modulatora i 15 nesupstrata na modelu humanog P-gp pri čemu su pokazali da postoje statistički značajne razlike u njihovim međusobnim energijama vezivanja.

Ovim, i drugim studijama, ukazano je na mogućnost primene molekuskog dokinga u proučavanju interakcija transportnih proteina i njihovih supstrata. Literaturni podaci koji povezuju metodu molekuskog uklapanja i transportne proteine probiotskih bakterija sa lekovima i žučnim kiselinama nisu do sada poznati.

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

S obzirom na prethodno izneta saznanja, postavljeni su sledeći ciljevi:

- 1) Ispitivanje prodora i metabolizma simvastatina u probiotskim bakterijama (*Lactobacillus acidophilus* Rosell-52, *Lactobacillus rhamnosus* Rosell-11 i *Bifidobacterium longum* Rosell-175)
- 2) Ispitivanje uticaja žučnih kiselina (CA, 12-MKC i DCA) na prodor simvastatina u probiotske bakterije
- 3) Ispitivanje uticaja soli žučnih kiselina (CA, 12-MKC i DCA) na raspodelu simvastatina u sistemu oktanol/pufer
- 4) Ispitivanje interakcija žučnih kiselina (CA, 12-MKC i DCA) sa simvastatinom na nivou transportnih proteina probiotskih bakterija (*Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium longum*).

Hipoteze istraživanja su:

- 1) Simvastatin u značajnoj meri prodire i metaboliše se u probiotskim bakterijama
- 2) Ispitivane žučne kiseline povećavaju prodor simvastatina u probiotske bakterije
- 3) Ispitivane soli žučnih kiselina značajno menjaju raspodelu simvastatina u sistemu oktanol/pufer
- 4) Postoje značajne interakcije ispitivanih žučnih kiselina sa simvastatinom na nivou transportnih proteina probiotskih bakterija (*Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium longum*).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

Svi eksperimenti izvedeni su na Katedri za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu u periodu od januara 2014. godine do oktobra 2015. godine.

Prvi deo eksperimenta obuhvatao je *in vitro* ispitivanja ponašanja simvastatina pri inkubaciji sa probiotskim bakterijama, kao i uticaj žučnih kiselina na transport leka u probiotske bakterije. Izvršena je detekcija i karakterizacija metaboličkih produkata simvastatina. Drugi deo ogleda obuhvatao je *in vitro* ispitivanja uticaja soli žučnih kiselina na distributivne osobine simvastatina u sistemu oktanol-pufer. Treći deo eksperimenta odnosio se na doking analizu afiniteta žučnih kiselina prema transporterima ispitivanih probiotskih bakterija. Uz pomoć različitih kompjuterskih tehnika i softverskih paketa vršene su dodatne analize koje su služile za objašnjavanje dobijenih eksperimentalnih rezultata.

3.1. Ispitivanje prodora i metabolizma simvastatina u probiotskim bakterijama bez prisustva i u prisustvu žučnih kiselina

3.1.1. Supstance i reagensi

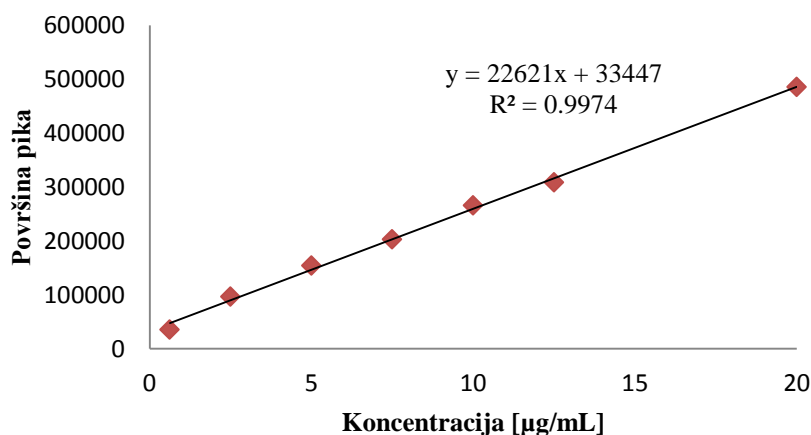
U eksperimentu su korišćeni komercijalni preparati probiotika (PROBIOTIC[®], Ivančić i Sinovi, d.o.o., Beograd, Srbija). U jednoj kapsuli nalazi se 5×10^9 živih liofilizovanih probiotskih bakterija: *Lactobacillus acidophilus* Rosell-52, *Lactobacillus rhamnosus* Rosell-11 i *Bifidobacterium longum* Rosell-175. Odabrane bakterijske vrste su najčešće korišćeni probiotski sojevi, ali i normalni stanovnici crevnog trakta. Vitalnost liofilizovanih probiotskih bakterija je sačuvana tako što se u preparatu nalaze u obliku mikrokapsula dobijenih specijalnim tehnološkim postupkom, koje ih čine otpornim na dejstvo želudačne kiseline. Kada dospeju u creva, gde je njihovo dejstvo i potrebno, bakterije postaju ponovo aktivne. S obzirom na to da je preparat termostabilan, čuvan je na sobnoj temperaturi za vreme trajanja eksperimenta.

Simvastatin je dobijen ljubaznošću kompanije Hemofarm AD, Srbija. U ogledima su korišćene sledeće žučne kiseline: holna kiselina (CA) i deoksiholna kiselina (DCA) (Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, USA), 3β -hidroksi-12-keto- 5β -holanska kiselina (12-monoketoholna kiselina, 12-MKC) koja je sintetisana na Katedri za Farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju, Medicinskog fakulteta u Novom Sadu prema metodi Miljković i saradnici (2000). Voda, acetonitril, etanol i mravlja kiselina su bili LC-MS čistoće (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA). Fosfatni pufer (eng. *phosphate-buffered saline*, PBS) (0,01M; pH 7,4) pripremljen je rastvaranjem 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,24 g KH_2PO_4 , i 1,44 g Na_2HPO_4 u 1 L redestilovane vode podešavanjem pH na 7,4 sa HCl.

3.1.2. Priprema radnih i standardnih rastvora

Za potrebe eksperimenta od probiotskih bakterija pravljen su suspenzije. Za svaku eksperimentalnu grupu, suspenzija probiotika izrađena je rastvaranjem jedne kapsule probiotika u epruveti sa šlifovanim rastvaračem gde je potom dodato 10 mL rastvora simvastatina u PBS puferu i mešano na vorteks aparatu 5 minuta. Na taj način je napravljena suspenzija probiotika koncentracije 5×10^8 /mL. Koncentracija probiotika korišćena u ogledu odgovara koncentraciji probiotika u intestinalnom traktu, uzimajući u obzir uobičajene doze preparata.

Osnovni rastvor simvastatina pravljen je odmeravanjem 50 mg simvastatina na analitičkoj vagi i rastvaranjem u 10 mL etanola, a čuvan je na 4 °C ne duže od 5 dana. Standardni rastvori za kreiranje kalibracione krive pripremani su razblaživanjem osnovnog rastvora sa smešom pufera i acetonitrila u odnosu 1:4 do konačnih koncentracija u opsegu od 0,625-20 µg/mL. Koeficijent korelacije za kalibracionu krivu dobijenu kao zavisnost površine pikova od koncentracije simvastatina iznosio je 0,9974. Jednačina kalibracione krive je $y = 22621x + 33447$ (**Grafikon 1**).



Grafikon 1. Grafikon zavisnosti površine pika od koncentracije simvastatina [µg/mL]

Radni rastvor simvastatina pripremljen je razblaživanjem osnovnog rastvora 100 puta sa PBS puferom (50 µg/mL).

Osnovni rastvori soli žučnih kiselina u koncentraciji 12,5 mM pravljeni su odmeravanjem i rastvaranjem odgovarajuće količine žučnih kiselina u vodi. Korišćenje natrijumovih soli žučnih kiselina dovelo je do hidrolitičke degradacije leka tokom vremena zbog čega su u ovom delu eksperimenta zamenjene sa žučnim kiselinama. Rastvori su filtrirani kroz membranske filtere veličine pora 0,20 µm (Minisart, Sartorius AG, Goettingen, Nemačka). Ogledi su vršeni sa ekvimolarnim koncentracijama žučnih kiselina (0,25 mM) koje su ispod njihovih KMK. Rastvori su pripremani najranije 24 časa pre eksperimenta i do eksperimenta su čuvani u frižideru na +4 °C. U eksperimentu su korišćeni rastvori zagrejani do sobne temperature.

3.1.3. Eksperimentalne grupe

U okviru ispitivanja prodora i metabolizma simvastatina u probiotskim bakterijama, formirane su sledeće eksperimentalne grupe:

1. **KonSV** - 10 mL radnog rastvora simvastatina (dobijen razblaživanjem osnovnog rastvora 100 puta sa PBS puferom)
2. **KonPro** - kontrolna grupa koja predstavlja suspenziju probiotskih bakterija u čistom PBS puferu u koncentraciji od 5×10^8 /mL (jedna kapsula u 10 mL PBS)
3. **ProSV** - suspenzija probiotika u rastvoru simvastatina dobijena rastvaranjem sadržaja jedne kapsule probiotika u 10 mL radnog rastvora simvastatina
4. **ProCA** - suspenzija probiotika u rastvoru simvastatina sa CA dobijena rastvaranjem sadržaja jedne kapsule probiotika u 10 mL radnog rastvora simvastatina uz dodatak 200 μ L osnovnog rastvora CA (finalna koncentracija CA - 0.25 mM)
5. **ProMKC** - suspenzija probiotika u rastvoru simvastatina sa 12-MKC dobijena rastvaranjem sadržaja jedne kapsule probiotika u 10 mL radnog rastvora simvastatina uz dodatak 200 μ L osnovnog rastvora 12-MKC (finalna koncentracija 12-MKC - 0.25 mM)
6. **ProDCA** - suspenzija probiotika u rastvoru simvastatina sa DCA dobijena rastvaranjem sadržaja jedne kapsule probiotika u 10 mL radnog rastvora simvastatina uz dodatak 200 μ L osnovnog rastvora DCA (finalna koncentracija DCA - 0.25 mM)
7. **CA** - radni rastvor simvastatina uz dodatak 200 μ L osnovnog rastvora CA (finalna koncentracija CA - 0.25 mM)
8. **MKC** - radni rastvor simvastatina uz dodatak 200 μ L osnovnog rastvora 12-MKC (finalna koncentracija 12-MKC - 0.25 mM)
9. **DCA** - radni rastvor simvastatina uz dodatak 200 μ L osnovnog rastvora DCA (finalna koncentracija DCA - 0.25 mM)

Analize su rađene u epruветama u ukupnoj zapremini od 10 mL. Kako su rastvori žučnih kiselina pripremani rastvaranjem u DMSO, u kontrolne uzorke je takođe dodat DMSO u količini od 200 μ L. Prethodno smo pokazali da u dodatoj količini DMSO nije uticao na prodor simvastatina u probiotske bakterije.

Šema pripreme uzorka predstavljena je u **Tabeli 2**.

Tabela 2. Šema pripreme uzoraka

Eksp. Grupa	Radni rastvor SV (10 mL)	Probiotici (1 cps)	CA (200 μ L)	12-MKC (200 μ L)	DCA (200 μ L)
KonSV	+				
KonPro		+			
ProSV	+	+			
ProCA	+	+	+		
ProMKC	+	+		+	
ProDCA	+	+			+
CA	+		+		
MKC	+			+	
DCA	+				+

3.1.4. Protokol i priprema uzoraka

Ispitivani uzorci inkubirani su pod anaerobnim uslovima tokom 24 časa u vodenom kupatilu pri konstantnoj temperaturi od 37 °C. Povremeno je vršeno mućkanje epruveta blagim pokretima s jedne na drugu stranu. Koncentracije simvastatina u ekstracelularnom, intracelularnom i ukupnom medijumu određene su u sedam vremenskih tačaka (u nultoj tački, nakon 15 minuta, sat, dva, četiri, šest i dvadeset četiri časa). Identifikacija metabolita u ekstracelularnom, intracelularnom i ukupnom sadržaju uzoraka vršena je u nultom minutu i nakon 4 sata inkubacije pri čemu je poredena kontrolna grupa, odnosno simvastatin u PBS puferu i grupa u kojoj je lek bio izložen probiotskim bakterijama (ProSV). Izvršena je i seminkvantitativna analiza metabolita simvastatina.

Za analizu ekstracelularnog sadržaja, nakon blagog mućkanja epruvete u cilju ravnomerne distribucije sadržaja, uzimani su alikvoti od 100 μ L koji su potom centrifugirani 5 min na 15000 obrtaja/min kako bi se istaložile bakterije. Potom je odpopetirano 50 μ L čistog supernatanta i dodato je 200 μ L acetonitrila (razblaženje 5 puta) kako bi se obezbedilo taloženje proteina. Zatim su uzorci centrifugirani 10 min na +4 °C i na 15000 obrtaja/min.

Istovremeno, za one grupe koje su u sastavu imale probiotske bakterije, uzeti uzorci su služili i za određivanje intracelularnog sadržaja simvastatina i metabolita, odnosno one frakcije koja je ušla u probiotske bakterije. Nakon prvog koraka, odnosno taloženja bakterija i uzimanja 50 μ L supernatanta za analizu ekstracelularnog sadržaja, odliven je i preostali

supernatant, a potom su istaložene bakterije ispirane 3 puta sa po 100 μL PBS pufera. Nakon toga, istaložene bakterije su resuspendovane u 100 μL vode i uzorci su izloženi ultrazvuku na ledu u tri intervala po 2 min i sa 3 min pauze između njih (Mehmeti et al., 2013) kako bi se izvršilo liziranje bakterija i omogućilo određivanje intracelularnog sadržaja simvastatina. Potom je odpipetirano 50 μL i dodat acetonitril u odnosu 1:4 kako bi se istaložili proteini. Uzorci su centrifugirani na 15000 obrtaja/min, 10 min u cilju taloženja ostataka ćelija. Dobijeni supernatant korišćen je za analizu intracelularnog sadržaja. Prilikom analize uzeto je u obzir razblaženje acetonitrilom 5 puta.

Analiza ukupnog sadržaja tj. zbira ekstracelularnog i intracelularnog sadržaja vršena je tako što je 100 μL uzorka (ravnomerno distribuiranog u epruveti pre uzrokovanja blagim mućkanjem) lizirano na ultrazvučnom kupatilu prema prethodno opisanom postupku. Dalji koraci pripreme uzoraka bili su isti kao u slučaju pripreme za određivanje intracelularnog sadržaja.

Nakon pripreme, u vijale je preneto po 100 μL supernatanta, odakle je pomoću autosemplera 10 μL injektovano direktno na LC-MS/MS sistem. Različite metode su korišćene za kvantitativnu i kvalitativnu analizu. Svi eksperimenti vršeni su u triplicatu, u uslovima zaštićenim od direktne svetlosti kako bi se izbegla fotodegradacija.

3.1.5. LC-MS/MS analiza

Identifikacija i kvantifikacija uzoraka vršena je metodom tečne hromatografije sa spregnutom masenom spektrometrijom (LC-MS/MS). U eksperimentu je korišćen maseni spektrometar *LCQ Fleet* (Thermo Fisher Scientific, Nemačka) sa elektrosprej jonizacionim (eng. *Electrospray Ionisation*, ESI) izvorom i masenim analizatorom na principu jonske zamke (eng. *ion trap*, IT). *LCQ Fleet* maseni spektrometar bio je povezan sa HPLC sistemom (Thermo Fisher Scientific, Nemačka). Uzorci su injektovani pomoću autosemplera *Fingan Surveyor autosempler plus*. Upravljanje HPLC-MS sistemom, integracija u hromatogramima i komunikacija sa masenim spektrometrom vršena je pomoću računara korišćenjem *Xcalibur LC/MS* softvera (ThermoFisher Scientific Corporation, v 2.0.7., 2007. godina).

Za analizu simvastatina izabrana je jonizacija u pozitivnom modu s obzirom na veoma mali, praktično zanemarljiv odziv u negativnom modu. Za optimizaciju uslova masenog spektrometra korišćen je rastvor simvastatina koncentracije 10 $\mu\text{g/mL}$. Pripremljeni rastvor je

injektovan direktno u jonski izvor pri čemu uređaj sam optimizuje uslove kao što su: temperatura kapilare, napon kapilare, temperatura izvora, podešavanja sočiva, pritisak azota.

Masena detekcija primenom jonske zamke sa gradijentnim režimom elucije i trajanjem jedne analize 60 minuta omogućila je pouzdanije rezultate identifikacije komponenti i potvrde njihove strukture, dok je za potrebe kvantifikacije korišćena masena detekcija primenom jonske zamke sa izokratskim metodom i sa vremenom analize od 15 min.

3.1.5.1. Kvantitativna analiza

Kvantitativna analiza, odnosno praćenje koncentracije simvastatina tokom vremena prilikom inkubacije sa probioticima i u prisustvu žučnih kiselina, izvršena je uz pomoć LC-MS prema ranije publikovanoj metodi (Gambhire et al., 2011) sa manjim modifikacijama:

Hromatografski parametri korišćeni za potrebe kvantitativne analize su bili sledeći:

- kolona Zorbax Eclipse Plus C18 dužine 15 cm, unutrašnjeg prečnika 2,1 mm, veličine čestica punjenja 5 μm (Agilent Technologies, USA),
- predkolona Zorbax extend C18 dužine 12,5 mm, unutrašnjeg prečnika 2,1 mm, veličine čestica punjenja 5 μm (Agilent Technologies, USA),
- mobilna faza: 0,1% mravlja kiselina u vodi (A) i acetonitril (B),
- izokratski režim elucije sa konstantnim protokom faze od 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ i odnosom faza 30% A i 70% B.
- temperatura kolone 20 $^{\circ}\text{C}$
- injekcioni volumen 10 μL
- trajanje jedne analize 15 min

Uslovi rada masenog spektrometra bili su sledeći: jonizacija analita u pozitivnom modu, temperatura zagrejjane kapilare 350 $^{\circ}\text{C}$, protok glavnog gasa-azota (eng. *sheat gas flow*) 32,00, protok pomoćnog gasa-helijuma (eng. *auxiliary gas flow*) 8,0 (u relativnim jedinicama), napon izvora (eng. *source voltage*) 5,5 kV, struja izvora (eng. *source current*) 100 μA , 1 mikrosken (eng. *micro-scan*) sa maksimalnim vremenom injektovanja jona od 100 ms.

MS analiza vršena je u pozitivnom jonskom modu u celom opsegu masa od m/z 90-600. Za kvantitativnu analizu odabran je jon adukta molekula sa natrijumom $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$.

3.1.5.2. Kvalitativna analiza

Kvalitativna analiza, odnosno identifikacija metabolita simvastatina u prisustvu probiotskih bakterija, urađena je prema prethodno publikovanoj i modifikovanoj LC-MS/MS metodi (Hirth, 2011). Hromatografska metoda za kvalitativnu analizu podrazumevala je gradijentno razdvajanje pojedinačnih komponenti koje predstavljaju strukturno slična jedinjenja simvastatinu.

Hromatografski parametri korišćeni za potrebe kvalitativne analize su bili sledeći:

- kolona Zorbax Eclipse Plus C18 dužine 15 cm, unutrašnjeg prečnika 2,1 mm, veličine čestica punjenja 5 μm (Agilent Technologies, USA),
- predkolona Zorbax extend C18 dužine 12,5 mm, unutrašnjeg prečnika 2,1 mm, veličine čestica punjenja 5 μm (Agilent Technologies, USA),
- mobilna faza: 0,1% mravlja kiselina u vodi (A) i acetonitril sa 0,1% mravlje kiseline (B) i gradijentni režim elucije sa konstantnim protokom faze od 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ i sledećim odnosom faza:
 - 0-40 min 42-90 % B;
 - 40-50 min 90% B;
 - 50-51.5 min 90-42% B;
 - 51.5-60 min 42% B
- temperatura kolone 20 $^{\circ}\text{C}$
- injekcioni volumen 10 μL
- trajanje jedne analize 60 min

Uslovi rada masenog spektrometra bili su sledeći: jonizacija analita u pozitivnom modu, temperatura zagrejjane kapilare 350 $^{\circ}\text{C}$, protok glavnog gasa-azota (eng. *sheat gas flow*) 32.00, protok pomoćnog gasa-helijuma (eng. *auxiliary gas flow*) 8.0 (u relativnim jedinicama), napon izvora (eng. *source voltage*) 5.5 kV, struja izvora (eng. *source current*) 100 μA , 1 mikrosken (eng. *micro-scan*) sa maksimalnim vremenom injektovanja jona od 100 ms.

Pre snimanja masenih spektara definisan je opseg skeniranja (*scan range*, m/z), od 300-900, s tim da su vršene i probe sa u opsegu m/z 150-600. MS analiza sastojala se od dva *scan event*-a. Prvi *scan event* prikupljao je podatke u *full*-sken pozitivnom jonskom modu u celom opsegu masa. U drugom *scan event*-u, maseni spektrometar je bio podešen da izvrši *full* skeniranje i potom MS/MS skeniranje 3 najintenzivnija jona iz *full*-sken spektra (eng. *data*

dependent scan) sa ciljem dobijanja informacija o strukturi detektovanih metabolita simvastatina. Ovaj način snimanja omogućava identifikaciju i karakterizaciju ne samo glavnih metabolita već i onih koji su prisutni u manjim koncentracijama što je od velikog značaja za analizu metaboličkog profila jedinjenja. Koliziorna energija bila je podešena na 30,0 (izraženo u relativnim jedinicama, %), izolaciona širina (eng. *isolation width*) 2 m/z, vrednost aktivacije (eng. *activation q value*) 0,250, stanje naelektrisanja (eng. *charge state*) 2 i vreme aktivacije (eng. *activation time*) 30 ms. Opcija dinamičko isključenje (eng. *dynamic exclusion*) bila je omogućena sa sledećim parametrima: broj ponavljanja (eng. *repeat count*) 2, vreme ponavljanja (eng. *repeat duration*) 15 s, veličina za isključivanje (eng. *exclusion list size*) 500 i trajanje isključivanja (eng. *exclusion duration*) 60 s.

3.1.5.3. Obrada podataka

Svi podaci bili su obrađeni pomoću *Qual/Quan Browser*-a koji je sastavni deo *Termofinnigan Xcalibur* softvera u kombinaciji sa softverom za dekonvoluciju masenih spektara, tj. ekstrakciju čistih masenih spektara iz preklopljenih pikova - AMDIS (*Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*) koji je razvio NIST (*National Institute of Standards and Technology*).

Za identifikaciju metabolita korišćeni su podaci o molekulskoj masi, karakteristični fragmenti u MSⁿ spektrima, prethodno objavljeni rezultati, rezultati MetaPrint2D analize (Carlsson et al., 2010) i dostupni literaturni podaci o enzimskoj aktivnosti korišćenih bakterijskih sojeva, pri čemu je od velike koristi bila naučna baza podataka o enzimima - BRENDA (*BRAunschweig ENzyme DAtabase*) dostupna online (<http://www.brenda-enzymes.org/>) (Schomburg et al., 2002).

Za svaki pik, najpre je ekstrahovan MS¹ spektar u pozitivnom modu snimanja i iz njega očitani dominantni joni. Molekulska masa jedinjenja određena je iz masenih spektara prvog reda u pozitivnom modu, putem asignacije bar dve jonske vrste - adukti molekula sa protonom ili sa jonima alkalnih metala. U nekim slučajevima, već na osnovu MS¹ spektra bilo je moguće doneti izvesne strukturne informacije usled delimične fragmentacije slabih veza u jonskom izvoru (eng. *in-source fragmentation*) olakšavajući preliminarnu identifikaciju jedinjenja. Za dobijanje detaljnijih informacija, urađeni su MSⁿ eksperimenti u *data dependent* skenu gde su 3 najintenzivnija jona selektovana za dalju fragmentaciju. Specifični i karakteristični fragmenti pružili su dodatne informacije o strukturi jedinjenja. U slučaju da je

intenzitet protonovanog jona bio suviše slab, MS/MS spektri su snimljeni za adukte sa natrijumom, mada ovi joni ne podležu lako fragmentaciji. Detekcija jona bila je značajno poboljšana dekonvolucijom.

Pošto u ovom delu eksperimenta cilj nije bila apsolutna kvantifikacija metabolita, već promena tokom vremena, i kako je za dato jedinjenje površina pika srazmerna koncentraciji, u cilju praćenja promene sadržaja datog jedinjenja tokom vremena koristila se vrednosti „area“ tj. površine ispod krive.

Poređenjem površina ispod krive u početnoj tački i nakon 4 časa inkubacije sa probioticima bilo je moguće pratiti promene količine pojedinačnih metabolita. Budući da su faktori proporcionalnosti (eng. *response factors*) različiti su za različita jedinjenja, poređenje površine pikova različitih jedinjenja je samo grubo merilo i nikako se ne može poistovećivati sa stvarnim masenim, zapreminskim ili količinskim odnosima.

3.1.6. MetaPrint2D analiza

Kao polazne informacije o potencijalnim metabolitima simvastatina, nastalim pod dejstvom enzimske aktivnosti probiotskih bakterija, poslužili su rezultati analize u programu MetaPrint2D koji se bavi predviđanjem potencijalnih lokacija u hemijskoj strukturi ispitivanog jedinjenja na kojima sa određenom verovatnoćom dolazi do metaboličkih promena (Carlsson et al., 2010). Pomoću ovog programa, koji je dostupan *online* (<http://www-metaprint2d.ch.cam.ac.uk/>) označeni su atomi u molekulu simvastatina koji su najpodložniji promenama, kao i reakcije koje se na njima mogu odigrati. Verovatnoća odigravanja reakcija na nekom atomu korelira sa vrednošću NOR-a (eng. *Normalised Occurrence Ratio*) odnosno što je NOR veći, veća je i verovatnoća da je određeni atom meta metaboličkih reakcija. Ono što je bitno pomenuti je da NOR ne ukazuje na to koliko je verovatno da će se ispitivano jedinjenje metabolisati već relativnu verovatnoću metabolisanja na određenoj lokaciji pod pretpostavkom da se molekul metaboliše.

3.1.7. Računarsko modelovanje: određivanje molekulskih deskriptora u proceni farmakokinetičkih osobina identifikovanih metabolita simvastatina

U cilju ispitivanja mogućnosti primene identifikovanih metabolita simvastatina kao lekovitih supstanci, kao i poređenja njihovih osobina sa simvastatinom, izvršene su tzv. *drug-*

likeness analize koje na osnovu postavljenih kriterijuma, odnosno izračunatih molekulskih deskriptora, utvrđuju da li je neka supstanca kandidat za dalja ispitivanja kao potencijalni lek.

Molekulski deskriptori predstavljaju numeričke vrednosti koje opisuju određenu osobinu molekula, a dobijaju se kao rezultat logičko-matematičke procedure polazeći od hemijske informacije kodirane u simboličkom predstavljanju molekula. Molekulski deskriptori, mogu poslužiti u svrhu interpretacije i boljeg razumevanja neke karakteristike molekula ili sa ciljem formiranja matematičkog modela kojim se neka osobina može predvideti za druge molekule.

Izračunavanje molekulskih deskriptora koji definišu pravilo Lipinskog, izvršeno je pomoću programa Molinspiration dostupnog *online* (www.molinspiration.com).

Pomoću softverskog paketa VolSurf+ (v.1.0.4, Molecular Discovery Ltd.) određeni su molekulski deskriptori koji opisuju rastvorljivost i farmakokinetičke osobine ispitivanih jedinjenja: polarna površina molekula (eng. *Polar Surface Area*, PSA) i hidrofobna površina molekula (eng. *Hydrophobic Surface Area*, HSA), odnos polarne površine molekula i ukupne površine molekula (PSAR), odnos polarne i hidrofobne površine molekula (PHSAR), logP, logD_{7.5}, intrinzička rastvorljivost (eng. *Solubility*, SOLY) koja predstavlja rastvorljivost nejonizovanog tj. neutralnog oblika molekula u mol/l na 25 °C, prodor kroz Caco-2 ćelije (CACO2), vezivanje za proteine (eng. *Protein Binding*, PB), volumen distribucije (eng. *Volume of Distribution*, VD), metabolička stabilnost (eng. *Metabolic Stability*, MetStab) (Cruciani et al. 2000). Prethodno je izvršeno crtanje i geometrijska optimizacija struktura ispitivanih jedinjenja semiempirijskom metodom Austin Model 1 (AM1).

3.2. Ispitivanje uticaja žučnih kiselina na distribicioni koeficijent simvastatina u sistemu oktanol/pufer

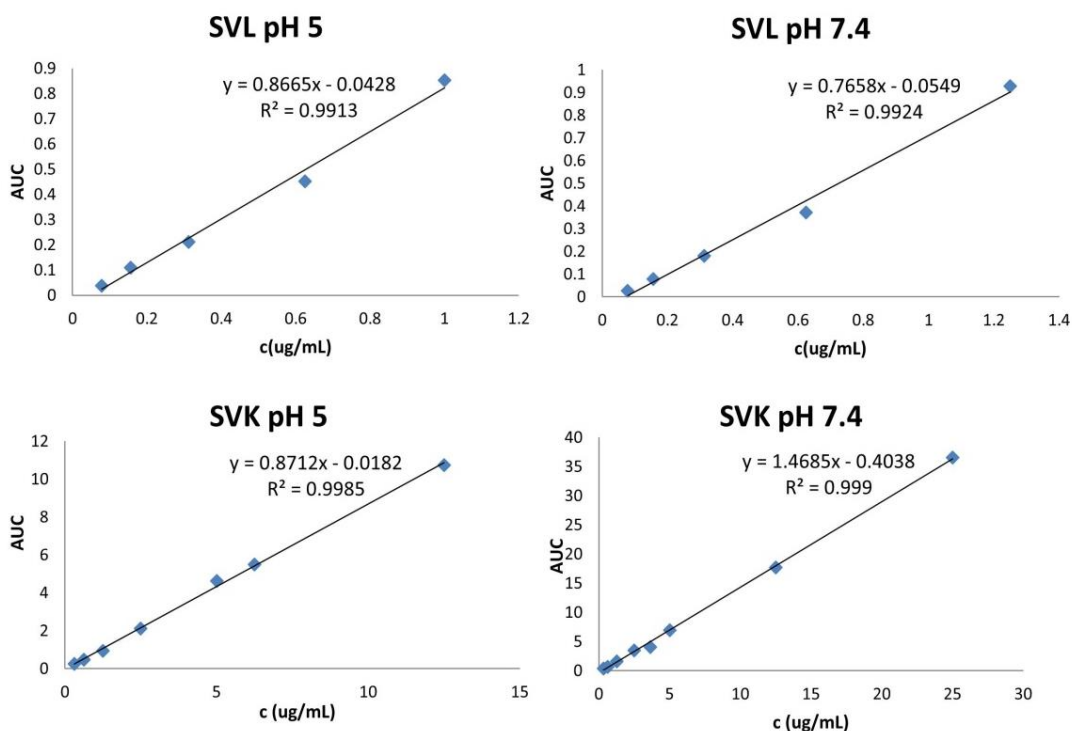
3.2.1. Supstance i reagensi

Simvastatin u obliku laktone (SVL) dobijen je od Hemofarma, Srbija. Simvastatinska kiselina (SVK) je dobijena hidrolizom SVL prema sledećem postupku (Yoshinari et al., 2007): 4 mg SVL rastvoreno je u 0,1 mL apsolutnog etanola (95%) i zatim je dodato 0,15 mL 0,1 M NaOH. Zatim je rastvor zagrevan dva sata na 50°C, a dobijeni rastvor je neutralisan sa HCl do pH 7,2 i dopunjen do 1 mL sa destilovanom vodom. U ogledima su korišćene sledeće žučne kiseline: CA, DCA (Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, USA) i 12-MKC koja je sintetisana je na Katedri za Farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju, Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, prema metodi Miljkovic i saradnici (2000). Etanol, metanol, voda, acetonitril i n-oktanol bili su HPLC čistoće (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ).

3.2.2. Priprema standardnih i radnih rastvora

Standardni osnovni rastvori simvastatina pripremani su tačnim odmeravanjem supstance na analitičkoj vagi i rastvaranjem u metanolu. Osnovni rastvor čuvan je u frižideru na 4 °C ne duže od pet dana. Standardni rastvori SVL i SVK za kalibraciju pripremani su razblaživanjem osnovnog rastvora odgovarajućim puferima (0,1 M acetatni pufer pH 5 i 0,035 M fosfatni pufer pH 7,4). Rezultati kalibracije dobijeni kao zavisnosti površine pika od koncentracije simvastatina [$\mu\text{g/mL}$], prikazani su na **Grafikonu 2**.

Osnovni rastvori soli žučnih kiselina u koncentraciji 12,5 mM pravljeni su odmeravanjem i rastvaranjem odgovarajuće količine žučnih kiselina u vodi i dodavanjem ekvimolarnih količina NaHCO_3 . Rastvori su filtrirani kroz membranske filtere veličine pora 0,20 μm (Minisart, Sartorius AG, Goettingen, Nemačka). Ogledi su vršeni sa ekvimolarnim koncentracijama žučnih kiselina (0,25 mM) koje su ispod njihovih KMK. Rastvori su pripremani najranije 24 časa pre eksperimenta i do eksperimenta su čuvani u frižideru na +4 °C. U eksperimentu su korišćeni rastvori zagrejani do sobne temperature.



Grafikon 2. Kalibracione krive za SVL i SVK na pH 5 i pH 7,4 predstavljene kao zavisnosti površine pikova od koncentracije simvastatina [$\mu\text{g/mL}$] sa koeficijentima korelacije

3.2.3. Shake-flask metoda određivanja distribucionog koeficijenta simvastatina

Određivanje distribucionog koeficijenta simvastatina je rađeno metodom mućkanja ili *shake-flask* metodom. U ovom delu eksperimenta, ispitan je uticaj natrijumovih soli različitih žučnih kiselina (natrijum holat, NaC; natrijum-12-monoketoholat, NaMKC i natrijum deoksiholat, NaDC) na distribicioni koeficijent simvastatina u sistemu oktanol-pufer, odnosno između nepolarne i polarne faze.

Polarna (vodena faza) i nepolarna faza (oktanol) mešani su u odnosu 10:1. Vodenu fazu predstavljali su 0,1M acetatni pufer pH 5 odnosno 0,035 M fosfatni pufer pH 7,4. Jonska jačina podešena je pomoću 0,1 M NaCl čime je postignut ujednačen sadržaj jona u širem pH opsegu. Pre početka samog eksperimenta organska faza pomešana je sa vodenom fazom i ostavljena 24 časa da stoji kako bi došlo do zasićenja jednog rastvarača sa drugim radi preciznijeg određivanja particionog odnosno distribucionog koeficijenta. Nakon toga, faze su razdvojene pomoću levka za odvajanje.

U skladu sa prethodno publikovanom metodom (Serajuddin et al., 1991), zbog izrazito male rastvorljivosti SVL u vodi, on je prvo precizno odmeren i rastvoren u oktanolu kako bi se obezbedila inicijalna koncentracija od 5-7 mg/mL, a potom je dodata vodena faza.

Prethodno pripremljen rastvor SVK je rastvaran u vodenoj fazi, pre dodavanja organske faze kako bi se napravila koncentracija od 0,5-0,7 mg/mL, odakle je zatim uzimano 100 μ L za HPLC analizu radi određivanja početne koncentracije.

Ispitan je uticaj dodatka žučnih soli (NaC, NaMKC, NaDC) u ekvimolarnim količinama (0,25 mM) na distribicioni koeficijent SVK i SVL. Korišćene koncentracije žučnih kiselina bile su daleko ispod njihovih KMK kako bi se izbeglo formiranje micela i emulzija. Kontrole su pripremljene na isti način, samo bez dodatka žučna kiselina. Sve analize rađene su u triplikatu.

Zbog fotonestabilnosti simvastatina, čitav eksperiment odvijao se u uslovima zaštićenim od svetlosti. Pripremljene epruvete sa šlifovanim zatvaračima su mućkane ručno pet minuta, blagim pomeranjem za 180 stepeni na jednu i na drugu stranu. Vršeno je 300 inverzija što je prema podacima iz literature optimalno, jer bi više moglo da dovede do degradacije simvastatina (Serajuddin et al., 1991). Nakon mućkanja, epruvete su stavljene u centrifugu 10 minuta na 2000 obrtaja/min kako bi se omogućilo razdvajanje faza i postizanje ravnotežnog stanja. Potom je uzimano 100 μ L donje vodene faze za određivanje koncentracija simvastatina (C_{v2}). Distribicioni koeficijent računat je prema sledećoj formuli:

$$\log D = \log \frac{C_{o2}}{C_{v2}}$$

gde su C_{o2} i C_{v2} , koncentracije leka u oktanolu i vodenoj fazi nakon postizanja ravnotežnog stanja. S obzirom da nije merena koncentracija direktno u oktanolu već samo u vodenoj fazi, koncentracija u oktanolu je računata kao smanjenje koncentracije u vodenoj fazi uzimajući u obzir razliku u zapreminama rastvarača. Odnos zapremina rastvarača oktanol/pufer je bio 1:10. Koncentracije simvastatina u vodenoj fazi određivane su HPLC metodom opisanom u narednom poglavlju.

3.2.4. Hromatografsko određivanje simvastatina

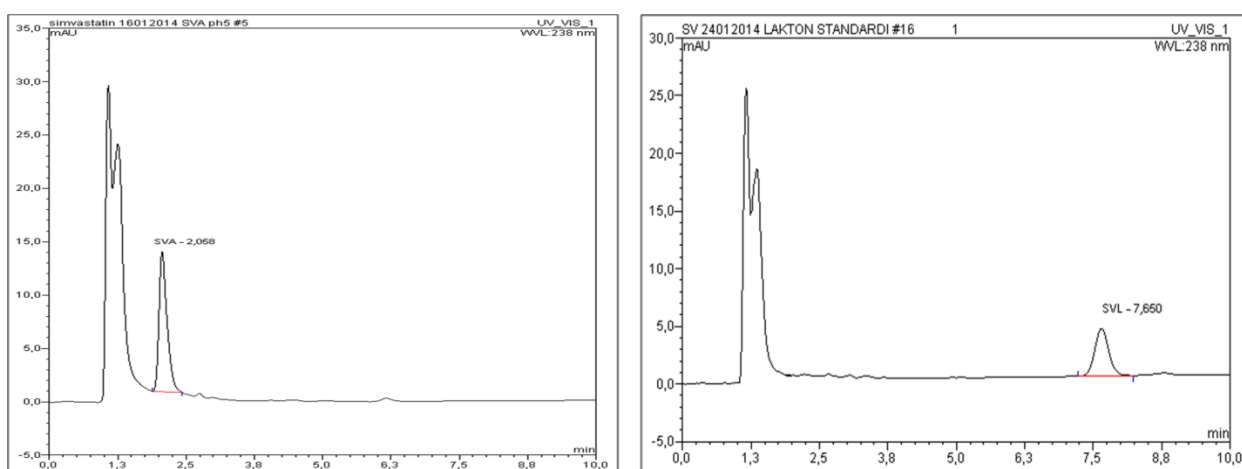
Koncentracije simvastatina određivane su visokoeffikasnom tečnom hromatografijom (HPLC; Dionex) sa DAD (eng. *diode array detector*) detektorom.

HPLC je separaciona tehnika koja se najviše primenjuje u analitici lekova u cilju razdvajanja, kvalitativne i kvantitativne analize smeša farmaceutskih supstanci koje ulaze u sastav farmaceutskih doziranih oblika. Princip rada HPLC-a se zasniva na prolasku ispitivanog uzorka, rastvorenog u pokretnoj, mobilnoj fazi, kroz nepokretnu, stacionarnu fazu,

pri čemu se njegove komponente razdvajaju, pa ih je moguće dalje analizirati i određivati, čak i ako su veoma sličnih struktura ili fizičko-hemijskih osobina. Različite komponente uzorka imaju različit afinitet ka stacionarnoj fazi, pa usled interakcija koje se tom prilikom odvijaju, dolazi do različitog zadržavanja istih na koloni. Vreme zadržavanja zavisi od prirode supstance koja se analizira, stacionarne faze i sastava mobilne faze. Vreme za koje se supstanca eluira, odnosno dođe do kraja kolone, naziva se retenciono vreme i ono je karakteristično za određenu supstancu (Meyer, 2013).

Određivanje koncentracije simvastatina vršeno je prema ranije publikovanoj metodi (Carlucci et al., 1992). Analiza je vršena na reverzno faznoj koloni Zorbax Eclipse Plus-C18 (100 mm x 2,1 mm, 5 μ m, Agilent Technologies, USA), sa predkolonom Zorbax extend C18 (12,5 mm x 2,1 mm, 5 μ m, Agilent Technologies, USA). Tokom analize, temperatura kolone je održavana konstantnom (20 °C), a injekciona zapremina je iznosila 20 μ L. Elucija je izvršena izokratskim programom, pri čemu se mobilna faza sastojala od acetonitrila i fosfatnog pufera (25 mM, pH 4,5) u odnosu 65:35%, v/v. Ukupno vreme trajanja analize iznosilo je 10 min, pri konstantnom protoku mobilne faze od 400 μ L/min. Eluat je praćen pomoću UV/DAD detektora na talasnoj dužini od 238 nm.

Kolona je ispirana mobilnom fazom 30 minuta pre početka rada, do stabilizacije baze pri protoku mobilne faze od 0,04 mL/min. Po završetku analize kolona je ispirana smešom metanol/destilovana voda u odnosu 50:50 (v/v), a ako se kolona nije koristila u periodu dužem od 7 dana ispiranje je vršeno smešom acetonitril/destilovana voda u odnosu 80:20 (v/v). Hromatogrami SVL i SVK sa retencionim vremenima prikazani su na **Slici 18**.



Slika 18. Hromatogrami SVK i SVL sa retencionim vremenima

Kvantitativno određivanje vršeno je pomoću kalibracione krive dobijene nakon injektovanja serije rastvora standardne supstance SVL odnosno SVK u odgovarajućim puferima (pH 5; pH 7,4) u odgovarajućim razblaženjima i detekcije UV/DAD detektorom na 238 nm. Analizirana je zavisnost površine pikova ispitivanih supstanci u funkciji koncentracije.

3.2.5. Kompleksacija simvastatina i žučnih kiselina - *in silico* analiza

Da bismo teorijski izanalizirali molekulske interakcije nastalih kompleksa između SVL i SVK sa DC, CA i 12-MKC, primenjen je semiempirijski PM3 metod (eng. *Parameterized Model number 3* - semiempirijska metoda za kvantne proračune molekulske elektronske strukture) u okviru MOPAC softverskog paketa (MOPAC Molecular Orbital PACKage) u Chem3D Ultra 7.0.0 programu (Cambridge Soft Corporation, MA, USA). Chem3D Ultra 7.0.0 program je primenjen za izračunavanje fizičko-hemijskih deskriptora analiziranih jedinjenja i njihovih kompleksa. Konolijeve površine - površina molekula dostupna rastvaraču (eng. *Solvent Accessible Surface Area, SAS*), molekulska površina (eng. *Molecular Surface Area, MS*) i zapremina molekula nedostupna rastvaraču (eng. *Solvent-Excluded Volume, SEV*), kao i ukupne energije optimizovanih struktura su izračunate radi interpretacije dobijenih *in vitro* rezultata. Ukupna energija predstavlja sumu energije istezanja (eng. *stretch energy, Es*), energije savijanja (eng. *bend, Eb*), energije istezanja-savijanja (eng. *stretch-bend, Esb*), uvijanja (Et, eng. *Torsion*), 1,4 Van Der Waals-ove energije (1,4 VDW), ne-1,4 Van Der Waals-ove energije (ne - 1,4 VDW) i dipol-dipol energije (Ed). Na osnovu izračunatih energija utvrđeno je koja od njih najviše doprinosi stabilizaciji ispitivanih kompleksa.

3.3. *In silico* ispitivanje interakcija simvastatina i žučnih kiselina sa probiotskim bakterijama na nivou transportera - doking studije

Radi procene uticaja žučnih kiselina na transport simvastatina u/iz probiotske bakterije putem transportnih proteina izvršene su doking studije prilikom čega je analiziran i poređen afinitet simvastatina i žučnih kiselina (CA, 12-MKC i DCA) prema svim transporterima probiotskih bakterija koji kao supstrat imaju lekove (tzv. *multidrug* transporteri). Cilj je bio da se ispituju interakcije simvastatina sa žučnim kiselinama na nivou probiotskih transportnih proteina, odnosno da se proceni efekat žučnih kiselina na transport simvastatina u/iz bakterijske ćelije. Cilj primene metode molekuskog dokinga je bio da se u izvesnoj meri pretpostave efekti *in vivo* ispitivanja.

3.3.1. Transportni proteini - baza podataka i 3D strukture

Lista membranskih transportnih proteina za *Lactobacillus acidophilus* NCFM (LA) i *Bifidobacterium longum* NCC2705 (BL) dobijena je iz odgovarajuće baze podataka - *TransportDB*, dostupne na <http://www.membranetransport.org/> (Ren et al., 2007). Za ispitivane bakterije, od velikog broja prisutnih transportnih proteina, fokus je bio stavljen na *multidrug* transportere.

Sekvenca nukleotida ispitivanih transportnih proteina dobijena je iz NCBI baze podataka u FASTA formatu, koja je dalje korišćena radi predviđanja njihove trodimenzionalne strukture pomoću *I-TASSER* servera (*Iterative Threading ASSEmblY Refinement*). Ovaj server primenjuje homologno ili *ab initio* modeliranje za predikciju 3D struktura proteina (Roy et al., 2010). Dobijene 3D strukture, imaju dodeljeni skor pouzdanosti (c-skor) koji se nalazi u intervalu [-5, 2] gde veće vrednosti ukazuju na model sa pouzdanijom strukturom i obrnuto. Očekuje se da modeli sa c-skorom većim od -1,5 imaju pravilnu konformaciju (Roy et al., 2010). Zbog toga, proteini čiji je c-skor bio ispod -1,5 nisu uzeti u dalju analizu doking studija.

3.3.2. Ligandi

Strukture simvastatina, CA i DCA u mol2 formatu dobijene su iz ZINC baze podataka. Struktura 12-MKC, koja nije dostupna u ovoj bazi, nacrtana je u ACD/ChemSketch-u, programu za crtanje i optimizaciju hemijskih struktura (ACD/ChemSketch, ver. 12.0, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Kanada, www.acdlabs.com, 2010)

3.3.3. Doking studija

Doking studija je izvedena pomoću SwissDock web-servisa (<http://swissdock.vital-it.ch/>) (Roy et al., 2010). Ovaj program zahteva ulazne parametre proteina u .pdb (eng. *Protein Data Bank*), a liganda u .mol2 formatu. Kada se *upload*-uju, sva računanja se odvijaju na strani servera. Prilikom izvođenja doking analize nije definisano tačno mesto vezivanja (eng. *blind docking*), budući da tačna mesta vezivanja na transportnim proteinima bakterija nisu poznata. Rezultati su preuzimani sa servera, a vizualizacija i dalja analiza vršena je pomoću programa UCSF Chimera ver. 1.9 (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) (Pettersen et al., 2004). Istovremeno, dobijene su i vrednosti procenjenih CHARMM energija kompleksa. Različiti kriterijumi mogu da se koriste za procenu afiniteta vezivanja liganda za protein, uključujući slobodnu energiju vezivanja (eng. *binding free energy*, ΔG), *Full Fitness* skor, vodonične veze i ukupnu slobodnu energiju (eng. *total free energy*). U našoj studiji, slobodna energija vezivanja (ΔG) je izabrana kao glavni kriterijum za rangiranje potentnosti liganada. Što je manja slobodna energija vezivanja, to je veći afinitet vezivanja liganda za ciljani protein. Mesto interakcije ispitivanog liganda i ciljnog proteina je analizirano radi utvrđivanja rezidua koje doprinose vezivanju. Pearsonov koeficijent korelacije računat je kako bi se ispitaio stepen korelacije između broja vodoničnih veza i slobodne energije vezivanja.

3.4. Statistika

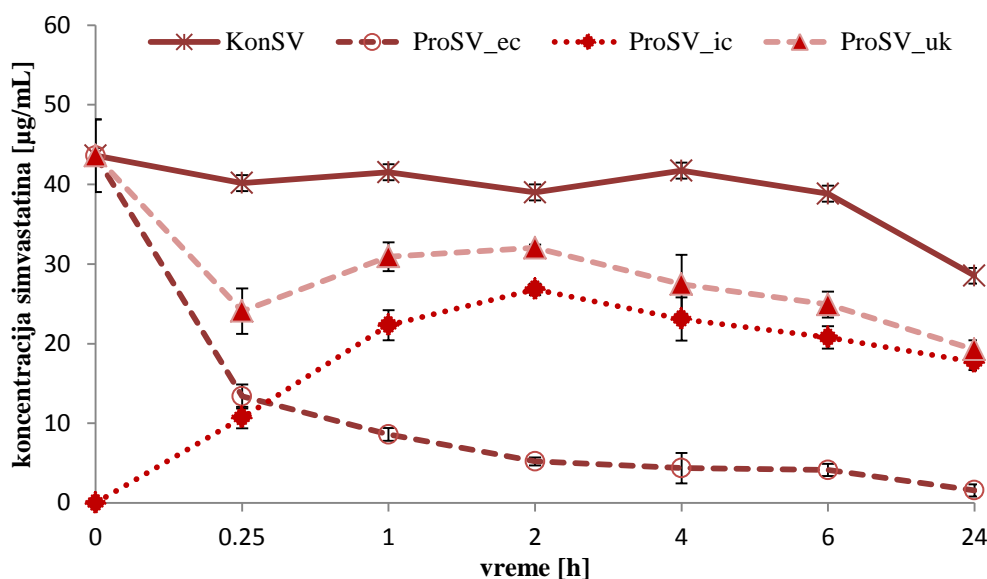
Statistička obrada dobijenih rezultata ispitivanja je rađena statističkim programom IBM SPSS Statistics, ver. 21. Rezultati su predstavljeni tabelarno i grafički. Za analizu primarnih podataka korišćene su deskriptivne statističke metode, metode za testiranje statističkih hipoteza, metode za ispitivanje zavisnosti. Od deskriptivnih statističkih metoda koristile su se mere centralne tendencije (aritmetička sredina) i mere varijabiliteta (standardna devijacija, SD).

Statistička značajnost razlika određenih grupa je ispitivana Student t-testom za nezavisne uzorke i analizom varijanse sa jednim promenljivim faktorom (jednosmerna ANOVA) sa Tukey i Fischer LSD post hoc testovima za istovremeno poređenje više uzoraka. Statističke hipoteze su testirane na nivou statističke značajnosti (alfa nivo) od 5% ($p < 0,05$). Od metoda za analizu zavisnosti korišćeni su koeficijent linearne korelacije i regresiona analiza. Povezanost određenih parametara ispitivana je Pearsonovim testom korelacije.

4. REZULTATI

4.1. Prodor simvastatina u probiotske bakterije

Na **Grafikonu 3** prikazane su koncentracije simvastatina u ekstracelularnom (ProSV_ec), intracelularnom (ProSV_ic) i ukupnom (ProSV_uk) sadržaju tokom dvadesetčetvoročasovne inkubacije sa probioticima u poređenju sa kontrolom (KonSV).



Grafikon 3. Koncentracije simvastatina u ekstracelularnom (ProSV_ec), intracelularnom (ProSV_ic) i ukupnom (ProSV_uk) sadržaju tokom dvadesetčetvoročasovne inkubacije sa probioticima u poređenju sa kontrolom (KonSV). Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm SD

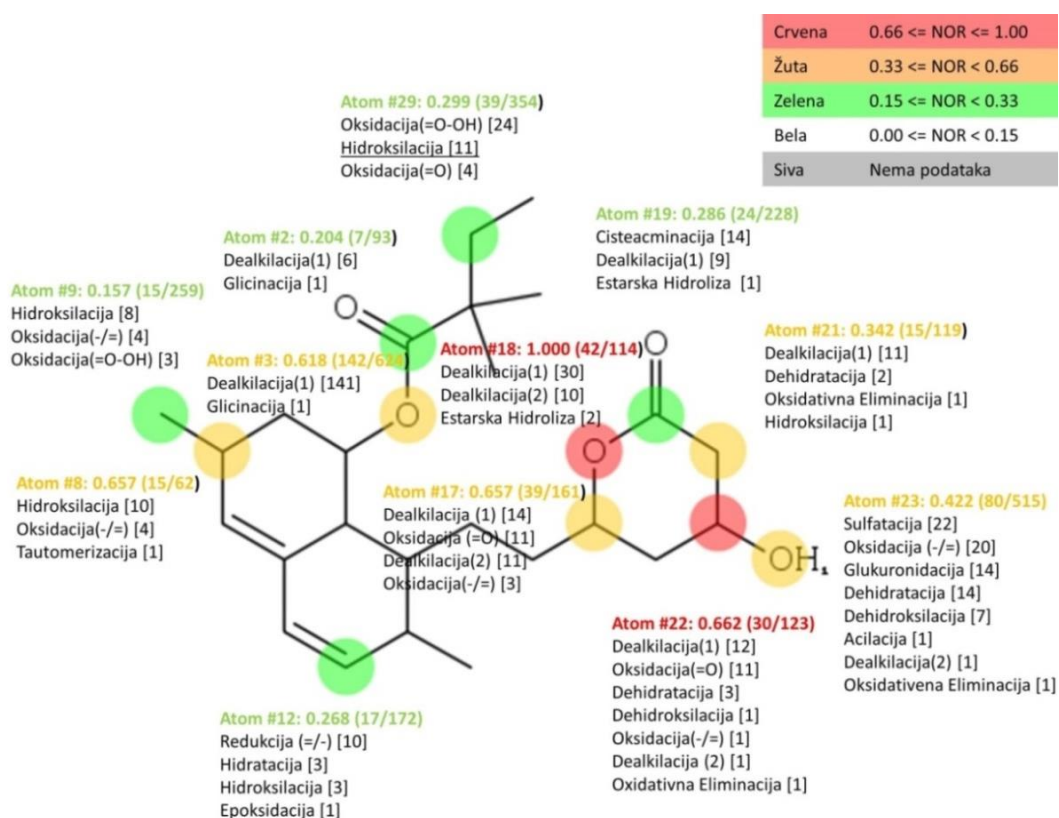
Može se primetiti da prilikom inkubacije sa probiotskim bakterijama postoji statistički značajan pad koncentracije simvastatina u ekstracelularnom sadržaju koji je bio najizraženiji u prvih petnaest minuta (od $43,60 \pm 4,55$ $\mu\text{g/mL}$ u nultom minutu do $13,38 \pm 1,51$ $\mu\text{g/mL}$ u petnaestom minutu). Taj trend smanjenja koncentracije simvastatina u ekstracelularnom sadržaju nastavljen je tokom čitavog posmatranog perioda (24 časa) ali u blažem stepenu. U skladu sa tim, već nakon petnaest minuta inkubacije, zabeležene su značajne koncentracije leka u intracelularnom sadržaju i one rastu u prva dva sata inkubacije nakon čega se održavaju relativno stabilnim bez statistički značajnih promena. U drugom satu je zabeležena maksimalna koncentracija simvastatina unutar ćelija koja je iznosila $26,82 \pm 0,72$ $\mu\text{g/mL}$. Ukupan sadržaj simvastatina, kao zbir ekstracelularnog i intracelularnog sadržaja, tokom čitavog ispitivanog perioda bio je statistički značajno niži u odnosu na kontrolnu grupu bez

probiotika. Ukupna koncentracija simvastatina nakon dvadesetčetvoročasovne inkubacije sa probioticima iznosila je $19,27 \pm 1,16$ $\mu\text{g/mL}$ u poređenju sa kontrolom gde je koncentracija iznosila $28,53 \pm 4,37$ $\mu\text{g/mL}$. Koncentracija simvastatina u kontrolnoj grupi se održavala relativno stabilno tokom prvih 6h da bi se značajno smanjila nakon 24 časa inkubacije. Posmatrano u odnosu na nulti minut, smanjenje koncentracije simvastatina u kontrolnoj grupi se kretalo od $43,60 \pm 4,55$ do $28,53 \pm 4,37$ $\mu\text{g/mL}$.

4.2. Metabolizam simvastatina pod uticajem probiotskih bakterija

4.2.1. Rezultati MetaPrint2D analize

Kao polazne informacije o potencijalnim metabolitima simvastatina, nastalim pod dejstvom enzimske aktivnosti probiotskih bakterija, poslužili su rezultati analize u programu MetaPrint2D. Pomoću ovog programa, označeni su atomi u molekulu simvastatina koji su najpodložniji metaboličkim promenama kao i reakcije koje se na njima mogu odigrati (**Slika 19**).



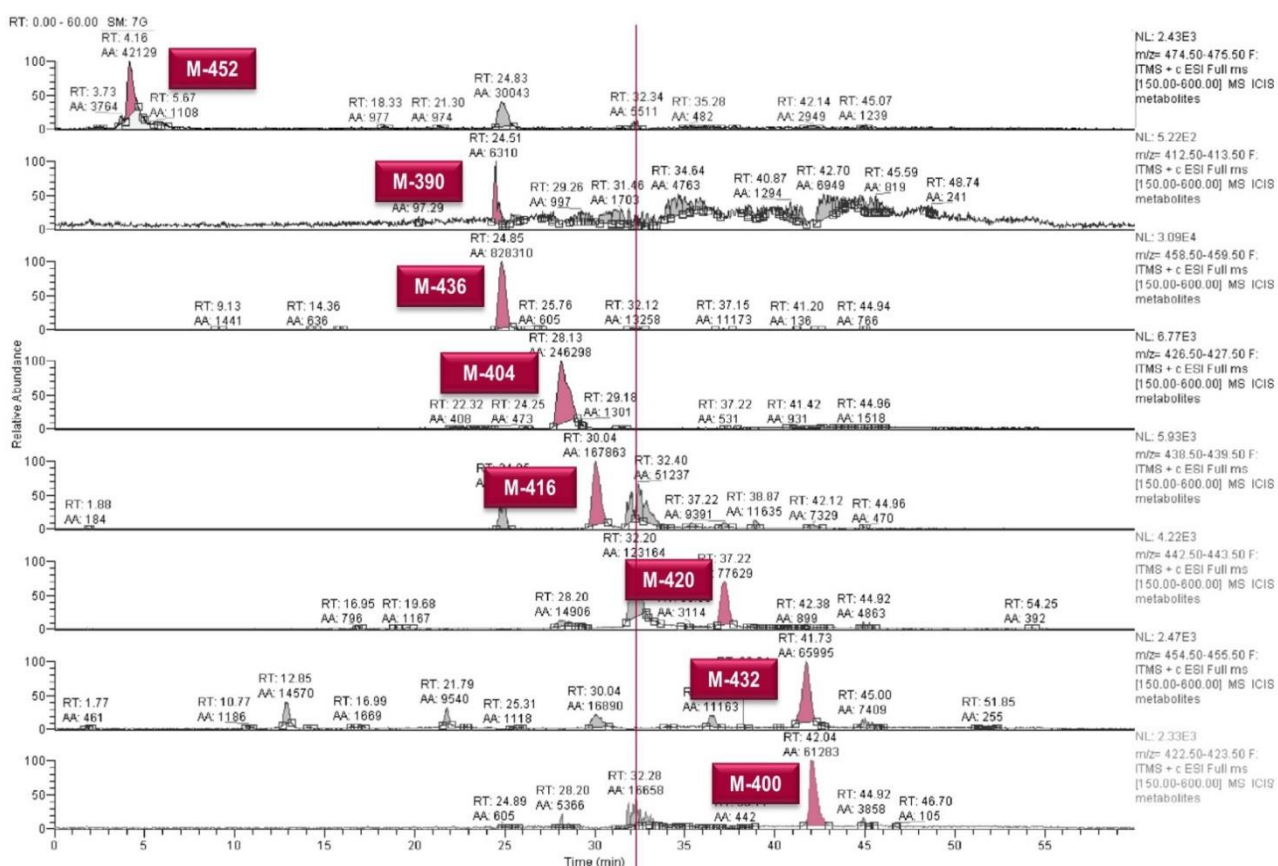
Slika 19. Rezultati MetaPrint2D analize. Označeni su atomi u molekulu simvastatina koji su najpodložniji metaboličkim promenama kao i reakcije koje se na njima mogu odigrati

Najverovatnija mesta odigravanja reakcija tj. ona koja imaju najveću vrednost NOR-a označena crvenom bojom. Potom slede mesta označena žutom, pa zelenom bojom. Kao što se može primetiti, u molekulu simvastatina laktonski prsten je najpodložniji metaboličkim promenama, i to atom O18 na kom su moguće reakcije dealkilacije i estarske hidrolize prilikom čega dolazi do otvaranja laktonskog prstena, kao i ugljenikov atom C22 gde su moguće reakcije dealkilacije, dehidratacije, dehidroksilacije, oksidacije i oksidativne

eliminacije. Ostala potencijalna mesta metabolisanja su takođe označena različitim bojama i navedene su potencijalne reakcije na njima. U daljem tekstu, u cilju objašnjenja odigranih reakcija, odnosno atoma na kojima se reakcija dogodila, koristiće se numeracija atoma predložena ovim programom.

4.2.2. Hromatogrami detektovanih metaboličkih produkata simvastatina

Glavni metabolički produkti simvastatina označeni su u skladu sa molekulskom masom kao M-452, M-390, M-436, M-404, M-416, M-420, M-432 i M-400. Ekstrahovani hromatogrami detektovanih jedinjenja sa retencionim vremenima predstavljeni su na **Slici 20**.

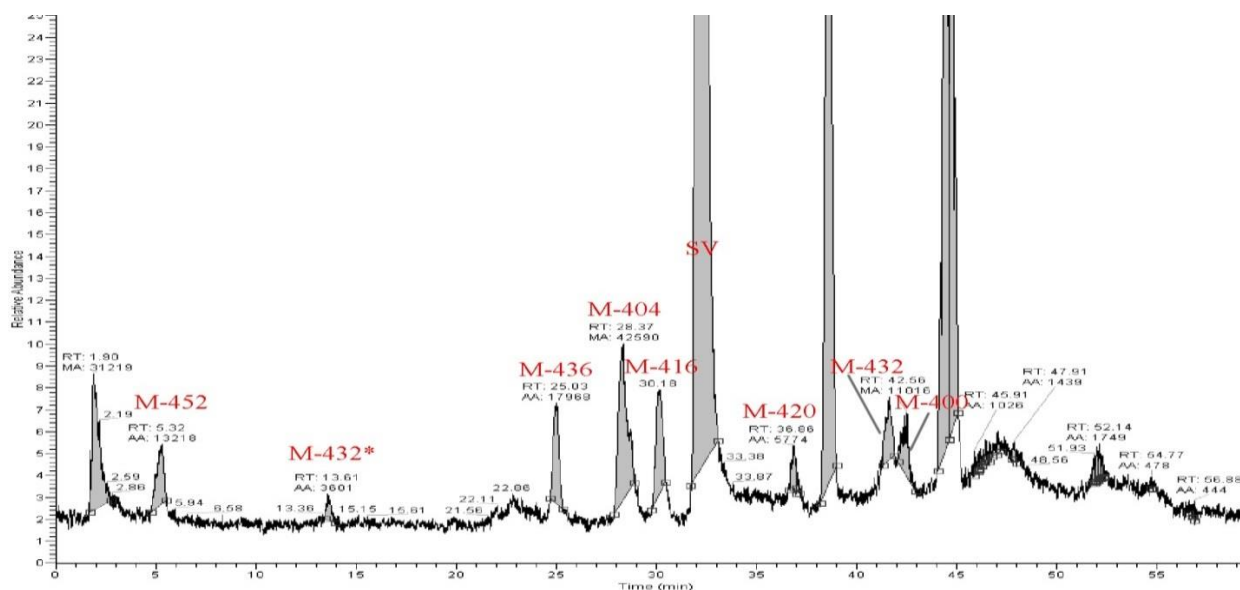


Slika 20. Ekstrahovani hromatogrami $[M+Na]^+$ jona detektovanih jedinjenja sa retencionim vremenima

Prikazani su ekstrahovani hromatogrami adukata molekula detektovanih metabolita sa jonima natrijuma: m/z 475 (M-452) na retencionom vremenu 4,16 min, m/z 413 (M-390) na 24,51 min, m/z 459 (M-436) na 24,85 min, m/z 427 (M-404) na 28,13 min, m/z 439 (M-416) na 30,04 min i jedan manji pik na 24,95 min, m/z 443 (M-420) na 37,22 min, m/z 455 (M-432) na 41,73 min i dva manja pika na 12,85 min i 21,79 min i m/z 423 (M-400) na 42,04

min. Tankom linijom je označeno retenciono vreme na kome izlazi simvastatin (32,24 min) radi lakše preglednosti i interpretacije rezultata. Odstupanja retencionih vremena tokom eksperimenta bila su u granicama $\pm 10\%$.

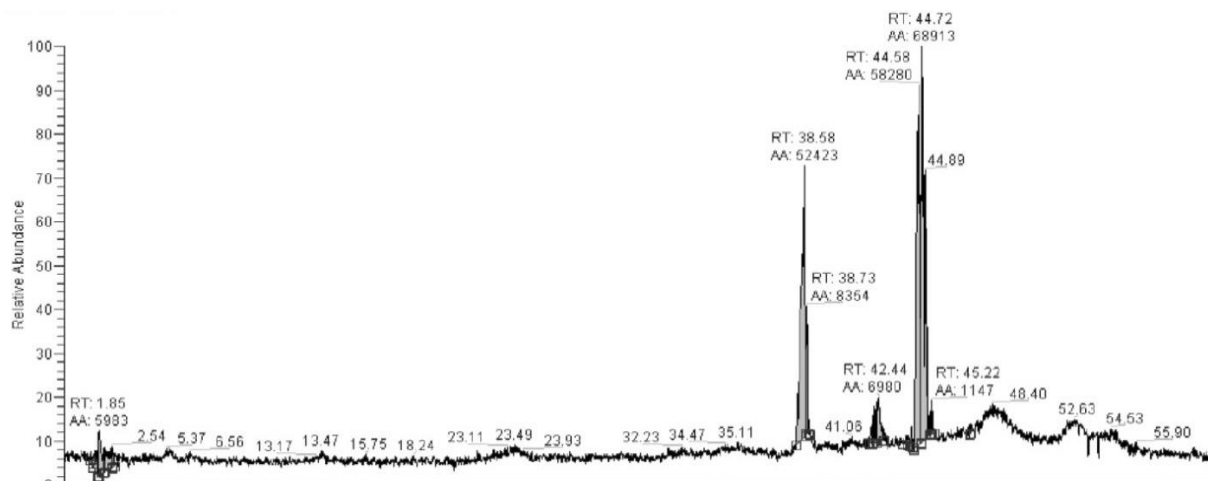
Na **Slici 21.** prikazan je hromatogram dobijen spajanjem pomenutih ekstrahovanih jonskih hromatograma u jedan (kao primer uzet uzorak nakon 4 sata inkubacije sa probioticima) gde se jasno uočava položaj pikova metabolita u odnosu na simvastatin.



Slika 21. Hromatogram $[M+Na]^+$ jona detektovanih metabolita simvastatina u uzorku nakon 4 sata inkubacije sa probioticima

4.2.2.1. Hromatogram blank rastvora

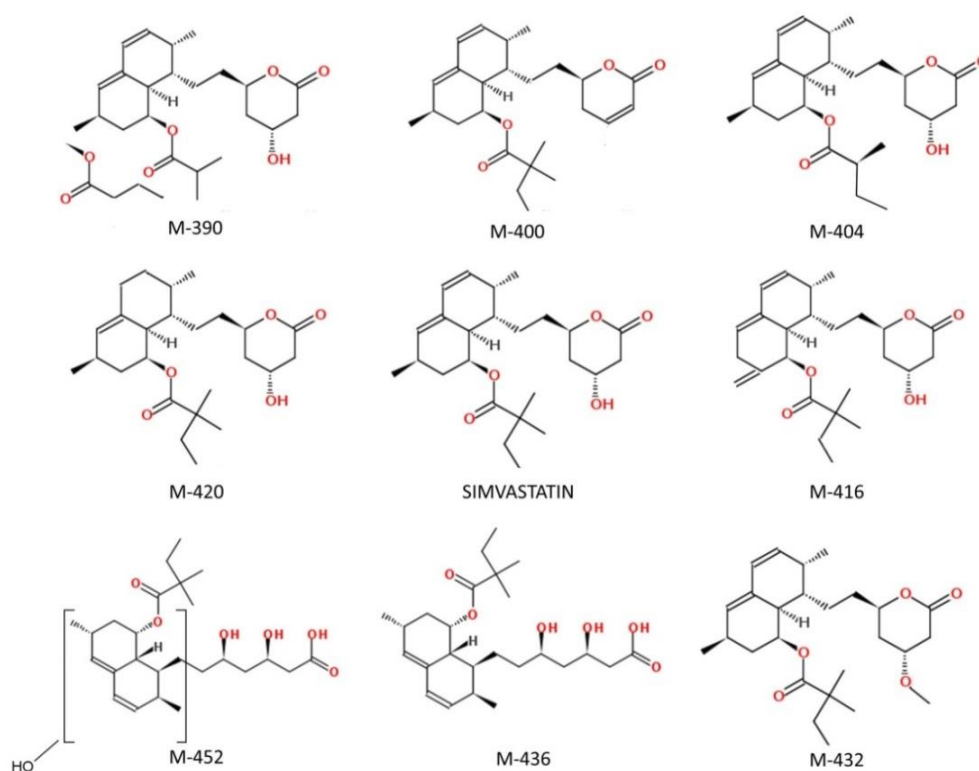
Hromatogram blank rastvora predstavljen je na **Slici 22.** Kako bi se pravilno izvršila interpretacija hromatografskih pikova neophodno ih je bilo razdvojiti od onih koji potiču od rastvarača korišćenih za pripremu uzorka. Ukoliko je pik poticao od rastvarača u daljoj analizi je jednostavno zanemaran. Kao što se može primetiti, blank rastvor pokazuje dva jaka signala na 38,58 min i 44,72 min, kao i jedan slabiji na 42,44 min.



Slika 22. Hromatogram blank rastvora

4.2.3. Strukture detektovanih metabolita

Pretpostavljene strukture detektovanih metabolita prikazane su na **Slici 23**. Maseni hromatogrami i spektri prvog i drugog reda predstavljeni su i objašnjeni u daljem tekstu za svaki metabolit pojedinačno.



Slika 23. Strukture identifikovanih metabolita simvastatina

U **Tabeli 3** za svaki detektovani metabolit su prikazana retencionna vremena, molekulske mase, mase adukata sa protonom odnosno natrijumom, kao i elementarni sastav jedinjenja.

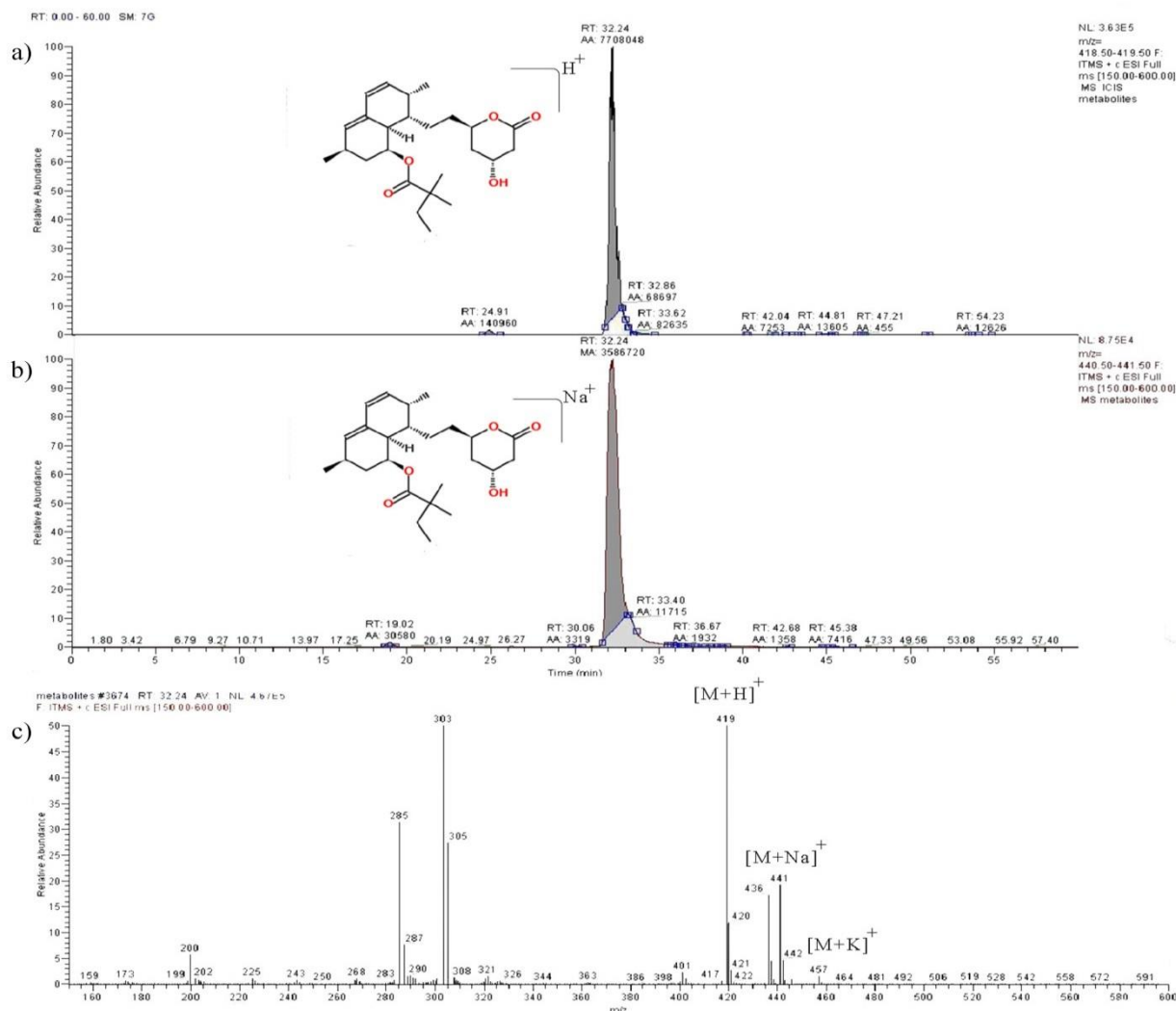
Tabela 3. Informacije o detektovanim metabolitima simvastatina

Supstanca	Rt(min)	Mr	[M+H] ⁺	Elementarni sastav
M-452	4,16	452,28	453	C ₂₅ H ₄₀ O ₇ H ⁺
M-390	24,51	390,24	391	C ₂₃ H ₃₄ O ₅ H ⁺
M-436	24,85	436,28	437	C ₂₅ H ₄₀ O ₆ H ⁺
M-404	28,13	404,26	405	C ₂₄ H ₃₆ O ₅ H ⁺
M-416	30,04	416,26	417	C ₂₅ H ₃₆ O ₅ H ⁺
Simvastatin	32,24	418,27	419	C ₂₅ H ₃₈ O ₅ H ⁺
M-420	37,22	420,29	421	C ₂₅ H ₄₀ O ₅ H ⁺
M-432	41,73	432,29	433	C ₂₆ H ₄₀ O ₅ H ⁺
M-400	42,04	400,26	401	C ₂₅ H ₃₆ O ₄ H ⁺

4.2.4. Strukturna interpretacija metabolita simvastatina pomoću LC-MS/MS analize

4.2.4.1. Mehanizam fragmentacije simvastatina

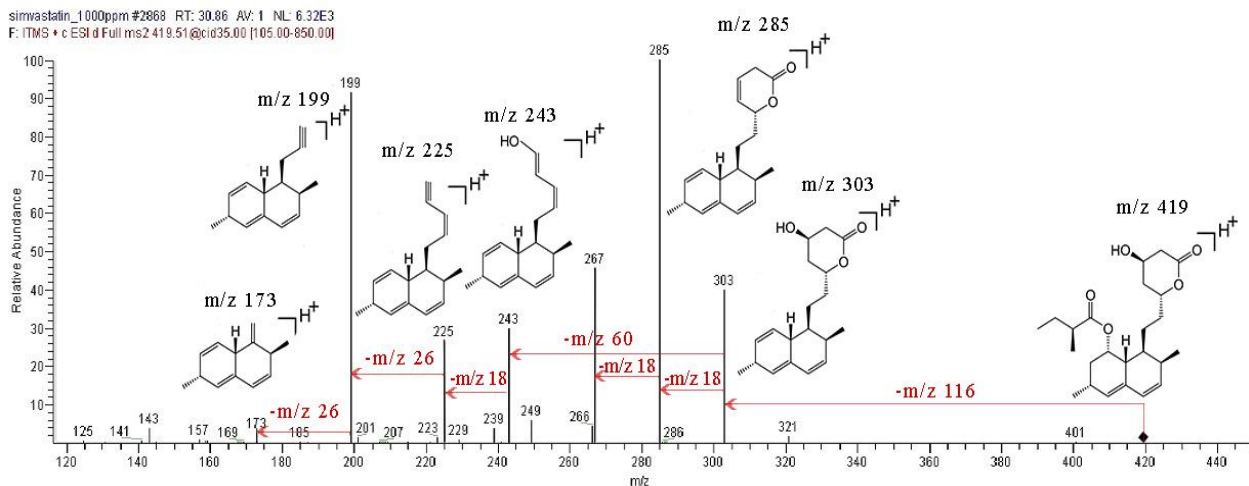
Budući da je simvastatin polazno jedinjenje usled čije nestabilnosti i enzimske aktivnosti bakterija nastaju metaboliti, prvo je bilo neophodno razjasniti mehanizam fragmentacije samog simvastatina. Na **Slici 23** prikazani su ekstrahovani hromatogrami adukta molekula simvastatina sa protonom (C₂₅H₃₈O₅H⁺, m/z 419) i adukta sa natrijumom (C₂₅H₃₈O₅Na⁺, m/z 441), kao i njegov maseni spektar prvog reda.



Slika 24. (a) Ekstrahovani maseni hromatogram adukta molekula simvastatina sa protonom (m/z 419) (b) Ekstrahovani maseni hromatogram adukta simvastatina sa natrijumom (m/z 441) (c) MS^1 spektar simvastatina

Retenciono vreme na kom se pojavljuje pik simvastatina iznosi 32,24 min. Maseni spektar prvog reda simvastatina je pokazao jak signal protonovanog molekulskog jona, m/z 419, dok m/z 441 i m/z 457 predstavljaju adukte sa jonima metala $[M+Na]^+$ i $[M+K]^+$, redom.

Na **Slici 25** dat je meseni spektar drugog reda simvastatina i predložen je mehanizam fragmentacije. Kao što se može uočiti, glavni fragmentni joni su m/z 303, 285, 267, 243, 225 i 199. Najdominantniji je jon m/z 285, a za njim sledi m/z 199. Kao joni slabijeg intenziteta pojavljuju se m/z 321, 249, 239, 173, 143.

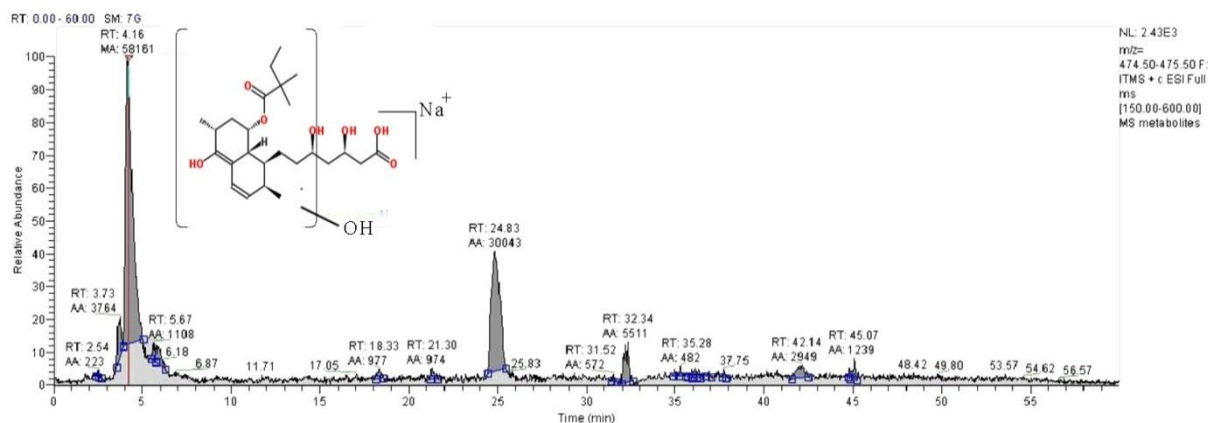


Slika 25. MS^2 spektar simvastatina (m/z 419) i predloženi mehanizam fragmentacije

Prvi prelaz od molekuskog jona m/z 419 ($\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_5\text{H}^+$) do fragmentnog jona m/z 303 ($\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{H}^+$) odgovara neutralnom gubitku 2,2-dimetil butanske kiseline ($m/z=116$). Potom, fragmentacija jona m/z 303 teče dalje u dva smjera. U prvom slučaju, dolazi do neutralnog gubitka molekula vode ($m/z=18$) pri čemu nastaje fragmentni jon m/z 285 ($\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{O}_2$) i, s druge strane, neutralni gubitak molekula etanola ($m/z=60$) dovodi do formiranja fragmentnog jona m/z 243 ($\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{OH}^+$). Slični procesi odigravaju se i sa nastalim fragmentnim jonom m/z 285 pri čemu se formiraju joni m/z 267 ($\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{OH}^+$) i m/z 225 ($\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{H}^+$) nakon gubitka molekula vode ($m/z=18$) odnosno etanola ($m/z=60$), redom. Nakon toga, fragmentni jon m/z 225 podleže sukcesivnoj fragmentaciji neutralnim gubitkom acetilena (C_2H_2 , $m/z=26$), dajući fragmentne jone m/z 199 ($\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{H}^+$) i m/z 173 ($\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{H}^+$).

4.2.4.2. Metabolit M-452

M-452 metabolit je identifikovan kao hidroksilovani oblik simvastatinske kiseline, odnosno hidroksilovani oblik metabolita M-436. Ekstrahovani hromatogram adukta molekula M-452 sa natrijumom ($C_{25}H_{40}O_7Na^+$, m/z 475) kao i maseni spektri prvog i drugog reda prikazani su na **Slikama 26** i **27**, redom.

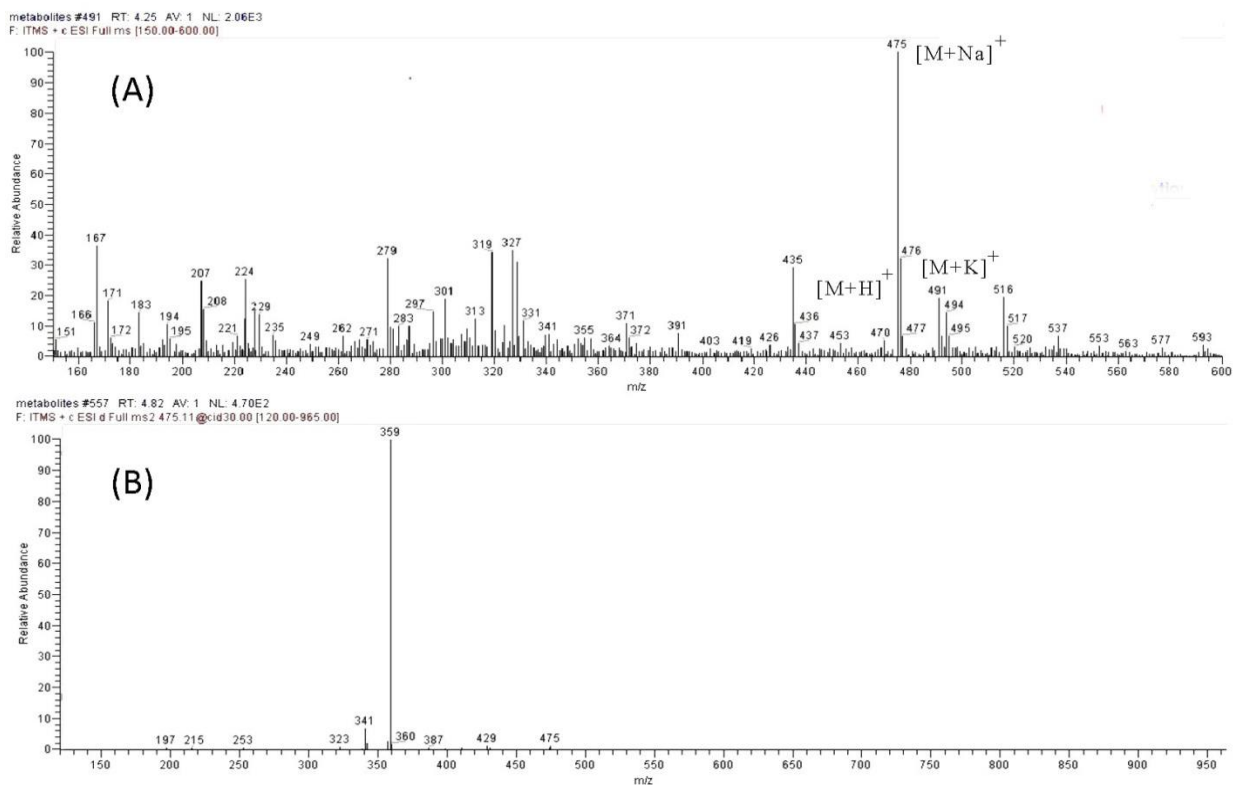


Slika 26. Ekstrahovani hromatogram metabolita M-452, $[M+Na]^+$ ($m/z=475$)

Maseni spektar pika metabolita M-452, sa retencionim vremenom od 4,16 minuta, pokazao je slab signal protonovanog molekulskog jona (m/z 453, $C_{25}H_{40}O_7H^+$) i daleko veći adukta sa natrijumom (m/z 475), a uočava se i jon adukta sa kalijumom (m/z 491).

Na osnovu MS^1 spektra (**Slika 27(A)**) određena je molekulska masa ovog metabolita koja je od molekulske mase simvastatinske kiseline veća za 16 Da, što odgovara jednoj hidroksilnoj grupi, navodeći na zaključak da se radi o hidroksilovanom metabolitu simvastatinske kiseline.

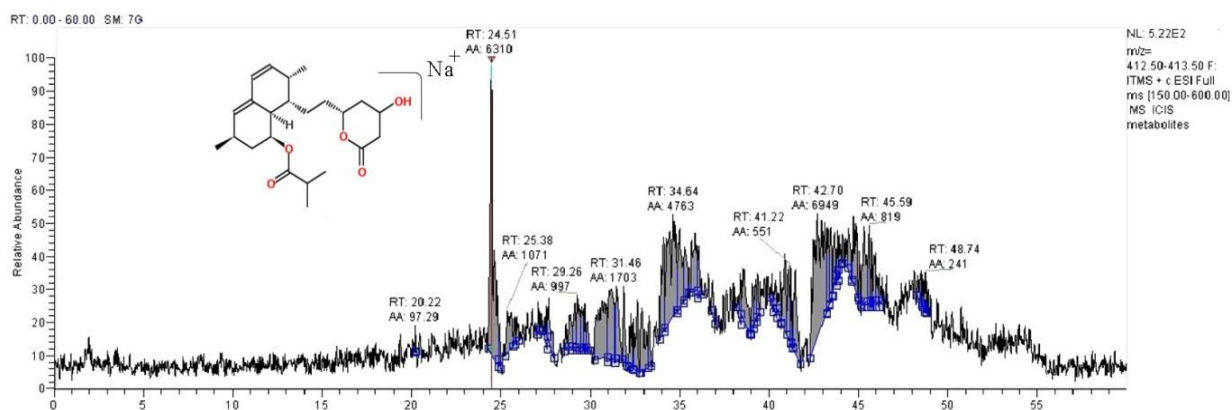
Za selektovani pik snimljen je MS^2 spektar $[M+Na]^+$ jona (**Slika 27(B)**), budući da je intenzitet protonovanog jona bio suviše slab. Fragmentacijom jona adukta sa natrijumom, pri kolizionoj energiji od 30%, formirani su samo fragmentni joni m/z 359 i 341 koji odgovaraju neutralnom gubitku 2,2-dimetil butanske kiseline ($m/z=116$), a potom molekula vode ($m/z=18$) od molekulskog jona m/z 475 što govori u prilog pretpostavljenoj strukturi.



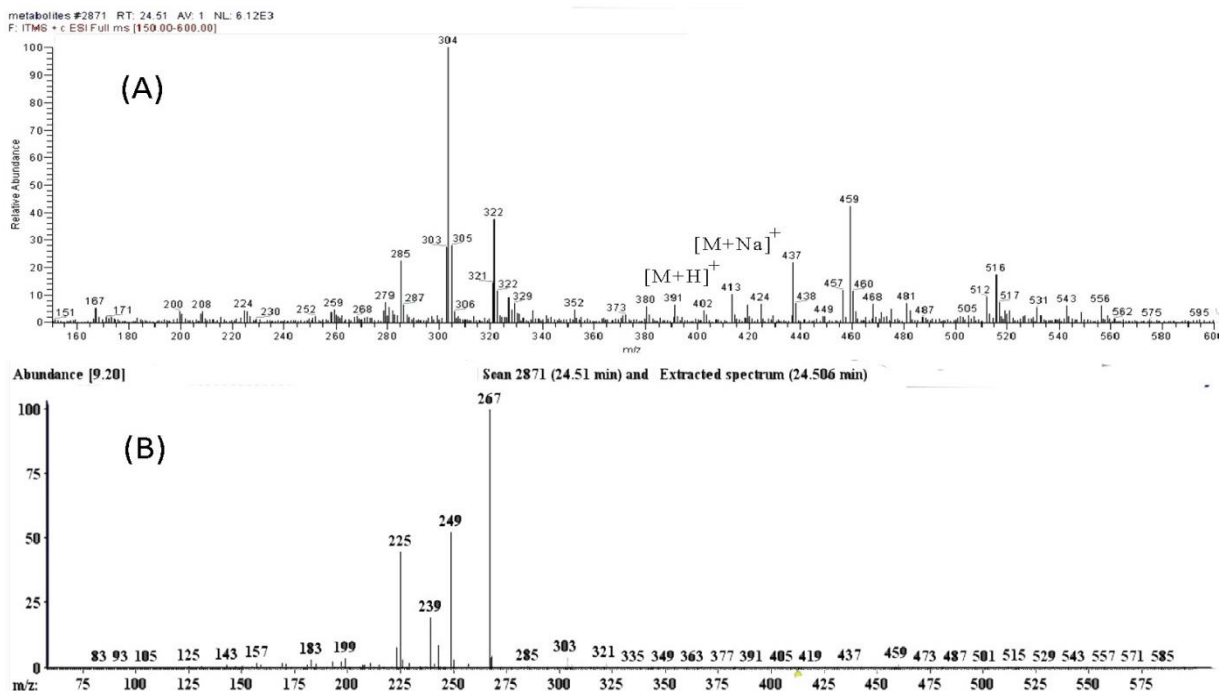
Slika 27. (A) MS^1 spektar metabolita M-452; (B) MS^2 spektar metabolita M-452

4.2.4.3. Metabolit M-390

M-390 metabolit je okarakterisan kao produkt simvastatina sa jednom etil grupom manje. Na Slikama 28 i 29 predstavljeni su hromatogram i maseni spektri prvog i drugog reda ovog metabolita.



Slika 28. Ekstrahovani hromatogram metabolita M-390, $[M+Na]^+$ ($m/z=413$)



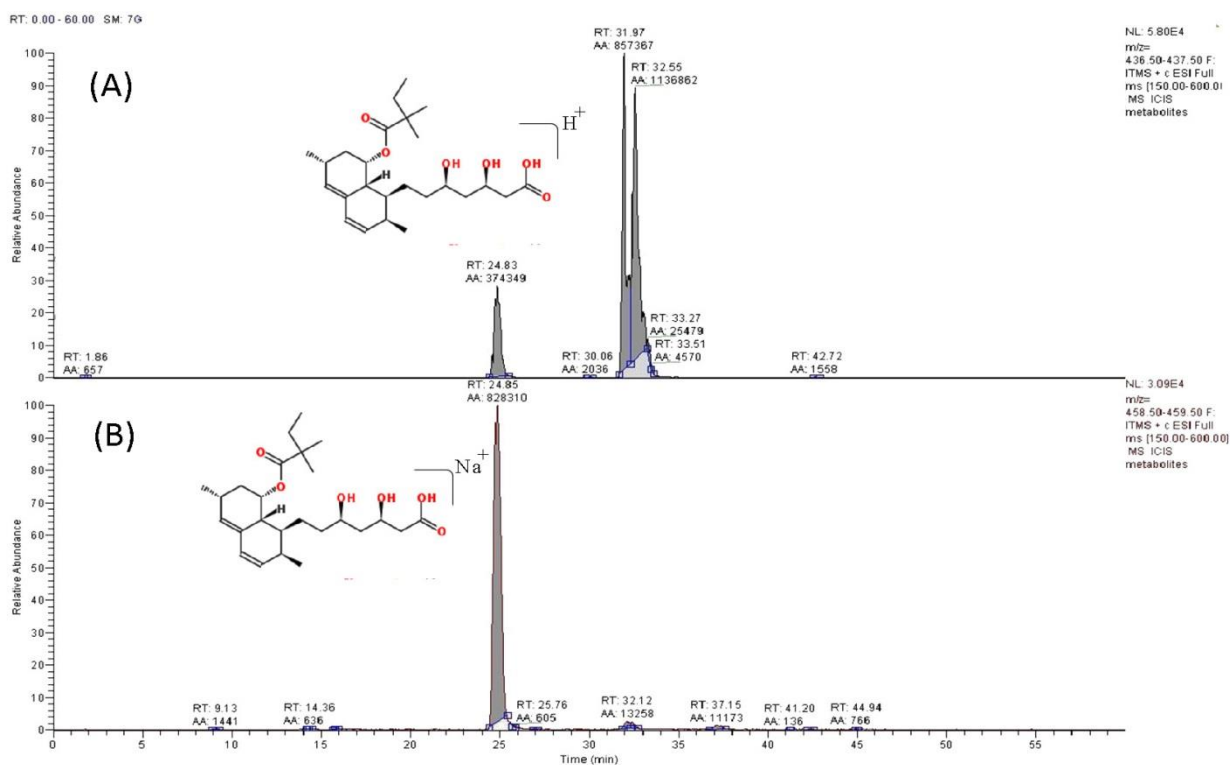
Slika 29. (A) MS^1 spekter metabolita M-390; (B) MS^2 spekter metabolita M-390

Maseni spekter prvog reda metabolita M-390, sa retencionim vremenom 24,51 minuta, pokazao je slab signal protonovanog molekulskog jona (m/z 391, $C_{23}H_{34}O_5H^+$) i nešto veći adukta sa natrijumom (m/z 413) (**Slika 29(A)**). Na osnovu MS^1 spektra određena je molekulska masa koja je manja od molekulske mase simvastatina za 28, odnosno za jednu etil grupu.

Uz pomoć jonske zamke ustanovljen je mehanizam fragmentacije. MS^2 spekter dobijen dekonvolucijom, pri kolizionoj energiji od 30%, dao je karakteristične fragmentne jone za simvastatin m/z 303 ($C_{19}H_{26}O_3H^+$), 267 ($C_{19}H_{22}OH^+$), 225 ($C_{17}H_{20}H^+$), 199 ($C_{15}H_{18}H^+$) i 143, ali i jone m/z 249 i 239 koji su takođe prisutni kod simvastatina mada su slabijeg intenziteta. Uočeni joni karakteristični su za laktonski prsten i naftalensku strukturu u molekulu simvastatina.

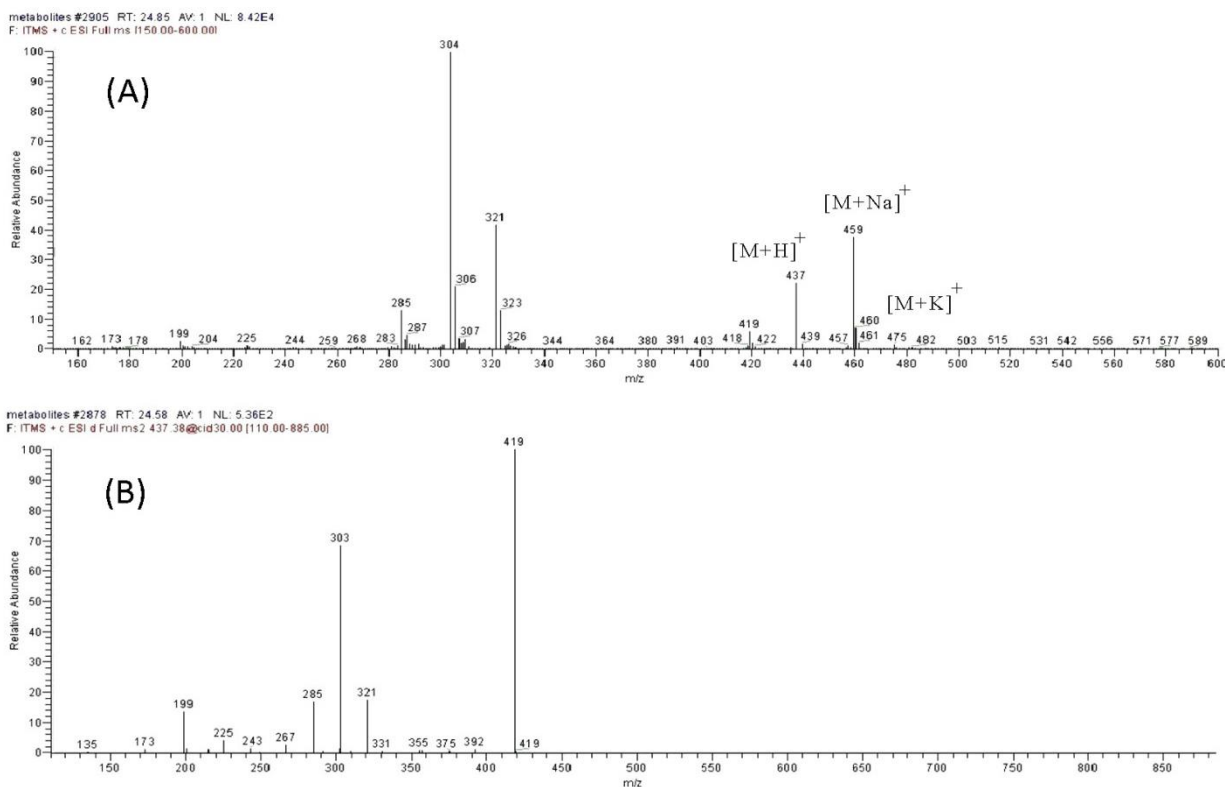
4.2.4.4. Metabolit M-436

Prilikom identifikacije metabolita M-436 korišćeni su podaci o molekularnoj masi, kao i karakteristični fragmenti u MS/MS spektru. M-436 je identifikovan kao simvastatinska kiselina nastala otvaranjem laktonskog prstena. Ekstrahovani jonski hromatogrami i maseni spektri prvog i drugog reda ovog metabolita predstavljeni su na **Slikama 30 i 31**.



Slika 30. Metabolit M-436 (A) Ekstrahovani hromatogram $[M+H]^+$ ($m/z=437$); (B) Ekstrahovani hromatogram $[M+Na]^+$ ($m/z=459$)

Molekulska masa jedinjenja određena je na osnovu masenog spektra prvog reda snimljenog u pozitivnom jonskom modu, putem asignacije adukata molekula M-436 sa protonom (m/z 437, $C_{25}H_{40}O_6H^+$) i jonima alkalnih metala, natrijumom (m/z 459) i kalijumom (m/z 475). Retenciono vreme na kom se pojavljuje pik ovog metabolita iznosi 24,85 minuta. MS^2 spektar dobijen pri kolizionoj energiji od 30%, dao je karakteristične fragmentne jone za simvastatin m/z 303, 285, 267, 243, 225 i 199 ali i nešto izraženiji pik m/z 321 ($C_{19}H_{28}O_4H^+$) koji nastaje u prvom prelazu od molekulskog jona 437 m/z prilikom neutralnog gubitka 2,2-dimetil butanske kiseline ($m/z=116$).

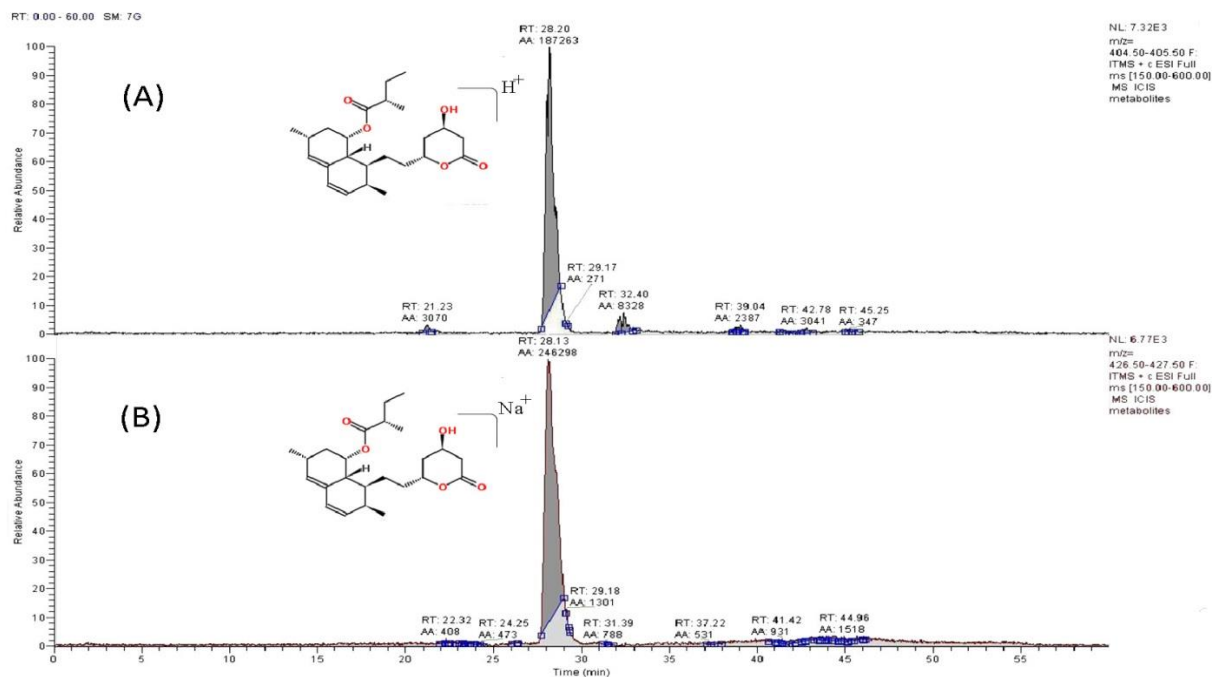


Slika 31. (A) MS^1 spektr metabolita M-436; (B) MS^2 spektr metabolita M-436

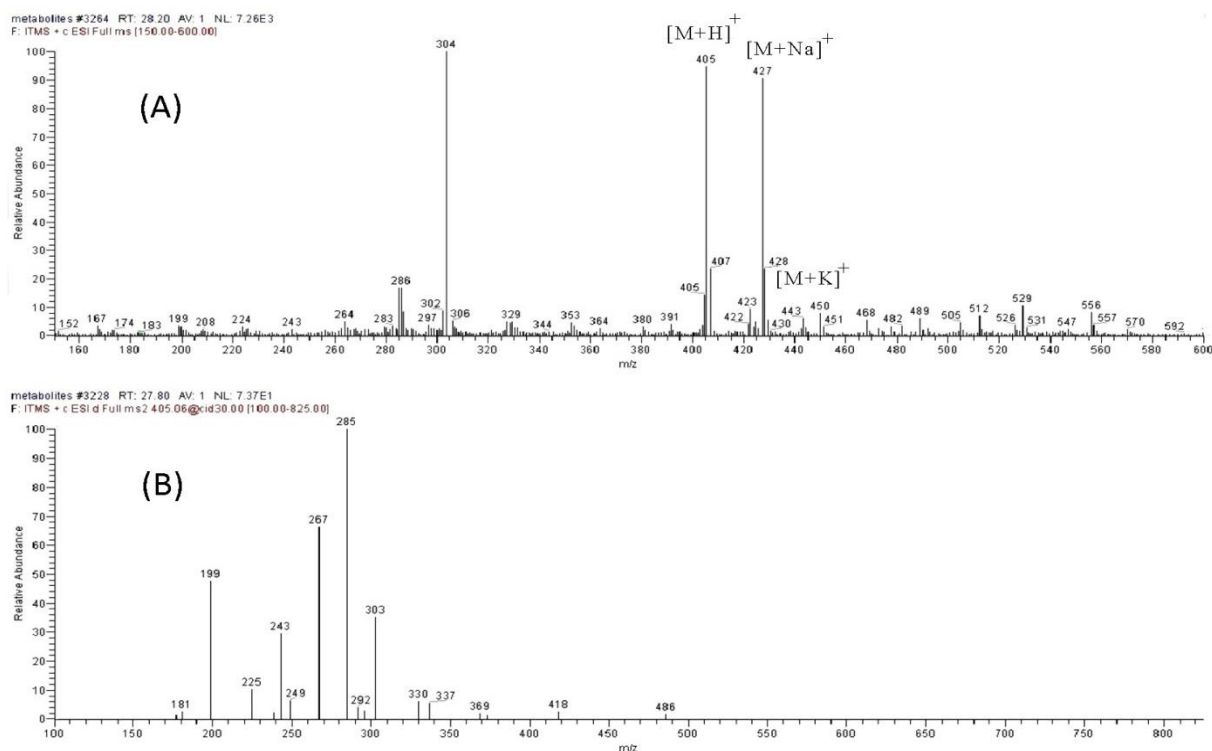
4.2.4.5. Metabolit M-404

Metabolit M-404 okarakterisan je kao lovastatin odnosno demetilovani metabolit simvastatina na osnovu razlike u molekulskim masama za m/z 14 Da, kao i na osnovu MS/MS fragmentacije. Ekstrahovani jonski hromatogrami lovastatina i maseni spektri prvog i drugog reda predstavljeni su na **Slici 32** i **Slici 33**.

Retenciono vreme na kom se pojavljuje pik ovog metabolita iznosi 28,13 minuta. Molekulska masa određena je na osnovu masenog spektra prvog reda snimljenog u pozitivnom modu, putem asignacije adukata molekula M-404 sa protonom (m/z 405, $C_{24}H_{36}O_5H^+$) i jonima alkalnih metala, natrijumom (m/z 427) i kalijumom (m/z 443). Razlika od m/z 14 u molekulskim masama ukazuje na jednu metil grupu manje kod ovog metabolita. MS^2 spektr dobijen pri kolizionoj energiji od 30%, pokazuje identične karakteristične fragmentne jone kao i simvastatin. To su joni 303 m/z ($C_{19}H_{26}O_3H^+$), 285 m/z ($C_{19}H_{24}O_2H^+$), 267 m/z ($C_{19}H_{22}OH^+$), m/z 243 ($C_{17}H_{22}OH^+$), 225 m/z ($C_{17}H_{20}H^+$) i 199 m/z ($C_{15}H_{18}H^+$).



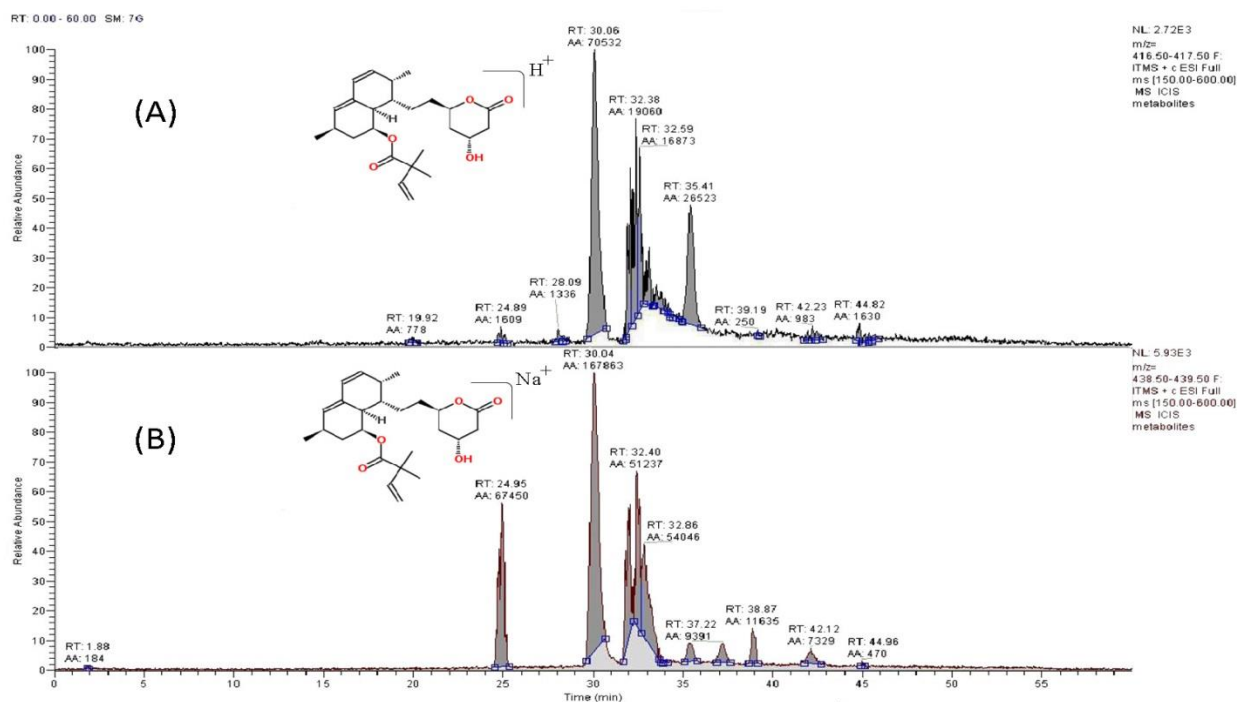
Slika 32. Metabolit M-404 (A) Ekstrahovani hromatogram $[M+H]^+$ ($m/z=405$); (B) Ekstrahovani hromatogram $[M+Na]^+$ ($m/z=427$)



Slika 33. (A) MS^1 spektar metabolita M-404; (B) MS^2 spektar metabolita M-404

4.2.4.6. Metabolit M-416

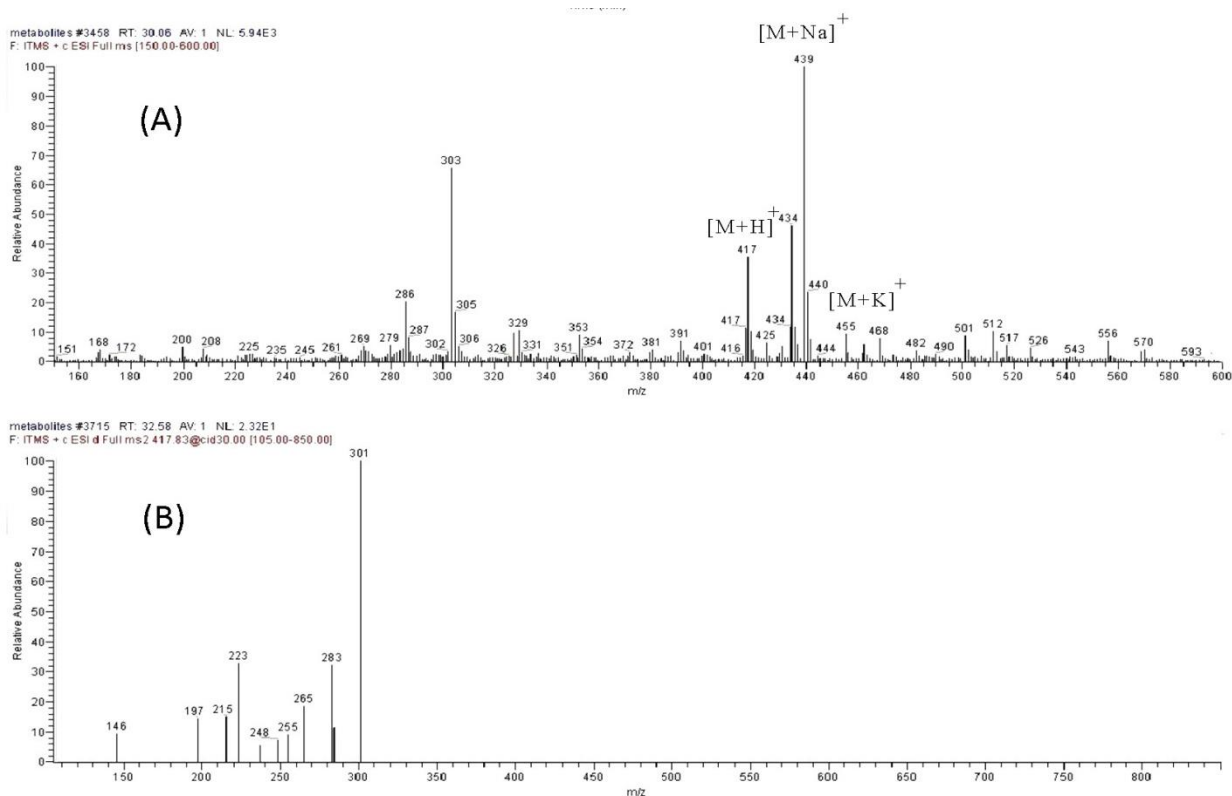
M-416 je identifikovan kao produkt simvastatina nastao dehidrogenacijom, sa jednom dvostrukom vezom više u odnosu na simvastatin. Ekstrahovani jonski hromatogrami za M-416 i maseni spektri prvog i drugog reda prikazani su na **Slici 34** i **Slici 35**.



Slika 34. Metabolit M-416 (A) Ekstrahovani hromatogram $[M+H]^+$ ($m/z=417$); (B) Ekstrahovani hromatogram $[M+Na]^+$ ($m/z=439$)

Retenciono vreme na kom izlazi M-416 iznosi 30,15 minuta. Molekulska masa određena je na osnovu masenog spektra prvog reda snimljenog u pozitivnom jonskom modu putem asignacije adukata molekula M-404 sa protonom (m/z 407, $C_{25}H_{36}O_5H^+$) i jonima alkalnih metala, natrijumom (m/z 439) i kalijumom (m/z 455).

Mehanizam fragmentacije uspostavljen je pomoću jonske zamke pri kolizionoj energiji od 30%. Dominantni fragmentni joni u masenom spektru drugog reda su m/z 301 ($C_{19}H_{24}O_3H^+$), m/z 283 ($C_{19}H_{22}O_2H^+$), m/z 265 ($C_{19}H_{20}OH^+$), m/z 223 ($C_{17}H_{18}H^+$) i 197 ($C_{15}H_{16}H^+$). Svi fragmentni joni su za 2 Da manji od odgovarajućih fragmenata u spektru simvastatina.

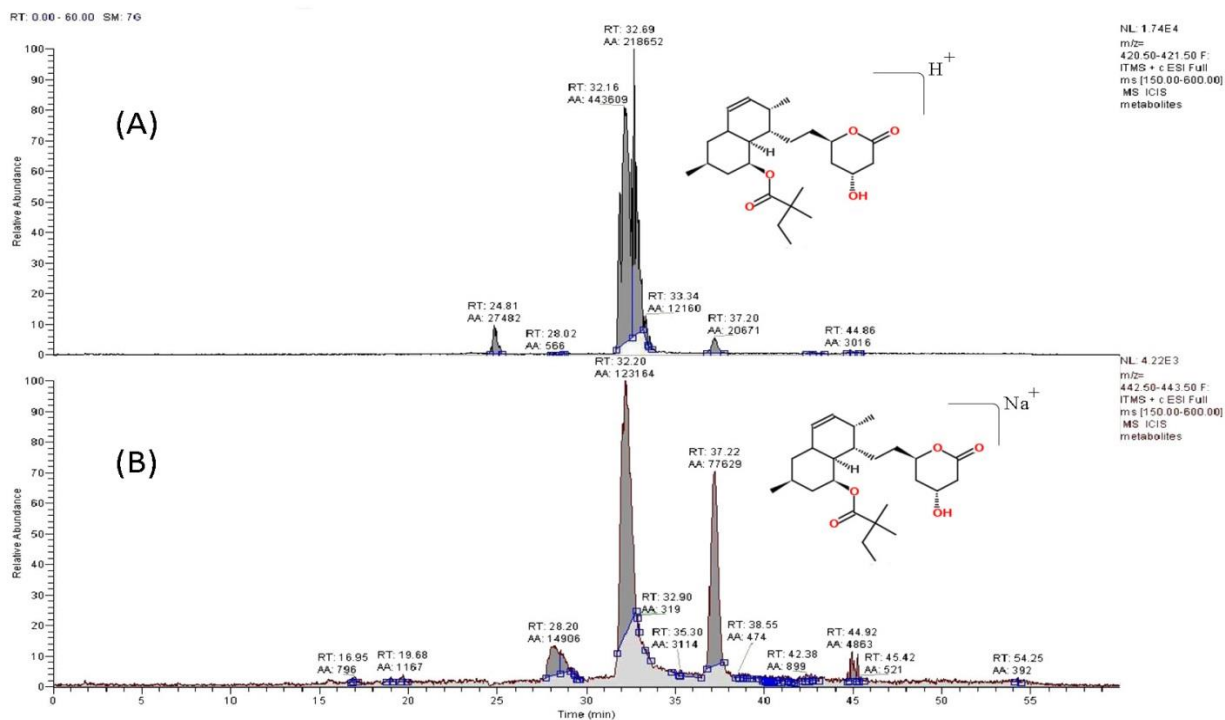


Slika 35. (A) MS¹ spektar metabolita M-416; (B) MS² spektar metabolita M-416

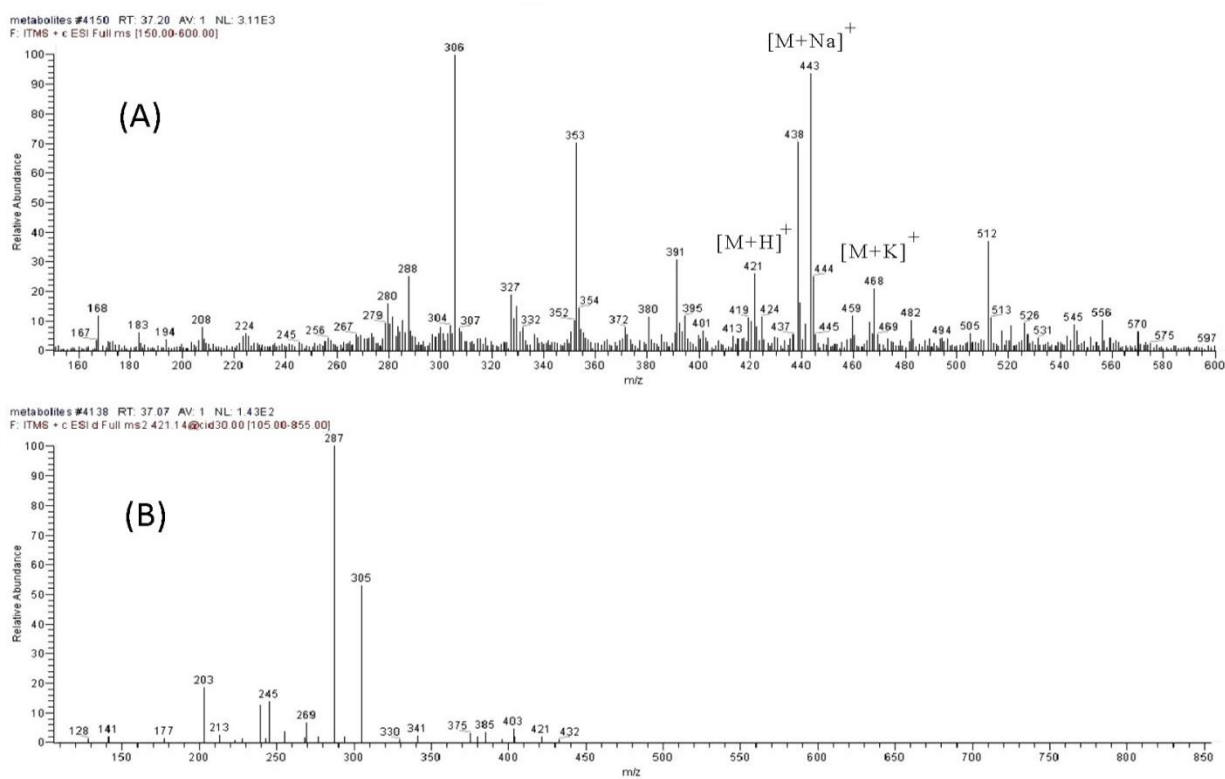
4.2.4.7. Metabolit M-420

Produkt M-420, odnosno dihidrosimvastatin, ima jednu dvostruku vezu manje u odnosu na molekul simvastatina. Na **Slici 36** i **Slici 37** predstavljeni su ekstrahovani jonski hromatogrami i maseni spektri prvog i drugog reda ovog metabolita.

Molekulska masa određena je na osnovu masenog spektra prvog reda snimljenog u pozitivnom modu, putem asignacije adukata molekula M-420 sa protonom (m/z 421, $C_{27}H_{40}O_5H^+$) i jonima alkalnih metala, natrijumom (m/z 443) i kalijumom (m/z 459). Retenciono vreme na kom se pojavljuje pik metabolita M-420 iznosi 37,22 min. Dominantni fragmentni joni u masenom spektru drugog reda pri kolizionoj energiji 30% su m/z 305 ($C_{19}H_{28}O_3H^+$), m/z 287 ($C_{19}H_{26}O_2H^+$), m/z 269 ($C_{19}H_{24}OH^+$), m/z 245 ($C_{17}H_{24}OH^+$) i svi su za 2 Da veći od odgovarajućih fragmenata u masenom spektru simvastatina.



Slika 36. Metabolit M-420 (A) Ekstrahovani hromatogram $[M+H]^+$ ($m/z=421$); (B) Ekstrahovani hromatogram $[M+Na]^+$ ($m/z=443$)

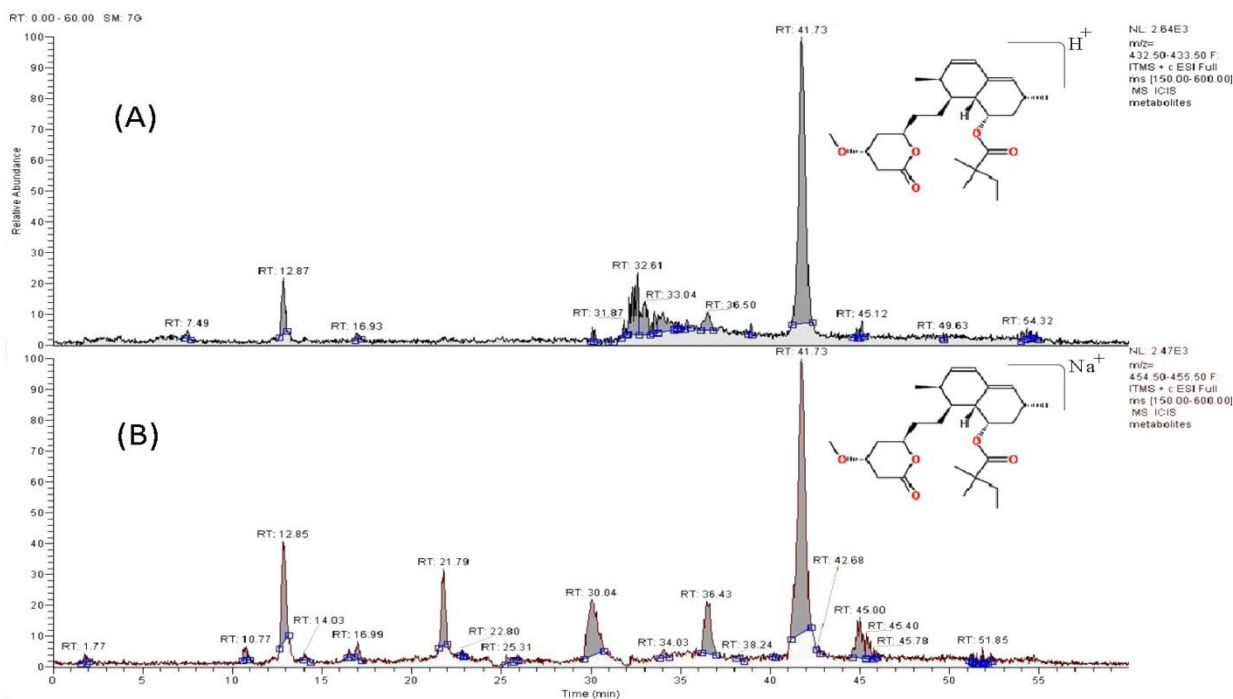


Slika 37. (A) MS^1 spektar metabolita M-420; (B) MS^2 spektar metabolita M-420

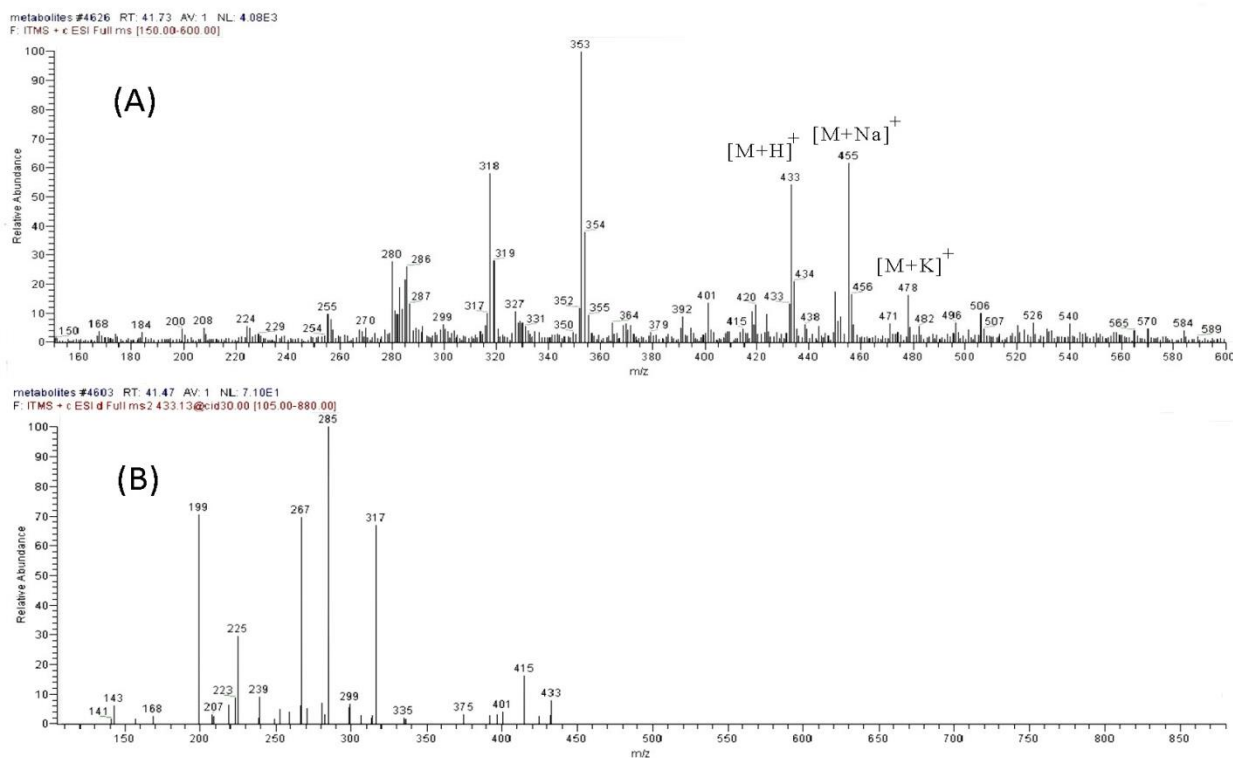
4.2.4.8. Metabolit M-432

Na osnovu molekulske mase koja je za 14 Da veća od molekulske mase simvastatina i načina fragmentacije, M-432 metabolit identifikovan je kao metil etar simvastatina. Ekstrahovani hromatogram i maseni spektri prvog i drugog reda prikazani su na **Slikama 38** i **39**.

Maseni spektar prvog reda metabolita M-432, sa retencionim vremenom od 41,73 minuta, pokazao je jak signal protonovanog molekuskog jona (m/z 433, $C_{26}H_{40}H_5H^+$) kao i adukata sa jonima alkalnih metala, natrijumom (m/z 455) i kalijumom (m/z 471). Na osnovu toga, utvrđeno je da je molekulska masa ispitivanog jedinjenja 432 Da. Maseni spektar drugog reda snimljen u pozitivnom jonskom modu pri kolizionoj energiji 30% karakteriše većina jona karakterističnih i za maseni spektar simvastatina. To su joni m/z 285 ($C_{19}H_{24}O_2H^+$), 267 ($C_{19}H_{22}OH^+$), 225 ($C_{17}H_{20}H^+$) i 199 ($C_{15}H_{18}H^+$). Prvi prelaz od molekuskog jona m/z 433 do fragmentnog jona m/z 317 ($C_{20}H_{28}O_3H^+$) odgovara neutralnom gubitku 2,2-dimetil butanske kiseline ($m/z=116$). Druga tranzicija m/z 317 do m/z 285 odgovara neutralnom gubitku metanola ($m/z=32$) na osnovu čega je predložena je molekulska struktura za ovog metabolita u vidu metil etra simvastatina.



Slika 38. Metabolit M-432 (A) Ekstrahovani hromatogram $[M+H]^+$ ($m/z=433$); (B) Ekstrahovani hromatogram $[M+Na]^+$ ($m/z=455$)

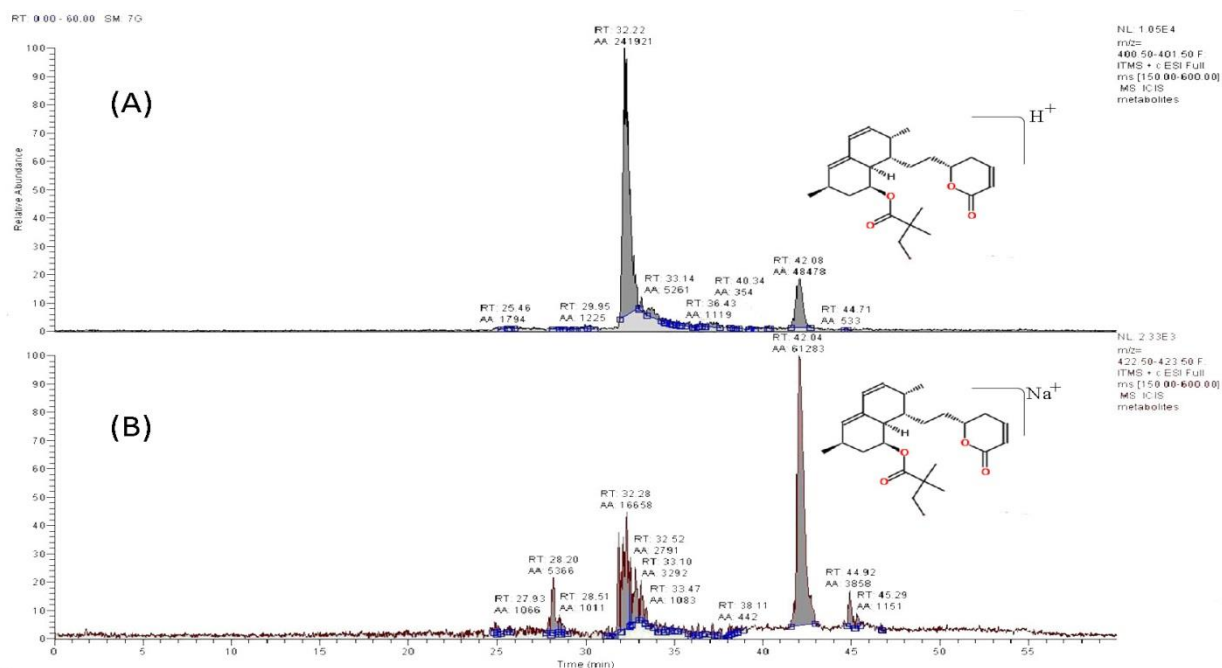


Slika 39. (A) MS¹ spektar metabolita M-432; (B) MS² spektar metabolita M-432

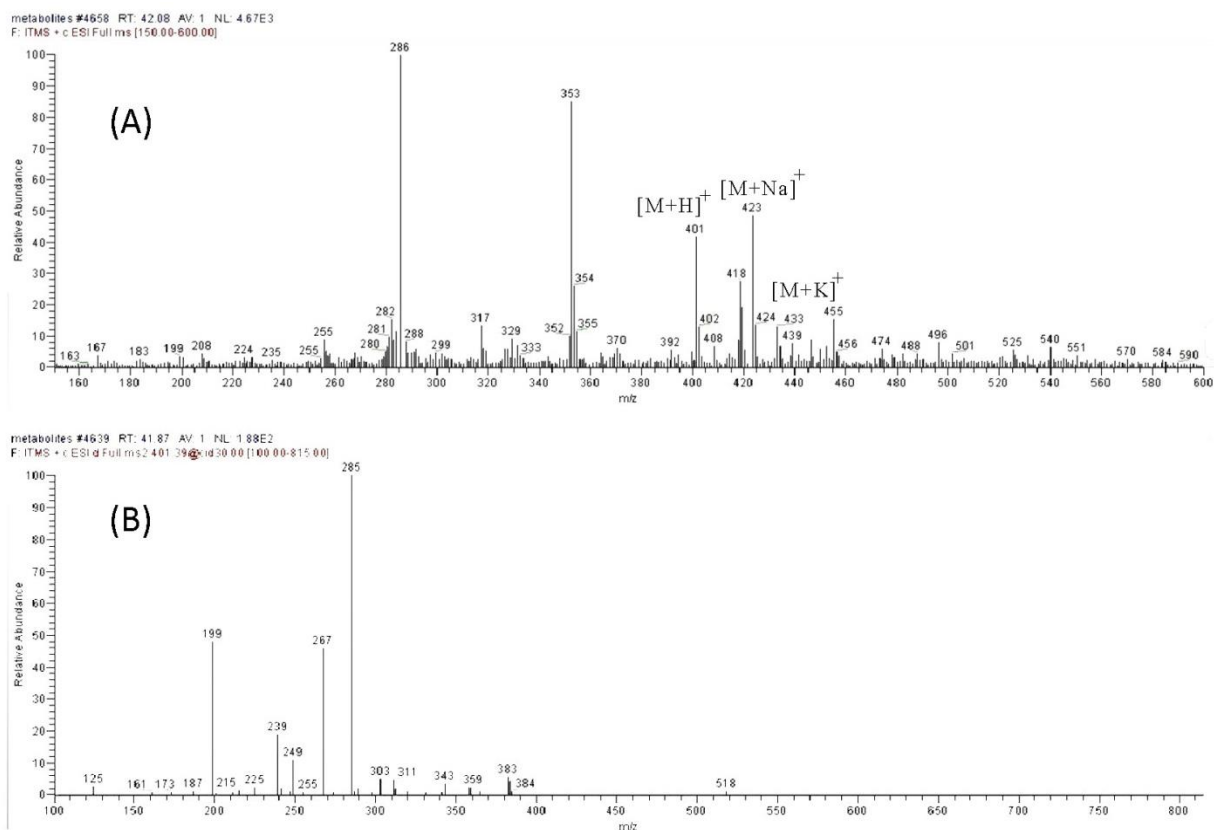
4.2.4.9. Metabolit M-400

M-400 je identifikovan kao dehidro proizvod simvastatina čiji su ekstrahovani hromatogram, kao i maseni spektri prvog i drugog reda predstavljeni na **Slikama 40** i **41**, redom.

Molekulska masa metabolita M-400 određena je na osnovu masenog spektra prvog reda u pozitivnom jonskom modu, gde se uočavaju adukti molekula M-400 sa protonom (m/z 401, C₂₅H₃₆O₄H⁺) i jonima alkalnih metala, natrijumom (m/z 423) i kalijumom (m/z 439). Maseni spektar ovog jedinjenja, dobijen u pozitivnom jonskom modu pri kolizionoj energiji 30%, karakteriše većina jona karakterističnih i za maseni spektar simvastatina. To su joni m/z 285 (C₁₉H₂₄O₂H⁺), 267 (C₁₉H₂₂OH⁺), 225 (C₁₇H₂₀H⁺) i 199 (C₁₅H₁₈H⁺). Najintenzivniji je fragmentni jon m/z 285 koji se uočava već i u masenom spektru prvog reda usled *in source* fragmentacije, a nastaje prilikom prvog prelaza od molekulskog jona m/z 401 gubitkom bočnog niza, odnosno 2,2-dimetil butanske kiseline (m/z=116).



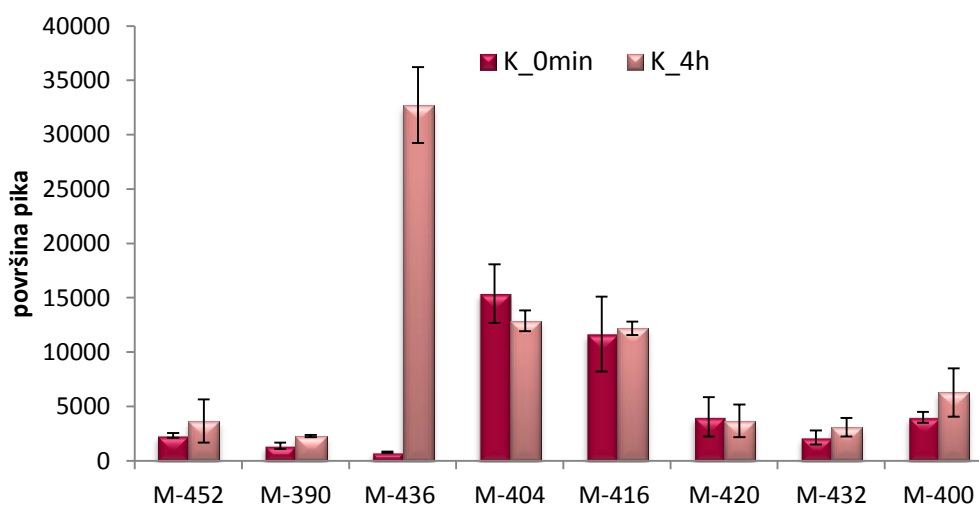
Slika 40. Metabolit M-400 (A) Ekstrahovani hromatogram $[M+H]^+$ ($m/z=401$); (B) Ekstrahovani hromatogram $[M+Na]^+$ ($m/z=423$)



Slika 41. (A) MS^1 spektar metabolita M-400; (B) MS^2 spektar metabolita M-400

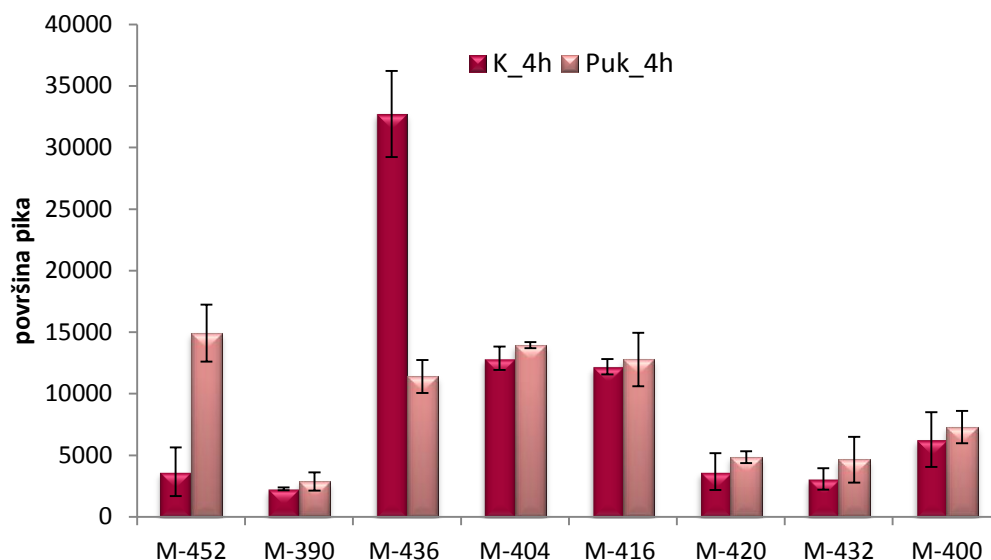
4.2.5. Uticaj probiotika na sadržaj metabolita simvastatina - seminkvantitativna analiza

Kako bi se utvrdilo da li nastanak metaboličkih produkata može da se očekuje kao posledica spontane degradacije simvastatina tokom vremena, analiziran je sadržaj metabolita simvastatina u kontrolnoj grupi u nultom minutu i nakon 4 sata inkubacije (**Grafikon 4**). Koncentracije jedinjenja su se održale prilično stabilnim u kontrolnoj grupi tokom vremena, odnosno nije bilo statistički značajnih razlika na početku i nakon 4 sata inkubacije. Jedina razlika uočena je kod metabolita M-436 čija se koncentracija značajno povećala nakon 4 časa.



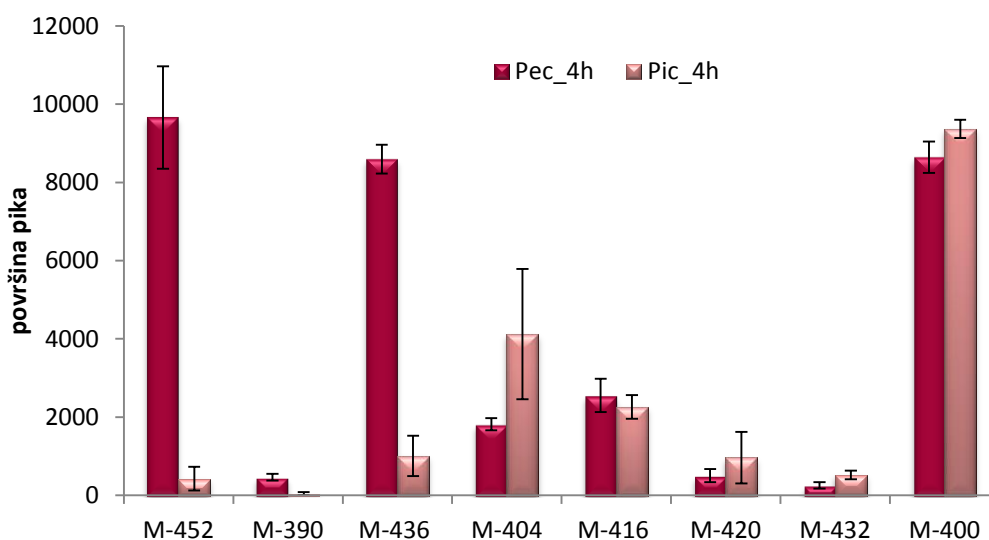
Grafikon 4. Sadržaj metaboličkih produkata simvastatina u kontrolnoj grupi u nultom minutu i nakon 4časa inkubacije

Na **Grafikonu 5** je predstavljen ukupan sadržaj identifikovanih metabolita simvastatina u kontrolnoj grupi i grupi sa probioticima (zbir ekstracelularnog i intracelularnog dela) nakon 4 časa inkubacije sa probioticima. U grupi inkubiranoj sa probioticima nakon 4 sata došlo je do statistički značajnog povećanja metabolita M-452 u poređenju sa kontrolnom grupom. Ostali metaboliti su takođe zabeležili porast ali ne u tolikoj meri tj. razlike u odnosu na kontrolnu grupu nisu bile na nivou statističke značajnosti. S druge strane, nakon četvoročasovne inkubacije, količina metabolita M-436 je bila statistički značajno veća u kontrolnoj grupi nego u grupi sa probioticima.



Grafikon 5. Sadržaj metabolita simvastatina u kontrolnoj grupi i grupi sa probioticima (zbir ekstracelularnog i intracelularnog) nakon 4 časa inkubacije

Na **Grafikonu 6** izvršeno je poređenje ekstracelularnog i intracelularnog sadržaja metabolita simvastatina nakon 4 sata inkubacije simvastatina sa probioticima. Koncentracije metabolita M-452, M-390 i M-436 su bile statistički značajno veće u ekstracelularnom prostoru, dok se metabolit M-404 akumulirao pretežno intracelularno. Ostali metaboliti simvastatina su u približno istim količinama zabeleženi i unutar i izvan ćelija.



Grafikon 6. Poređenje ekstracelularnog i intracelularnog sadržaja metabolita simvastatina u grupi sa probioticima nakon 4 časa inkubacije

4.2.6. Računarsko modelovanje: molekularni deskriptori u predikciji farmakokinetičkih osobina identifikovanih metabolita simvastatina

Softverske tehnike koje izračunavaju numeričke karakteristike molekula, tzv. molekularni deskriptori, mogu biti u velikoj meri od pomoći u predikciji njihove apsorpcije i permeabilnosti. *In silico* vrednosti deskriptora koji figurišu u pravilu Lipinskog (**Tabela 4**) dobijeni su primenom softverskog paketa Molinspiration.

Tabela 4. Vrednosti deskriptora koji figurišu u pravilu Lipinskog

Supstanca	logP	M _w	HBA	HBD	Nviolat
M-452 ver1	3,01	452,59	7	4	0
M-452 ver2	4,11	452,59	7	4	0
M-452 ver3	2,95	452,59	7	4	0
M-390 ver1	3,84	390,52	5	1	0
M-390 ver2	3,85	390,52	5	1	0
M-436	3,96	436,59	6	3	0
M-404	4,34	404,55	5	1	0
M-416	4,52	416,56	5	1	0
SV	4,76	418,57	5	1	0
M-420	5,26	420,59	5	1	1
M-432	5,37	432,6	5	0	1
M-400	5,96	400,56	4	0	1

logP - particioni koeficijent; M_w - molekularna masa; HBA - broj akceptora vodoničnih veza; HBD - broj donora vodoničnih veza; Nviolat - broj odstupanja od pravila

LogP za ispitivana jedinjenja kreće se u opsegu 2,95 za M-452 do 5,96 za M-400. Molekularne mase su u granici od 390,52 za M-390 do 452,29 kod metabolita M-452. Zbir donora i akceptora vodoničnih veza se kreće od 4 kod M-400 do 11 kod M-452. Na osnovu izračunatih parametara zaključeno je da ni jedno od identifikovanih metabolita ne krši više od jednog pravila Lipinskog. Jedina odstupanja uočena su u pogledu logP kod metabolita M-420, M-432 i M-400, s obzirom da prelazi vrednost 5.

Farmakokinetički parametri i deskriptori vezani za polarnost identifikovanih metabolita simvastatina izračunati su u programu VolSurf+ nakon optimizacije struktura semiempirijskom AM1 metodom. Vrednosti deskriptora prikazane su u **Tabeli 5**.

Tabela 5. Molekulski deskriptori dobijeni primenom softverskog paketa VolSurf+

	SOLY	PSA	HSA	PSAR	PHSAR	logP	LgD _{7,5}	PB	VD	CACO2	MetStab
M-452a	-4,66	124,29	503,54	0,20	0,25	4,11	1,29	48,31	-0,31	-0,64	82,22
M-452b	-4,09	124,29	475,08	0,21	0,26	3,69	0,87	52,05	-0,28	-0,68	91,57
M-452c	-4,70	124,29	503,77	0,20	0,25	4,57	1,43	64,43	-0,34	-0,54	77,55
M-390a	-4,67	72,83	516,08	0,12	0,14	3,89	3,89	67,45	0,06	0,88	33,14
M-390b	-4,82	72,83	529,55	0,12	0,14	4,19	4,19	68,11	0,06	0,88	31,09
M-436	-4,73	104,06	524,14	0,17	0,20	4,88	2,06	72,53	-0,35	-0,11	66,08
M-404	-5,04	72,83	540,21	0,12	0,13	4,38	4,38	71,82	0,11	0,93	26,89
M-416	-5,06	72,83	521,79	0,12	0,14	4,63	4,63	80,20	0,14	0,94	26,16
SV	-5,22	72,83	508,50	0,12	0,14	5,02	5,02	82,95	0,14	0,96	24,22
M-420	-5,37	72,83	527,24	0,12	0,14	5,60	5,60	80,70	0,20	1,13	18,85
M-432	-5,53	65,13	554,39	0,10	0,12	5,47	5,47	83,99	0,04	1,28	10,28
M-400	-5,61	52,6	516,71	0,09	0,10	6,06	6,06	90,48	0,09	1,46	8,70

SOLY - intrinzička rastvorljivost (eng. *Intrinsic solubility*); PSA - polarna površina molekula (eng. *Polar Surface Area*); HSA - hidrofobna površina molekula (eng. *Hydrophobic Surface Area*); PSAR (odnos između polarne površine molekula i ukupne površine molekula); PHSAR (odnos između polarne površine molekula i hidrofobne površine molekula); logP - particioni koeficijent; logD_{7,5} - distribicioni koeficijent na pH 7,5; PB - % vezivanja za proteine plazme (eng. *Protein Binding*); VD - volumen distribucije (eng. *Volume of Distribution*) predstavljen kao negativna logaritamska vrednost u L/kg, CACO2 - permeabilnost kroz Caco-2 ćelije; MetStab - metabolička stabilnost definisana kao procenat leka koji ostaje nepromenjen nakon inkubacije sa humanim CYP3A4 enzimom. Vrednosti preko 50 ukazuju na stabilno ponašanje.

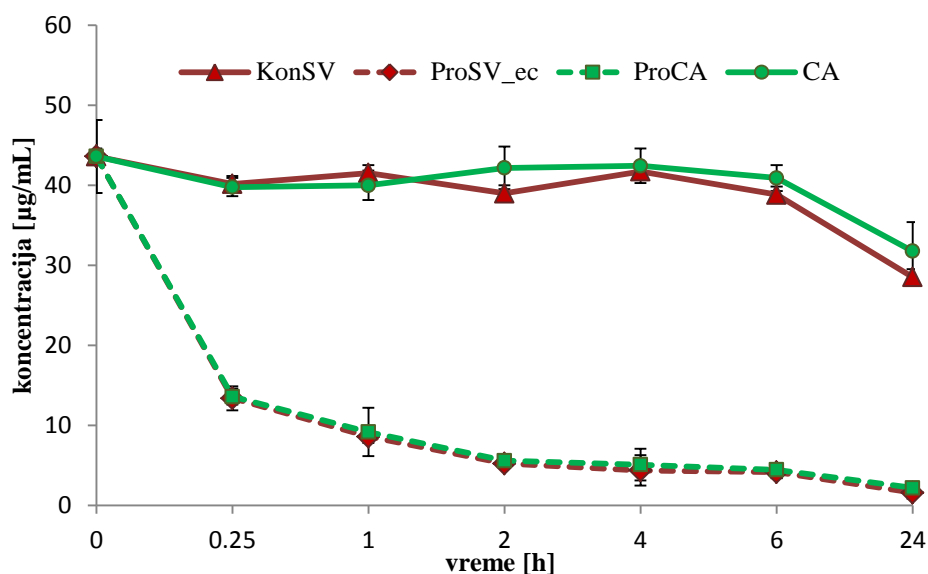
Najveću vrednost PSA pokazalo je jedinjenje M-452 (124,29 Å²), a potom sledi M-436 sa PSA 104,06 Å². Ostala jedinjenja imaju PSA sličnu kao simvastatin (oko 70 Å²), dok najnižu vrednost ima jedinjenje M-400 (52,6 Å²). HSA je bila u opsegu 475,08 Å² za M-452 do 554,39 Å² za M-432. Najveće PSAR i PHSAR vrednosti utvrđene su za jedinjenje M-452, a najmanje za M-400. LogP i logD_{7,4} su takođe imale najniže vrednosti za M-452, a najveće za M-400.

Posmatrajući farmakokinetske parametre, primećuje se da jedinjenja M-452, M-436, M-390 i M-404 pokazuju manji stepen vezivanja za proteine plazme u odnosu na simvastatin. S druge strane, jedinjenja M-416, M-420 i M-432 imaju približno slične vrednosti vezivanja za proteine plazme kao simvastatin (oko 80%), dok se u slučaju metabolita M-400 ova vrednost kreće do 90%. Najmanji volumen distribucije uočen je kod metabolita M-452 i M-436, dok najveći ima jedinjenje M-420. Posmatrajući prolazak kroz Caco-2 ćelije, predviđene vrednosti su najmanje za metabolite M-452 i M-436, dok su najveće za M-432 i M-404. U

pogledu metaboličke stabilnosti koja je definisana kao procenat leka koji ostaje nepromenjen nakon inkubacije sa humanim CYP3A4 enzimom, jedinjenja M-452 i M-436 pokazala su daleko bolje rezultate od ostalih ispitivanih jedinjenja, uključujući i simvastatin, za koji je izračunata metabolička stabilnost 24,22 % .

4.3. Uticaj žučnih kiselina na prodor simvastatina u probiotske bakterije

Na **Grafikonima 7, 8 i 9** prikazan je uticaj ispitivanih žučnih kiselina (CA, 12-MKC i DCA) na koncentracije simvastatina u ekstracelularnom sadržaju tokom dvadesetčetvoročasovne inkubacije sa probioticima u poređenju sa kontrolom (bez probiotika).

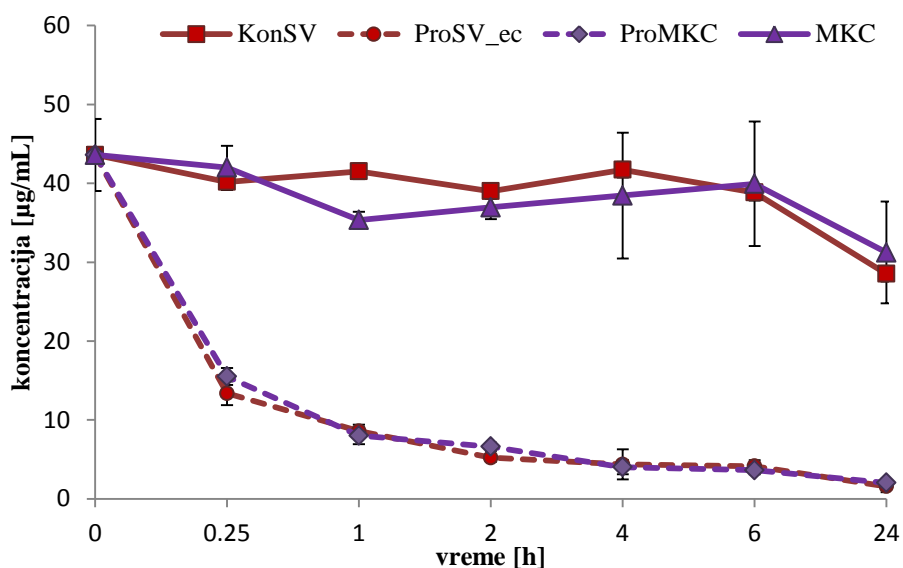


Grafikon 7. Uticaj holne kiseline (CA) na koncentraciju simvastatina u ekstracelularnom sadržaju tokom dvadeset četvoročasovne inkubacije sa probioticima u poređenju sa kontrolom (bez probiotika)

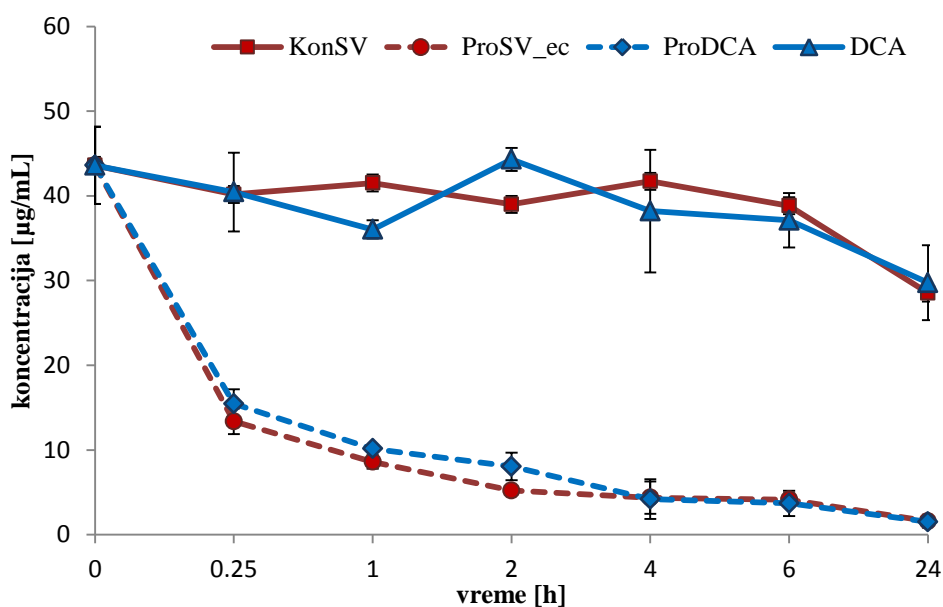
Može se primetiti da CA nije dovela do promene prolaska simvastatina u probiotske bakterije tokom dvadesetčetvoročasovne inkubacije. Kontrolna grupa bez probiotika koja je predstavljala rastvor simvastatina u PBS puferu, uz dodatak CA, nije pokazala statistički značajne razlike u koncentracijama simvastatina u odnosu na kontrolnu grupu bez CA ukazujući na to da CA sama po sebi nije dovela do spontane degradacije simvastatina.

Sa **Grafikona 8** se uočava da ni 12-MKC nije dovela do statistički značajne modifikacije transporta simvastatina u probiotske bakterije. Nešto veće koncentracije simvastatina u ekstracelularnom sadržaju uočene su u petnaestom minutu i drugom času u grupi sa probioticima i 12-MKC u odnosu na grupu bez 12-MKC. Koncentracije simvastatina u kontrolnoj grupi, koja je predstavljala rastvor simvastatina u PBS puferu, uz dodatak 12-MKC, ali bez probiotskih bakterija, nakon 24 časa nisu se statistički značajno razlikovale u

odnosu na koncentracije simvastatina u kontrolnoj grupi bez 12-MKC, na osnovu čega se može zaključiti da 12-MKC nije ubrzala spontanu degradaciju simvastatina.



Grafikon 8. Uticaj 12-monoketoholne kiseline (12-MKC) na koncentraciju simvastatina u ekstracelularnom sadržaju tokom dvadeset četvoročasovne inkubacije sa probioticima u poređenju sa kontrolom (bez probiotika)



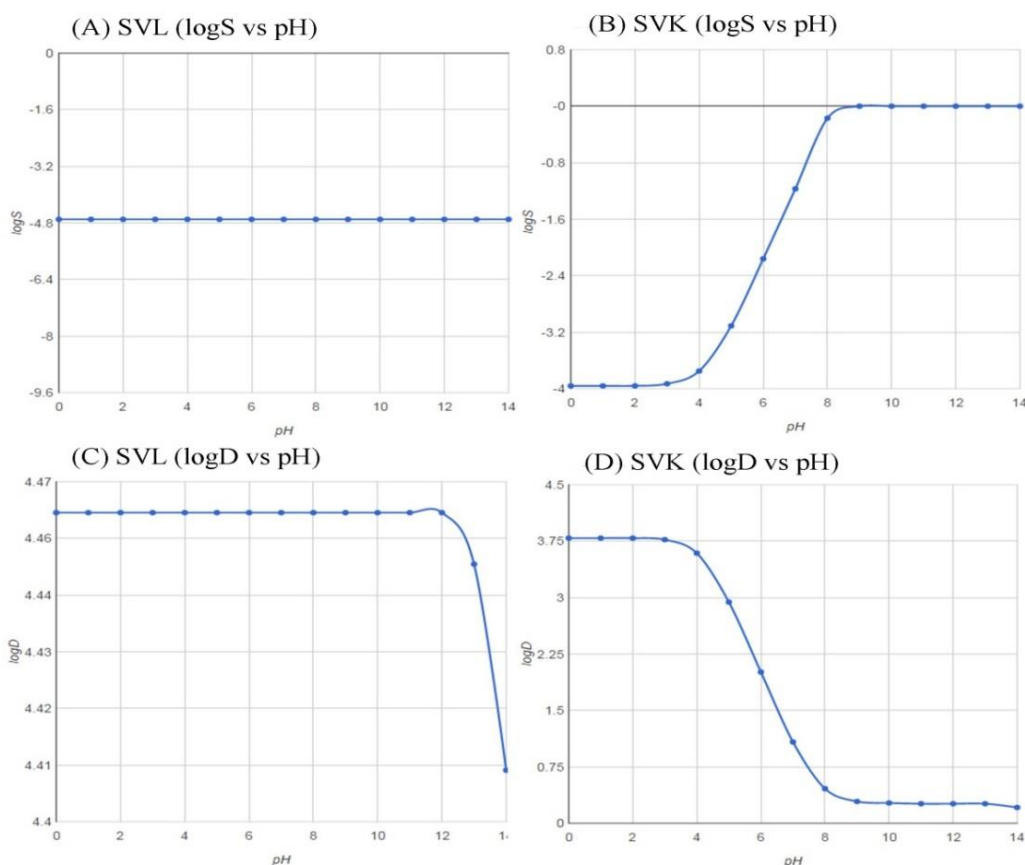
Grafikon 9. Uticaj deoksiholne kiseline (DCA) na koncentraciju simvastatina u ekstracelularnom sadržaju tokom dvadesetčetvoročasovne inkubacije sa probioticima u poređenju sa kontrolom (bez probiotika)

DCA takođe nije statistički značajno uticala na prolazak simvastatina u probiotske bakterije tokom dvadesetčetvoročasovne inkubacije (**Grafikon 9**). Ipak, može se uočiti da tokom prva dva sata postoje nešto veće koncentracije simvastatina u ekstracelularnom sadržaju kod grupe sa probioticima i DCA u odnosu na grupu sa probioticima bez DCA, iako ove razlike nisu statistički značajne. U kontrolnoj grupi bez probiotika koja je predstavljala rastvor simvastatina u PBS puferu, uz dodatak DCA, nakon 24 časa nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentraciji simvastatina u odnosu na kontrolnu grupu bez DCA, ukazujući na to da ni DCA sama po sebi nije uticala na spontanu degradaciju simvastatina.

4.4. Uticaj soli žučnih kiselina na distribicioni koeficijent simvastatina

Postojanje potencijalnih fizičko-hemijskih interakcija između simvastatina i ispitivanih natrijumovih soli žučnih kiselina izvršeno je ispitivanjem promene distribucionog koeficijenta SVL i SVK pod uticajem soli žučnih kiselina u sistemu n-oktanol/pufer na dve različite pH vrednosti (pH 5 i pH 7,4). S obzirom na to da je $\log D$ parametar koji se najčešće koristi u literaturi kako bi se opisao relativni afinitet supstance za polarnu odnosno nepolarnu fazu, radi lakšeg poređenja rezultata računate su $\log D$ vrednosti za SVL i SVK.

Efekti pH na rastvorljivost ($\log S$) i $\log D$ vrednosti SVL i SVK određeni su u programu Chemaxon, dostupnom *online* (<https://chemaxon.com>) i predstavljeni su na **Grafikonu 10**. Budući da su eksperimenti vršeni na pH 5 i pH 7,4, ove vrednosti su nam bile od posebnog interesa. Kao što se može primetiti, promena pH gotovo da nema uticaja na $\log S$ i $\log D$ vrednosti SVL. S druge strane, u slučaju SVK na posmatranim pH postoje značajne promene ovih vrednosti.

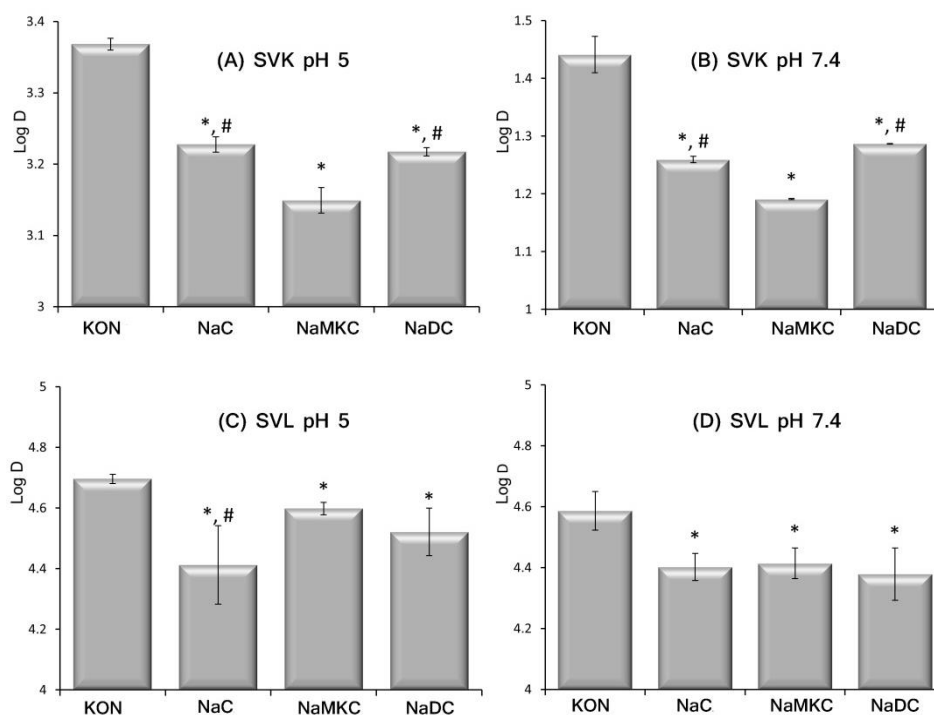


Grafikon 10. Uticaj pH vrednosti na rastvorljivost ($\log S$) i distribicioni koeficijent ($\log D$) SVL i SVK

Eksperimentalno određene vrednosti distribucionih koeficijenata za SVK i SVL na pH 5 i pH 7,4 date su u **Tabeli 6**. Predstavljene su i vrednosti distribucionih koeficijenata po dodatku soli žučnih kiselina (NaC, NaMKC, NaDC). Na **Grafikonu 11** prikazane su srednje vrednosti logD koje predstavljaju rezultat tri merenja sa standardnim devijacijama.

Tabela 6. Eksperimentalno određene vrednosti površina ispod krive, jednačine kalibracionih krivi, koncentracije u vodenoj fazi nakon postizanja ravnotežnog stanja, distribicioni koeficijenti i logD vrednosti SVK (A) i SVL (B) na pH 5 i pH 7,4 sa i bez dodatka soli žučnih kiselina (kontrola). Sve vrednosti su izražene kao srednje vrednosti tri merenja \pm SD

(A)					
	AUC	Linearnost R ² vrednost	Koncentracija (μ g/mL)	Distribicioni koeficijent (D)	LogD
SVK pH 5					
KON	2,5257 \pm 0,0483	y=0,8712x- 0,0182 R ² =0,9985	2,9200 \pm 0,0555	2335,9 \pm 44,2	3,37 \pm 0,01
NaC	3,4943 \pm 0,0855		4,0318 \pm 0,0982	1689,3 \pm 41,1	3,23 \pm 0,01
NaMKC	4,1862 \pm 0,1732		4,8259 \pm 0,1988	1410,7 \pm 58,1	3,15 \pm 0,02
NaDC	3,5767 \pm 0,0478		4,1264 \pm 0,0548	1649,9 \pm 21,9	3,22 \pm 0,00
SVK pH 7,4					
KON	20,313 \pm 1,093	y=1,4685x- 0,4038 R ² =0,999	14,108 \pm 0,744	27,66 \pm 2,04	1,44 \pm 0,03
NaC	27,241 \pm 0,227		18,826 \pm 0,155	18,17 \pm 0,23	1,26 \pm 0,01
NaMKC	30,114 \pm 0,050		20,781 \pm 0,034	15,52 \pm 0,04	1,19 \pm 0,00
NaDC	26,129 \pm 0,252		18,068 \pm 0,017	19,35 \pm 0,03	1,29 \pm 0,00
(B)					
	AUC	Linearnost R ² vrednost	Koncentracija (μ g/mL)	Distribicioni koeficijent (D)	LogD
SVL pH 5					
KON	0,0445 \pm 0,0030	y=0,8665x- 0,0428 R ² =0,9913	0,1008 \pm 0,0035	49657,6 \pm 1730,7	4,70 \pm 0,01
NaC	0,109 \pm 0,0203		0,1752 \pm 0,0234	28894,1 \pm 4088,1	4,46 \pm 0,06
NaMKC	0,0667 \pm 0,0051		0,1263 \pm 0,0059	39638,2 \pm 1869,7	4,60 \pm 0,02
NaDC	0,0893 \pm 0,0248		0,1524 \pm 0,0286	33508,9 \pm 5711,1	4,52 \pm 0,08
SVL 7,4					
KON	0,0849 \pm 0,0195	y=0,7658x-0,0549 R ² =0,9924	0,1826 \pm 0,0254	38861,8 \pm 5879,7	4,59 \pm 0,06
NaC	0,1583 \pm 0,0218		0,2784 \pm 0,0284	25313,0 \pm 2584,5	4,40 \pm 0,04
NaMKC	0,1527 \pm 0,0233		0,271 \pm 0,0305	26046,6 \pm 3081,7	4,41 \pm 0,05
NaDC	0,1721 \pm 0,0423		0,2965 \pm 0,0552	24220,9 \pm 4993,4	4,38 \pm 0,09



Grafikon 11. Uticaj NaC, NaMKC i NaDC na logD vrednosti SVK i SVL na pH 5 i pH 7,4. Sve vrednosti su izražene kao srednje vrednosti tri merenja \pm SD (* $p < 0,05$ prema kontroli, # $p < 0,05$ prema NaMKC)

4.4.1. Uticaj soli žučnih kiselina na distribicioni koeficijent simvastatinske kiseline

Kao što se vidi iz **Tabele 6 (A)** i na **Grafikonu 11 (A)** i **(B)**, sve tri ispitivane soli žučnih kiselina su na obe posmatrane pH vrednosti statistički značajno smanjile logD vrednost SVK. Najveći uticaj je imala NaMKC koja je dovela do smanjenja logD vrednosti SVK sa $3,37 \pm 0,01$ na $3,15 \pm 0,02$ na pH 5, i sa $1,44 \pm 0,03$ na $1,19 \pm 0,00$ na pH 7,4. NaC i NaDC su takođe dovele do statistički značajnog smanjenja distribucionog koeficijenta SVK, mada ne u tolikom stepenu kao NaMKC.

Poredeći efekte ispitivanih soli žučnih kiselina međusobno, uočeno je da je smanjenje logD vrednosti SVK rezultovano dodatkom NaMKC bilo statistički značajno veće od smanjenja putem druge dve ispitivane žučne kiseline na obe ispitivane pH vrednosti. S druge strane, nije bilo statistički značajnih razlika između uticaja NaC i NaDC.

4.4.2. Uticaj soli žučnih kiselina na distribicioni koeficijent simvastatin laktona

Efekte NaC, NaMKC i NaDC na distribicioni koeficijent SVL na pH 5 i pH 7,4 predstavljeni su u **Tabeli 6 (B)** i na **Grafikonu 11 (C)** i **(D)**. Sve tri ispitivane soli žučnih

kiselina dovele su do statistički značajnog smanjenja distribucionog koeficijenta SVL. Za razliku od uticaja na SVK, u ovom slučaju nije bilo statistički značajnih razlika između pojedinih soli žučnih kiselina. Jedina statistički značajna razlika uočena je između NaC i NaMKC na pH 5, gde je NaC pokazala jači uticaj, odnosno dovela je do većeg smanjenja logD vrednosti od NaMKC.

4.4.3. Kompleksacija simvastatina i žučnih kiselina

Molekulska mehanički proračuni (MM2) služili su za procenu interakcija između žučnih kiselina sa SVL i SVK koristeći optimizovane trodimenzionalne strukture kompleksa. Ukupne energije kompleksa, kao sume energije istezanja, savijanja, energije istezanja-savijanja, uvijanja, 1,4 VDW energije, ne-1,4 VDW energije i dipol-dipol energije su prikazane u **Tabeli 7**.

Tabela 7. Energije optimizovanih struktura kompleksa SVK i SVL sa žučnim kiselinama

	SVK-CA	SVK-MKC	SVK-DCA	SVL-CA	SVL-MKC	SVL-DCA
Energija istezanja	7,229	7,649	7,058	7,187	7,057	7,379
Energija savijanja	26,208	25,401	24,849	31,323	29,725	32,861
Energija istezanja-savijanja	1,828	1,965	1,778	2,011	1,923	1,981
Energija uvijanja	22,757	24,639	20,495	19,877	23,796	21,900
Ne-1,4 VDW sile	-27,181	-23,825	-34,686	-26,197	-24,650	-29,626
1,4 VDW sile	44,205	43,535	43,319	46,128	46,957	46,381
Dipol/Dipol energija	1,215	-1,546	0,428	8,039	4,498	4,832
Ukupna energija [kcal/mol]	76,263	77,817	63,242	88,369	89,306	85,709

Ukupne energije optimizovanih kompleksa žučnih kiselina sa SVL su bile prilično slične, u opsegu od 85,71 kcal/mol do 89,31 kcal/mol. Odgovarajuće energije kompleksa sa SVK kretale su se od 63,24 kcal/mol do 77,82 kcal/mol. Na osnovu izračunatih vrednosti pojedinačnih energija, može se zaključiti da najveći doprinos stabilizaciji kompleksa imaju ne-1,4 VDW sile sa vrednostima u opsegu od -29,64 kcal/mol do -24,65 kcal/mol za komplekse sa SVL, kao i od -34,69 kcal/mol do -23,83 kcal/mol za komplekse sa SVK.

Izračunate Konolijeve površine analiziranih jedinjenja i njihovih kompleksa sa žučnim kiselinama su predstavljene u **Tabeli 8**.

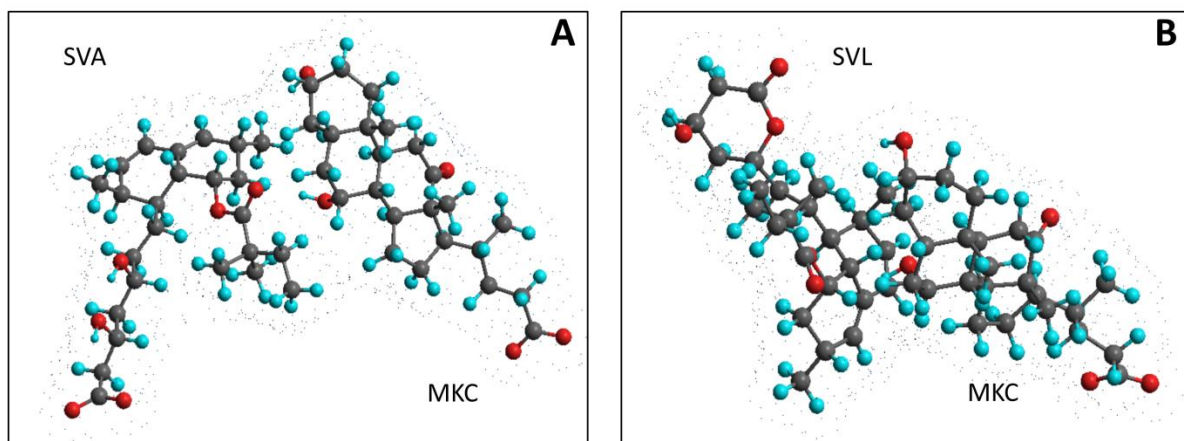
Tabela 8. Konolijeve površine analiziranih jedinjenja i njihovih kompleksa

	SAS [Å ²]	MS [Å ²]	SEV [Å ³]
SVK	695,92	407,01	422,25
SVK-MKC	1116,01	709,62	835,49
SVK-CA	1073,03	686,47	844,56
SVK-DCA	986,12	636,95	830,31
SVL	671,96	396,69	412,73
SVL-MKC	1091,48	703,97	841,89
SVL-CA	1092,57	692,41	823,22
SVL-DCA	950,31	614,43	838,48

SAS - Solvent Accessible Surface Area, MS - Molecular Surface Area i SEV - Solvent-Excluded Volume

Svi ispitivani kompleksi imali su značajno veće vrednosti ovih parametara u poređenju sa samim lekom, bez žučne kiseline. Vrednosti SAS za ispitivane komplekse kretale su se u opsegu 950,31 Å² za kompleks SVL-DCA do 1116,01 Å² za SVL-MKC, u poređenju sa samim lekom gde je iznosila 695,92 Å² za SVK, odnosno 671,96 Å² za SVL. Slična situacija uočena je i kod parametra MS. Dok je kod SVL i SVK, vrednost MS iznosila 396,69 i 407,01 Å², za komplekse se ta vrednost kretala u granicama od 614,43 Å² za kompleks SVL-DCA do 709,62 Å² kod SVL-MKC. SEV je takođe pokazao značajno niže vrednosti kod SVL i SVK (412,73 Å³ i 422,25 Å³, redom), u odnosu na komplekse kod kojih je vrednost SEV bila u opsegu 823,22 Å³ do 844,56 Å³. Posmatrajući SEV vrednosti, može se uočiti da su razlike među kompleksima sa različitim žučnim kiselinama bile manje izražene nego u slučajevima parametara SAS i MS.

Optimizovane strukture kompleksa SVK-MKC i SVL-MKC, sa minimalnim sadržajem potencijalne energije predstavljene su na **Slici 42**. Kao što se može uočiti, između molekula su ostvarene hidrofobne interakcije, dok su hidroksilne i keto grupe orijentisane ka spoljašnjoj strani kompleksa.



Slika 42. Optimizovani kompleksi SVK-MKC (A) i SVL-MKC (B)

4.5. Doking studija ispitivanja interakcija simvastatina i žučnih kiselina sa probiotskim bakterijama na nivou transportera

U cilju ispitivanja potencijalnih interakcija simvastatina sa žučnim kiselinama na nivou transportnih proteina probiotskih bakterija vršene su docking studije, pri čemu su računate i poredene energije vezivanja simvastatina, CA, 12-MKC i DCA prema *multidrug* transportnim proteinima prisutnim kod *Lactobacillus acidophilus* NCFM (LA) i *Bifidobacterium longum* NCC2705 (BL).

4.5.1. Transporteri

Podaci o broju i klasifikaciji svih membranskih transportnih proteina kod LA i BL, dobijeni iz baze podataka *TransportDB*, predstavljeni su u **Tabeli 9**.

Tabela 9. Broj i klasifikacija membranskih transportnih proteina kod *Lactobacillus acidophilus* NCFM i *Bifidobacterium longum* NCC2705

Tip transportera	L. acidophilus NCFM		B. longum NCC2705	
	broj	procenat	broj	procenat
ATP-zavisni	61	36,1%	62	44%
Jonski kanali	7	4,1%	7	5%
Sistem fosfotransferaza	23	13,6%	3	2,1%
Sekundarni transporteri	77	45,6%	68	48,2%
Ukupni transportni proteini	169	100%	141	100%

Ukupan broj transportera kod ispitivanih probiotskih bakterija iznosi 169 kod LA i 141 kod BL. Kao što se uočava, najveći procenat transportera kod obe vrste pripada sekundarnim transporterima, dok su sledeći po zastupljenosti su ATP zavisni transporteri.

Broj transportnih proteina koji kao supstrat imaju lek iznosi 20 za BL (6 ABC i 14 sekundarnih transportera) i 30 za LA (14 ABC i 16 sekundarnih transportera) (**Tabela 9**). Svi analizirani transportni proteini, grupa kojoj pripadaju, mogući supstrati i dodeljeni c-skor pouzdanosti dobijen preko *I-TASSER* servera, prikazani su u **Tabelama 10 i 11**. U poslednjoj koloni su označeni transportni proteini koji su na osnovu vrednosti c-skora odabrani za dalju analizu docking studijama, kao i oni koji nisu ispunili predložene kriterijume.

Tabela 10. Analizirani transportni proteini kod bakterije *Lactobacillus acidophilus* NCFM - grupa kojoj pripadaju, mogući supstrati, dodeljeni skor pouzdanosti dobijen preko I-TASSER servera i odabir za dalju doking analizu

Transportni protein	Tip	Mogući supstrat	C-skor I-TASSER	Doking studija
LBA0246	ATP-zavisni	multidrug	-0,39	✓
LBA0247	ATP-zavisni	multidrug	-2,43	✗
LBA0574	ATP-zavisni	multidrug	1,9	✓
LBA0575	ATP-zavisni	multidrug	1,46	✓
LBA0594	ATP-zavisni	multidrug	0,86	✓
LBA0597	ATP-zavisni	multidrug	0,98	✓
LBA1188	ATP-zavisni	multidrug	0,93	✓
LBA1276	ATP-zavisni	multidrug	1,52	✓
LBA1277	ATP-zavisni	multidrug	1,55	✓
LBA1657	ATP-zavisni	multidrug	1,11	✓
LBA1821	ATP-zavisni	multidrug	0,77	✓
LBA1822	ATP-zavisni	multidrug	1,93	✓
LBA1876	ATP-zavisni	multidrug	-0,14	✓
LBA1933	ATP-zavisni	multidrug	1,26	✓
LBA1884	sekundarni DMT	lek/metabolit	-2,68	✗
LBA1885	sekundarni DMT	lek/metabolit	-2,54	✗
LBA1887	sekundarni DMT	lek/metabolit	-1,67	✗
LBA0164	sekundarni MFS	multidrug efluks	0,37	✓
LBA0251	sekundarni MFS	multidrug efluks	0,81	✓
LBA0252	sekundarni MFS	multidrug efluks	-1,32	✓
LBA0552	sekundarni MFS	multidrug efluks	-1,05	✓
LBA0566	sekundarni MFS	multidrug efluks	-1,20	✓
LBA0567	sekundarni MFS	multidrug efluks	1,15	✓
LBA0753	sekundarni MFS	multidrug efluks	-0,38	✓
LBA1429	sekundarni MFS	multidrug efluks	0,90	✓
LBA1446	sekundarni MFS	multidrug efluks	-0,58	✓
LBA1471	sekundarni MFS	multidrug efluks	0,62	✓
LBA1621	sekundarni MFS	multidrug efluks	-0,97	✓
LBA1853	sekundarni MFS	multidrug efluks	0,49	✓
LBA1854	sekundarni MFS	multidrug efluks	-0,91	✓

Tabela 11. Analizirani transportni proteini kod bakterije *Bifidobacterium longum* NCC2705 - grupa kojoj pripadaju, mogući supstrati, dodeljeni skor pouzdanosti dobijen preko I-TASSER servera i odabir za dalju doking analizu

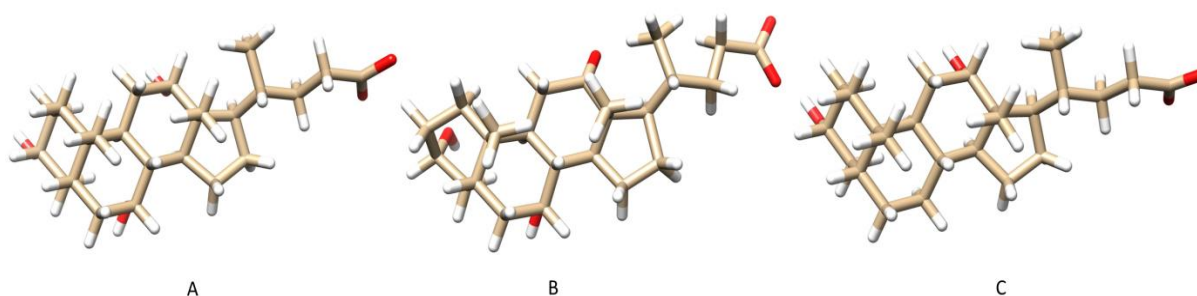
Transportni protein	Tip	Mogući Supstrat	C-skor I-TASSER	Doking studija
BL0162	ATP-zavisni	multidrug	0,45	✓
BL0163	ATP-zavisni	multidrug	1,09	✓
BL0179	ATP-zavisni	multidrug	0,29	✓
BL0180	ATP-zavisni	multidrug	1,15	✓
BL1766	ATP-zavisni	multidrug	-0,70	✓
BL1767	ATP-zavisni	multidrug	-0,17	✓
BL0575	sekundarni DMT	lek/metabolit	-3,04	✗
BL1406	sekundarni DMT	lek/metabolit	-1,59	✗
BL1444	sekundarni DMT	lek/metabolit	-2,02	✗
BL1566	sekundarni DMT	lek/metabolit	-1,39	✓
BL0037	sekundarni MFS	multidrug efluks	-0,74	✓
BL0251	sekundarni MFS	multidrug efluks	-0,9	✓
BL0332	sekundarni MFS	multidrug efluks	-0,46	✓
BL0681	sekundarni MFS	multidrug efluks	-0,84	✓
BL0919	sekundarni MFS	multidrug efluks	-1,19	✓
BL0920	sekundarni MFS	multidrug efluks	-1,83	✗
BL1699	sekundarni MFS	multidrug efluks	-0,59	✓
BL1703	sekundarni MFS	multidrug efluks	0,14	✓
BL0432	sekundarni MOP flipaza	multidrug efluks	-1,50	✗
BL1082	sekundarni MOP flipaza	multidrug efluks	1,22	✓

ATP - adenozin trifosfat; DMT – eng. *divalent metal transporter*; MFS – eng. *major facilitator superfamily*; MOP – eng. *multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide*

Većina predviđenih 3D struktura analiziranih proteina, dobijenih putem I-TASSER servera, imala je visok skor pouzdanosti što ukazuje na pouzdanost dobijenih struktura. Strukture koje su imale c-skor manji od -1,5 nisu uzete u dalje razmatranje i doking analizu. Taj kriterijum nije ispunilo 4 transportna proteina kod bakterije LA i 5 kod bakterije BL. Drugim rečima, 26 transportera koji pripadaju LA i 15 koji pripadaju BL je bilo uključeno u dalju analizu.

4.5.2. Ligandi

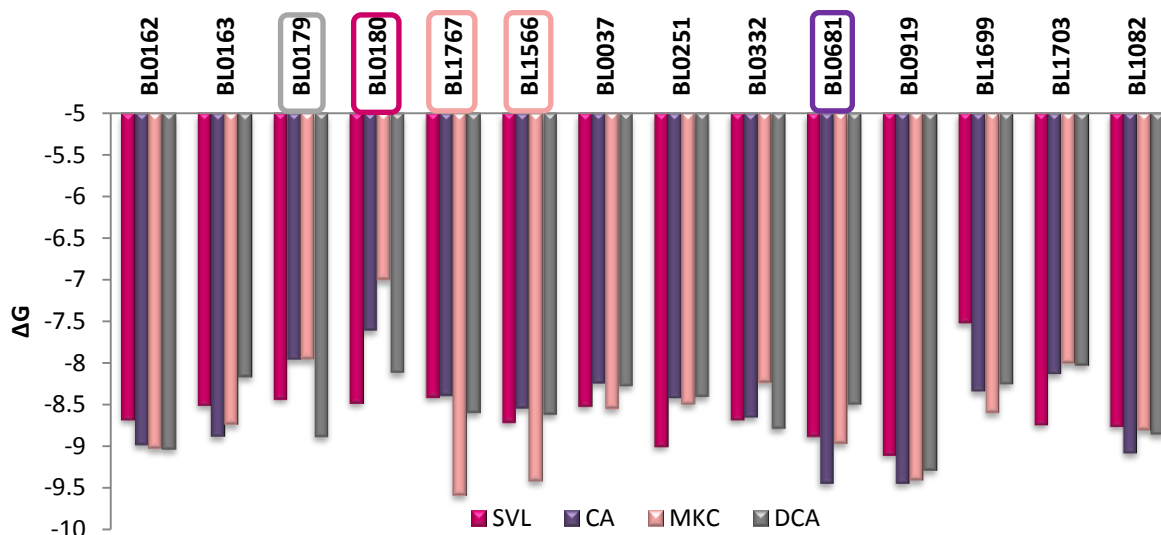
U cilju poređenja afiniteta prema *multidrug* transporterima probiotskih bakterija LA i BL, kao ligandi su paralelno analizirani simvastatin lakton (SVL), dve prirodne žučne kiseline, CA i DCA, i jedna polusintetska žučna kiselina, 12-MKC. 3D strukture žučnih kiselina u mol2 formatu predstavljene su na **Slici 43**.



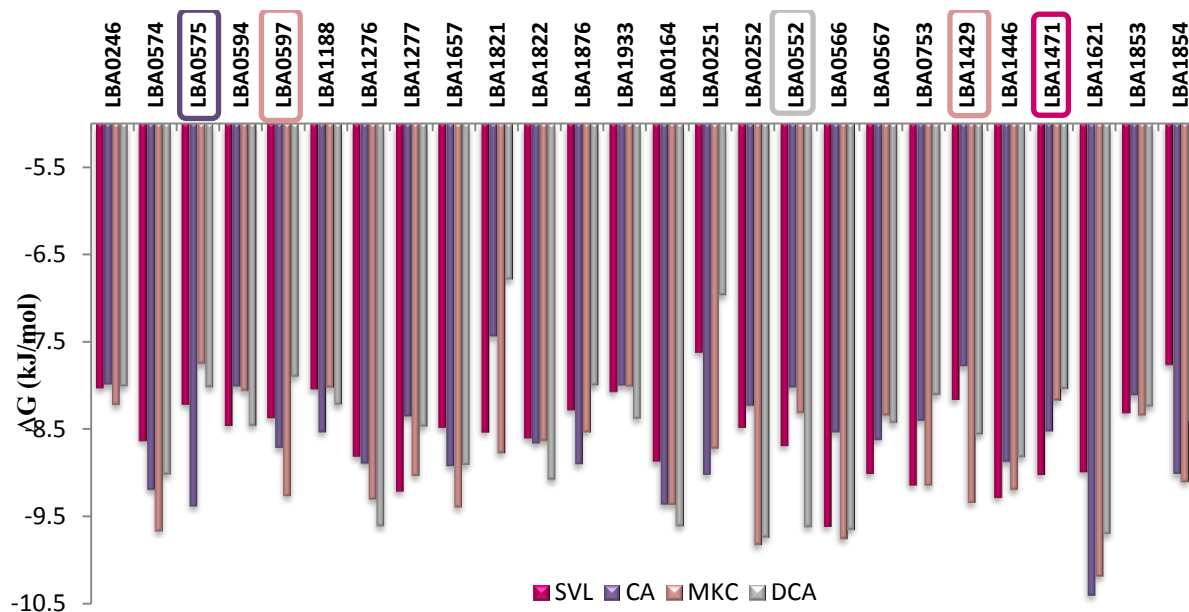
Slika 43. 3D strukture žučnih kiselina u mol2 formatu (a) CA (b) 12-MKC (c) DCA

4.5.3. Doking analiza

Rezultati doking studije izraženi kao ΔG (kcal/mol) prikazani su na **Grafikonu 12** za BL i na **Grafikonu 13** za LA. Od 41 transportnog proteina koji su podvrgnuti doking analizi, za jedan protein (BL1766) nije uspešno izvršena doking analiza usled složenosti njegove strukture.



Grafikon 12. Rezultati doking analize izraženi kao energije vezivanja (ΔG) SVL, CA, 12-MKC i DCA za transportne proteine probiotske bakterije *Bifidobacterium longum* NCC2705



Grafikon 13. Rezultati doking analize izraženi kao energija vezivanja (ΔG) SVL, CA, 12-MKC i DCA za transportne proteine probiotske bakterije *Lactobacillus acidophilus* NCFM

Posmatrajući energije vezivanja dobijene doking analizom, uočava se da simvastatin pokazuje najnižu energiju vezivanja za 8 od ukupno 40 ispitivanih transportnih proteina bakterija LA i BL (20%). Drugim rečima, ispitivane žučne kiseline su čak kod 80% ispitivanih transportnih proteina pokazale jače interakcije u poređenju sa simvastatinom.

Za 15 od 40 analiziranih transportnih proteina (37,5%), najniža slobodna energija vezivanja dobijena je sa 12-MKC kao ligandom u poređenju sa preostalim ispitivanim ligandima. Za BL, najizraženiji efekat 12-MKC uočen je u slučaju transportera BL1767 koji pripada grupi ABC transportera i kod BL1566 iz familije sekundarnih transportera. S druge strane, kod LA najveće razlike u korist 12-MKC su bile kod LBA0597 iz ABC grupe i kod LBA1429 iz grupe sekundarnih transportera.

Analizom rezultata doking studija, utvrđeno je da je CA pokazala najveći afinitet prema 9 od 40 (22.5%) ispitivanih transportnih proteina. Najveće razlike u korist CA primećene su pri interakcijama sa BL0681 (sekundarni transporter kod BL), kao i sa LBA0575 (ABC transporter kod LBA).

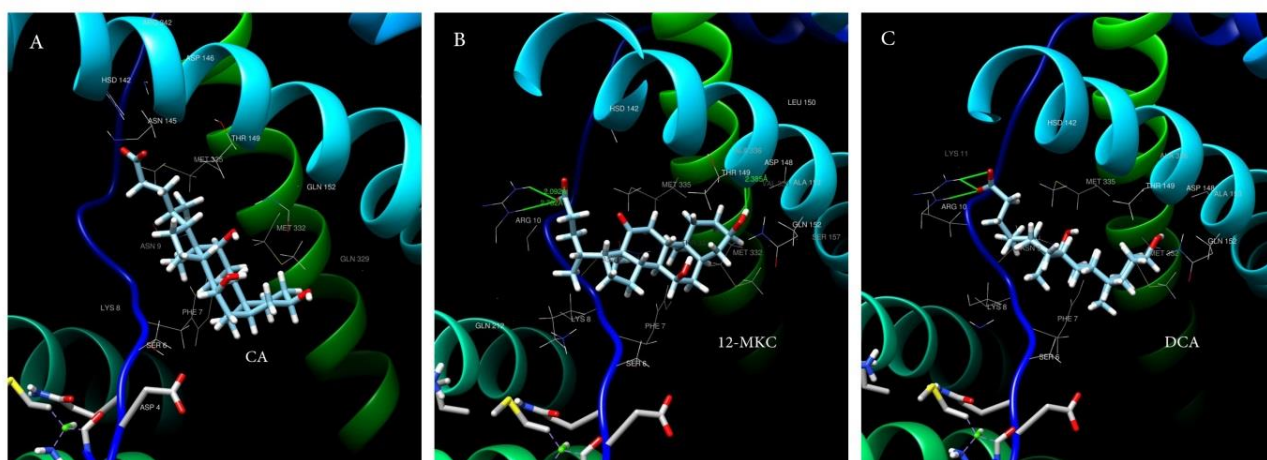
Za 8 transportera (20%), procenjeno je da DCA ima najveći afinitet od svih ispitivanih liganada što je najizraženije kod BL0179 (ABC transporter) i LBA0552 (sekundarni transporter).

4.3.3.1. Interakcije ispitivanih žučnih kiselina sa aminokiselinskom sekvencom ciljnog proteina

Mesto interakcije ispitivanih žučnih kiselina sa aminokiselinskom sekvencom ciljnog proteina analizirano je radi utvrđivanja rezidua koje doprinose vezivanju i stabilnosti kompleksa. Na **Slici 44** su predstavljene interakcije energetske najpovoljnijih položaja prilikom vezivanja CA (A), 12-MKC (B) i DCA (C) za protein BL1767. Takođe su istaknute vodonične veze koje učestvuju u pomenutim interakcijama, u okviru udaljenosti od 3 Å.

Kompleks sa DCA pokazuje 3 vodonične veze pri čemu sve potiču od Arg10, sa dužinama 2,076 Å, 2,276 Å i 2,076 Å. Arg 10 interreaguje sa 12-MKC preko 2 vodonične veze dužine 2.092 Å i 2.702 Å. Pored toga, postoji jedna interakcija vodoničnom vezom između 12-MKC i Thr149 dužine 2.385 Å. S druge strane, najpovoljnije energetske stanje odabranog proteina pri kompleksaciji sa CA, nije dalo ni jednu vodoničnu vezu.

Ispitujući odnos između broja vodoničnih interakcija i procenjene slobodne energije vezivanja uzimajući u obzir sve ispitivane transportne proteine, uočena je slabo izražena negativna korelacija (Pearsonov koeficijent -0.33).



Slika 44. Interakcije energetske najpovoljnijih položaja prilikom vezivanja CA (A), 12-MKC (B) i DCA (C) sa aminokiselinskom sekvencom proteina BL1767. Vizualizacija interakcija izvršena pomoću programa UCSF Chimera

5. DISKUSIJA

Iako je standardna terapija dislipidemija statinima efikasna, za potpunu kontrolu lipidnog statusa često su neophodni dodatni terapijski pristupi. Suplementacija probioticima pokazala se efikasnom u snižavanju ukupnog i LDL holesterola (Ooi & Liong, 2010). Pored blagotvornih efekata probiotika na ljudsko zdravlje pokazano je da probiotske bakterije mogu uticati na biološku raspoloživost istovremeno primenjenih lekovitih supstanci i dovesti do varijacija u njihovoj terapijskoj efikasnosti (Stojančević et al., 2013a). Usled toga, mogu se očekivati interakcije statina sa probioticima, ne samo u smislu sinergističkog terapijskog efekta, već i fizičkih, hemijskih i enzimskih interakcija na nivou gastrointestinalnog trakta, što može da utiče na biološku raspoloživost i farmakološku aktivnost ovog leka, a o čemu do sada ne postoje literaturni podaci. Imajući u vidu prisustvo brojnih enzima kod laktobacila i bifidobakterija, predmet našeg istraživanja je bilo ispitivanje ponašanja simvastatina u prisustvu probiotskih bakterija. U radu su identifikovani metaboliti simvastatina nakon inkubacije sa probiotskim bakterijama. Kako bi se ispitala opravdanost daljih ispitivanja identifikovanih metaboličkih produkata simvastatina u pravcu razvoja novih farmakološki aktivnih supstanci, izvršeno je *in silico* određivanje molekulskih deskriptora za predikciju *in vivo* farmakokinetičkih parametara.

Zbog sve veće primene žučnih kiselina u farmaceutskoj industriji u pogledu solubilizacije i modifikacije prodora lekova kroz biološke membrane (Stojančević et al., 2013b) kao i činjenice da su fiziološki prisutne u intestinalnom traktu, ispitan je uticaj žučnih kiselina na fizičko-hemijske osobine simvastatina, kao i na njegov prodor u probiotske bakterije. Ispitivanjem uticaja žučnih kiselina na distribuciju simvastatina u sistemu oktanol-pufer, odnosno između nepolarne i polarne faze, simulirana je raspodela između bioloških membrana i telesnih tečnosti tj. proces pasivne difuzije. Kako bi se detaljnije objasnili dobijeni rezultati, radi procene interakcija žučnih kiselina sa simvastatinom na nivou aktivnog transporta, odnosno na nivou *multidrug* transportera probiotskih bakterija, sprovedena je doking studija.

Prema našim saznanjima, ovo je prvo ispitivanje koje daje informacije o metabolizmu simvastatina pod dejstvom enzima probiotskih bakterija pružajući uvid u potencijalne interakcije između simvastatina sa probiotskim bakterijama i žučnim kiselinama. Navedene interakcije mogu značajno da utiču na farmakološku aktivnost i terapijsku efikasnost simvastatina, što je od izuzetnog značaja za dalji tok terapije lipidnih poremećaja kod ljudi.

5.1. Prodor simvastatina u probiotske bakterije

U prvom delu eksperimenta ispitana je promena koncentracije simvastatina u ekstracelularnom, intracelularnom i ukupnom sadržaju tokom dvadesetčetvoročasovne inkubacije sa probiotskim bakterijama kako bi se ispitao prodor i stepen prodora ovog leka u bakterijske ćelije.

S obzirom na činjenicu da simvastatin po svojoj hemijskoj strukturi predstavlja lakton koji je podložan hidrolizi, prvo je utvrđeno ponašanje samog leka u PBS puferu tokom vremena, što je poslužilo kao kontrolna grupa. Tom prilikom, uočeno je da su se koncentracije simvastatina održale relativno stabilnim tokom prvih šest sati inkubacije, dok je uočen značajan pad koncentracije nakon 24 časa. Ovaj pad koncentracije se može objasniti spontanom degradacijom simvastatina koja je dokumentovana brojnim studijama (Malenović et al., 2010; Álvarez-Lueje et al., 2005). U studijama stabilnosti je pokazano da se degradacija simvastatina dešava prema kinetici pseudo-prvog reda. Degradacija je pH zavisna i mnogo je izraženija u alkalnoj nego u kiselj sredini (Álvarez-Lueje et al., 2005). Kako je analiza vršena na pH 7,4, pretpostavlja se da je deo simvastatina hidrolizovao do kiseline usled čega je došlo do smanjenja njegove koncentracije tokom vremena.

Analizom eksperimentalne grupe sa probioticima, utvrđen je značajan pad koncentracije simvastatina u ekstracelularnom sadržaju. Zbog mogućnosti zadržavanja jednog dela leka na površini bakterijskih ćelija, analiziran je i intracelularni sadržaj bakterija nakon ispiranja i sledstvenog liziranja, gde su takođe zabeležene značajne koncentracije leka. Ovim je potvrđeno da postoji visok kapacitet preuzimanja leka od strane probiotskih bakterija tokom dvadesetčetvoročasovne inkubacije.

Interesantno je primetiti da tokom vremena nije došlo do značajnog spontanog oslobađanja preuzetog leka. Na osnovu toga, pretpostavlja se da će u *in vivo* uslovima do oslobađanja „zarobljenog“ leka doći tek nakon lize ćelija u digestivnom sistemu što bi moglo da dovede do nešto odložene apsorpcije simvastatina. Poznato je da različite probiotske vrste imaju različit stepen preživljavanja u gastrointestinalnom traktu usled razlika u osetljivosti na uslove koji vladaju u različitim segmentima (Drouault et al., 1999). Tako je utvrđeno da je stepen preživljavanja vrsta *Lactobacillus bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus* u gornjim delovima gastrointestinalnog trakta veoma mali (oko 1 %). Drouault i saradnici (1999) su pokazali da istovremeno uzimanje probiotske vrste *Lactococcus lactis* sa hranom značajno povećava otpornost i stepen preživljavanja, najverovatnije usled puferskog efekta hrane u

želucu. S druge strane, samo 10-30% bakterija preživljava u duodenumu usled izloženosti pankreasnim sokovima, žučnim solima, lizozimima, fosfolipazi A i antibakterijskim peptidima kao što je defenzin. Dakle, metabolička aktivnost kao i vreme i mesto liziranja unetih probiotika zavise od brojnih faktora tako da su neophodna dodatna *in vivo* ispitivanja kako bi se preciznije objasnio efekat probiotika na oslobađanje simvastatina iz ćelija i na njegovu apsorpciju iz gastrointestinalnog trakta.

U skladu sa predloženim efektom probiotika na odlaganje apsorpcije simvastatina su rezultati studije koju su sprovedi Al-Salami i saradnici (2012a) gde su pokazali da pretretman probioticima odlaže apsorpciju 12-MKC kod eksperimentalnih životinja.

Da procesi uključeni u interakcije simvastatina i probiotskih bakterija nisu samo fizičke prirode, dokazuje podatak da je ukupna količina simvastatina u eksperimentalnoj grupi tokom čitavog posmatranog perioda bila statistički značajno niža u odnosu na kontrolnu grupu, navodeći na zaključak da se deo simvastatina tokom vremena transformisao do svojih metaboličkih produkata pod dejstvom enzima ispitivanih bakterija, zbog čega je izvršena detaljna kvalitativna i semikvantitativna analiza inkubacionog medijuma, kao i intracelularnog sadržaja sa ciljem identifikacije metabolita.

5.2. Metabolizam simvastatina u probiotskim bakterijama

Različite metode zasnovane na masenoj analizi se koriste za identifikaciju metabolita u *in vitro* i *in vivo* uslovima. Jedan od osnovnih pristupa je ekstrakcija odgovarajućih masenih hromatograma za očekivane metabolite iz celokupnog LC-MS seta podataka. Veliki doprinos u identifikaciji i objašnjenju struktura imaju i dodatne softverske funkcije kao što je *data dependent scan* koja podrazumeva *full scan* analizu podataka praćenu MS/MS analizom. Na taj način dobijaju se dodatne informacije o strukturi metabolita (Triolo et al., 2005).

Detaljna kvalitativna analiza i identifikacija metabolita simvastatina u našem eksperimentu je izvršena LC-MS/MS tehnikom primenom jonske zamke sa gradijentnim režimom elucije i trajanjem jedne analize 60 minuta čime je postignuta zadovoljavajuća razdvojenost pikova. Za analizu metabolita simvastatina izabrana je jonizacija u pozitivnom modu. Izbor moda zavisi od hemijske strukture analiziranih jedinjenja. Jedinjenja koja sadrže samo kisele grupe moraju da se analiziraju u negativnom modu, dok jedinjenja koja sadrže samo bazne grupe analiziraju se isključivo u pozitivnom modu. Hemijske strukture koje sadrže i kisele i bazne grupe mogu se analizirati i u pozitivnom i u negativnom modu (Banerjee & Mazumdar, 2012). Pretraživanjem literature zaključeno je da je negativni mod retko mod izbora za analizu simvastatina. Optimizacijom metode za analizu simvastatina i njegovih nečistoća, Hirth (2011) je utvrdio da je njihov signal čak 20 puta slabiji u negativnom modu nego u pozitivnom. Probnim eksperimentima smo potvrdili postizanje daleko veće osetljivosti u pozitivnom modu. Iako metaboliti M-452 i M-436 sadrže i kisele grupe u svojoj strukturi, i njihov odziv je bio bolji u pozitivnom modu.

Identifikacija metabolita simvastatina je vršena na osnovu karakterističnih jonskih masa m/z i fragmenata u MS/MS spektrima za svako detektovano jedinjenje. Iz masenih spektara prvog reda u pozitivnom modu određena je molekulska masa jedinjenja. Karakteristične razlike u m/z između različitih jona ($\Delta m/z=22$ između adukata sa H^+ i Na^+ , $\Delta m/z=16$ između adukata sa Na^+ i K^+) omogućile su nedvosmisleno određivanje molekulske mase jedinjenja. Detaljnije informacije o strukturi detektovanih metabolita dobijene su na osnovu MS/MS spektara i tumačenjem mehanizama fragmentacije jedinjenja. Prisustvo sličnih fragmentnih jona u MS/MS spektrima simvastatina i njegovih metabolita dokazuje poreklo nastalih produkata i upućuje na sličnu strukturu sa simvastatinom.

Za užu selekciju potencijalnih metabolita simvastatina i tačnu interpretaciju struktura od velikog značaja su bili rezultati MetaPrint2D analize, dostupni literaturni podaci o

identifikovanim jedinjenjima srodnim simvastatinu (Plumb et al., 2007; Malenović et al., 2006; Reddy et al., 2009), kao i podaci o enzimskoj aktivnosti ispitivanih probiotskih bakterija.

Prema našim saznanjima, samo jedna studija je imala sličan cilj i bavila se ispitivanjem metabolizma simvastatina pod dejstvom enzima normalne crevne mikroflore. Naime, Aura i saradnici (2011) su inkubirajući lek sa svežim humanim fecesom, gasno-masenom analizom identifikovali nekoliko metabolita simvastatina. To su 2-hidroksivalerijanska kiselina, 3-hidroksibutanska kiselina, mlečna i cikloheksankarboksilna kiselina, za koje su pretpostavili da nastaju reakcijama demetilacije, hidroksilacije, dehidroksilacije, beta oksidacije, deesterifikacije i re-ciklizacije. Oni su pretpostavili da mehanizam degradacije simvastatina pod dejstvom crevne mikroflore uključuje u prvom koraku hidrolitičko odvajanje dimetil butanske kiseline od simvastatinskog skeleta pod dejstvom esteraza crevne flore.

Pored toga, u nedavno objavljenoj studiji, u *in vivo* i *in vitro* uslovima, potvrđeno je prisustvo nekoliko metabolita lovastatina, simvastatinu srodnog jedinjenja, nastalih pod dejstvom enzima crevne mikroflore. To su demetilbutiril metabolit (m/z 343, $C_{19}H_{28}O_4Na^+$), hidroksilovani metabolit lovastatina (m/z 443, $C_{24}H_{36}O_6Na^+$), lovastatinska kiselina tj. metabolit nastao hidrolizom laktonskog prstena (m/z 445, $C_{24}H_{38}O_6Na^+$) i hidroksilovana lovastatinska kiselina (m/z 461, $C_{24}H_{38}O_7Na^+$) (Yoo et al., 2014).

5.2.1. Identifikovani metaboliti simvastatina

Prilikom dvadesetčetvoročasovne inkubacije simvastatina sa probiotskim bakterijama detektovano je 8 metaboličkih produkata i potom je izvršena njihova strukturna identifikacija i interpretacija. To su sledeća jedinjenja: M-452 odnosno hidroksilovani derivat simvastatinske kiseline, M-390 koji se od simvastatina razlikuje za jednu etil grupu u bočnom nizu, M-436 odnosno simvastatinska kiselina, M-404 koji odgovara lovastatinu/epilovastatinu, metabolit M-416 sa jednom dvostrukom vezom više u odnosu na simvastatin, M-420 koji odgovara strukturi dihidrosimvastatina, M-432 identifikovan kao metil etar simvastatina i metabolit M-400, odnosno dehidrosimvastatin. Pored ovih glavnih metabolita detektovani su u tragovima metaboliti M-432* i M-416* sa istom molekulskom masom kao M-432 i M-416 ali sa različitim retencionim vremenom. Uočeno je da neki od nastalih produkata predstavljaju farmakopejski definisane nečistoće simvastatina (European Pharmacopoeia, 2009). To su metaboliti M-436 koji predstavlja farmakopejsku nečistoću A,

M-400 koji je definisan kao nečistoća C, potom M-404 koji odgovara nečistoći E/F i nečistoća M-416 koja predstavlja nečistoću G, odnosno njen stereoisomer. Kao što se može primetiti, od farmakopejski definisanih nečistoća koje predstavljaju strukturno slična jedinjenja simvastatinu, nisu detektovani metilestar simvastatina (nečistoća B) i dimer (nečistoća D).

5.2.1.1. Mehanizam fragmentacije simvastatina

Detaljna analiza mehanizma fragmentacije simvastatina poslužila je kao polazni izvor informacija za razumevanje masenih spektara njegovih metabolita. Kako u svojoj strukturi sadrži lakton koji predstavlja primarno mesto protonovanja, mehanizam fragmentacije utvrđen je pomoću LC-MS analize u pozitivnom jonskom modu. Uzimajući u obzir činjenicu da simvastatin predstavlja polazno jedinjenje od kog potom nastaju njegovi metabolički produkti pod uticajem enzima probiotskih bakterija, bilo je za očekivati izvesne sličnosti u pogledu fragmentnih jona u njihovim masenim spektrima.

U masenom spektru drugog reda simvastatina snimljenog u pozitivnom jonskom modu, uočeni se glavni fragmentni joni m/z 303, 285, 267, 243, 225 i 199. Najdominantniji je jon m/z 285, a za njim sledi m/z 199. Kao joni slabijeg intenziteta pojavljuju se m/z 321, 249, 239, 173, 143. Prvi korak prilikom fragmentacije simvastatina karakterističan je za etarsku vezu prisutnu u bočnom nizu i podrazumeva odvajanje 2,2-dimetil butanske kiseline od molekulskog jona pri čemu nastaje fragmentni jon m/z 303. Nakon toga procesu fragmentacije podleže laktonski prsten dok se naftalenska struktura tokom čitavog procesa održava stabilnom. Fragmentacija jona m/z 303 teče dalje u dva smera. Neutralni gubitak molekula vode dovodi do formiranja fragmentnog jona m/z 285, dok s druge strane, neutralnim gubitkom molekula etanola formira se fragmentni jon m/z 243. Analogni procesi odigravaju se i sa nastalim fragmentnim jonom 285 m/z pri čemu se formiraju joni m/z 267 i m/z 225 nakon gubitka molekula vode. Nakon toga, fragmentni jon m/z 225 podleže sukcesivnoj fragmentaciji neutralnim gubitkom acetilena, dajući fragmentne jone m/z 199 i m/z 173. Maseni spektar simvastatina drugog reda dobijen snimanjem u pozitivnom jonskom modu kao i predloženi mehanizam fragmentacije su u skladu sa rezultatima prethodno objavljenih studija (Hirth, 2011). Prvi detaljan opis mehanizma fragmentacije simvastatina dali su Wang i saradnici (2001). Ove informacije bile su od izuzetne važnosti pri interpretaciji spektara metabolita jer se na osnovu karakterističnih fragmenata moglo predvideti na kom mestu u molekulu dolazi do metaboličke promene.

5.2.1.2. Metabolit M-452

Produkt M-452 je identifikovan kao hidroksilovani produkt simvastatinske kiseline. Od svih identifikovanih metabolita simvastatina, M-452 predstavlja najpolarnije jedinjenje koje se prvo eluira sa kolone tj. najkraće se zadržava na njoj. Za pomenuti produkt nisu dobijeni MS² spektri protonovanog molekula već samo adukta sa natrijumom koji su nešto stabilniji pa samim tim i manje podložni fragmentaciji. U studiji koju su izveli Wang i saradnici (2001), potvrđeno je da adukti simvastatina sa natrijumom daju veoma jednostavne spektre sa malo fragmentnih jona, pa samim tim i manje informacija. Naime, u ovim spektrima su uočeni samo fragmenti koji potiču od odvajanja bočnog niza od adukta molekula sa natrijumom.

Na osnovu prethodno objavljene studije u kojoj su ispitivani metaboliti lovastatina pod dejstvom crevne mikroflore, otkriveno je postojanje analognog metabolita lovastatina sa molekulskom masom 438 Da (Yoo et al., 2014) koje se od M-452 razlikuje jedino po nedostatku jedne metil grupe u bočnom nizu. Kako se simvastatin i lovastatin strukturno razlikuju upravo po toj metil grupi, očekivano je bilo da metaboliti daju iste fragmentne jone karakteristične za laktonski i naftalenski deo. Tako su kod oba metabolita uočeni fragmentni joni m/z 359 i m/z 341 koji odgovaraju neutralnom gubitku dimetil butanske kiseline, a potom molekula vode kod metabolita simvastatina, odnosno gubitku metil butanske kiseline i molekula vode kod metabolita lovastatina. Dakle jedina razlika u spektrima ova dva jedinjenja uočena je u molekulskom jonu - m/z 475 za adukt M-452 sa natrijumom i m/z 461 za adukt analognog metabolita lovastatina sa natrijumom. Na osnovu dobijenih spektara ne može se sa sigurnošću utvrditi položaj OH grupe u molekulu pa se struktura ne može nedvosmisleno odrediti. Ono što se može zaključiti na osnovu fragmentnih jona u masenom spektru ovog jedinjenja, kao i na osnovu analogije sa pomenutim metabolitom lovastatina, je da se OH grupa nalazi na naftalenskom delu molekula, a prema rezultatima analize Meta Print2D programa, potencijalne mete za hidroksilaciju u ovom delu su atomi C12 C8, C9 pri čemu je najveća verovatnoća odigravanja reakcije hidroksilacije na atomu C8.

Na osnovu predložene strukture, može se zaključiti da metabolit M-452 nastaje kao posledica otvaranja laktonskog prstena usled hidrolize i sledstvene hidroksilacije. Enzimi odgovorni za pomenute reakcije, različite supstrat specifične i nespecifične esteraze i hidroksilaze, dokumentovane su u ispitivanim bakterijama (Kim & Oh, 2013; Brod et al., 2010) čime se potvrđuje mogućnost enzimske reakcije u pravcu nastajanja ovog jedinjenja.

5.2.1.3. Metabolit M-390

Na osnovu molekulske mase koja se za 28 Da razlikuje od molekulske mase simvastatina utvrđeno je da se radi o produktu koji poseduje jednu etil ili dve metil grupe manje u odnosu na simvastatin. Analizom fragmentnih jona u masenom spektru drugog reda, koji su karakteristični za laktonski prsten i naftalensku strukturu u molekulu simvastatina, ustanovljeno je da se promena dešava na bočnom lancu. U skladu sa tim, za ovo jedinjenje su predložene dve strukture. U prvoj verziji, bočni niz je u vidu butanske kiseline, a u drugoj u vidu izobutanske. Ostatak molekula je identičan molekulu simvastatina. Na osnovu masenog spektra ne može se sa sigurnošću predvideti o kojoj od ove dve strukture se tačno radi. Sličan mehanizam fragmentacije M-390 metabolita i simvastatina govori u prilog činjenici da pomenuto jedinjenje potiče od simvastatina i da usled strukturne sličnosti poseduju sličan mehanizam fragmentacije u MS² spektru.

Pretraživanjem literature došli smo do saznanja da je pomenuto jedinjenje identifikovano kao nečistoća simvastatina u studiji koju je sproveo Hirth (2011). Iako, programom MetaPrint2D nije predviđena pomenuta reakcija demetilacije u bočnom nizu, dokazano je da probiotske bakterije poseduju demetilaze koje bi mogle da dovedu do nastanka predloženog metabolita (Marin et al., 2015). Tako je ustanovljeno da je upravo aktivnost demetilaza odgovorna za nastanak intermedijernih produkata antocijana (Keppler & Humpf, 2005) i lignana tj. fenolnih kiselina (Blaut & Clavel, 2007).

5.1.2.4. Metabolit M-436

Na osnovu masenih spektara prvog i drugog reda, M-436 jedinjenje identifikovano je kao simvastatinska kiselina koja nastaje hidrolizom laktonskog prstena. Ova pretpostavka je potvrđena rezultatima analize MetaPrint2D programa. Prema dobijenim rezultatima, postoji velika verovatnoća odigravanja reakcije estarske hidrolize na atomu C18 pri čemu dolazi do otvaranja laktonskog prstena i nastanka produkta M-436. Karboksilna i hidroksilna grupa, nastale nakon hidrolize i otvaranja laktonskog prstena, čine ovo jedinjenje hidrofiličnijim od simvastatina što je u skladu sa njegovim vremenom zadržavanja na koloni. Simvastatinska kiselina ima kraće retenciono vreme od simvastatina.

Prisustvo enzima karboksiesteraza, koje bi mogle biti odgovorne za ovu reakciju, dokumentovano je različitim studijama u vrstama roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* (Brod et al., 2010; Arora et al., 1990; Gavini et al., 1991). Treba napomenuti da do konverzije

simvastatina u simvastatinsku kiselinu može doći i spontano u zavisnosti od uslova sredine. Tako je utvrđeno da je optimalan pH na kome je minimalna konverzija između ova dva oblika u opsegu između 4-5. Povećanje pH iznad 6 olakšava konverziju laktona u kiselinu (u jonizovanoj formi), dok kiselija sredina olakšava konverziju laktona do kiseline ili kiseline do laktona (u nejonizovanoj formi) (Novakova et al., 2008). Kako je analiza vršena na pH 7,4, kao što je već prethodno pomenuto, pretpostavlja se da je deo simvastatina i spontano hidrolizovao do kiseline, odnosno metabolita M-436.

5.2.1.5. Metabolit M-404

Metabolit M-404 predstavlja demetilovani produkt simvastatina koji sam po sebi takođe predstavlja lek iz grupe statina - lovastatin. U masenom spektru prvog reda uočavaju se joni m/z 405 $[M+H]^+$, m/z 427 $[M+Na]^+$ i m/z 443 $[M+K]^+$ koji nedvosmisleno potvrđuju da se radi o jedinjenju sa molekulskom masom 404. Naime, molekulska masa lovastatina manja je za 14 Da, tj. za jednu metil grupu u odnosu na simvastatin. U objašnjenju pozicije na kojoj je došlo do gubitka metil grupe doprineli su MS^2 spektri dobijeni pri kolizionoj energiji od 30%, pokazujući identične karakteristične fragmentne jone kao i simvastatin (m/z 303, 285, 267, 243, 225 i 199). Na osnovu toga donet je zaključak da je razlika u strukturi u bočnom lancu koji se odvaja u prvom koraku fragmentacije. Dakle jedina razlika u odnosu na simvastatin postoji u prvom prelazu koji u slučaju lovastatina podrazumeva neutralni gubitak 2-metil butanske kiseline od molekulskog jona m/z 405 dajući fragmentni jon m/z 303, za razliku od simvastatina gde se od molekulskog jona odvaja 2,2-dimetil butanska kiselina formirajući isti fragmentni jon m/z 303. Dalji put fragmentacije, pa stoga i karakteristični frgmentni joni, identični su kao za simvastatin. Maseni spektar ovog jedinjenja potvrđen je u više naučnih studija (Wang et al., 2001) i u skladu je sa našim rezultatima.

Kao što je već diskutovano u slučaju metabolita M-390, na osnovu dostupne literature utvrđeno je da probiotske bakterije poseduju demetilaze koje bi mogle dovesti do ove hemijske reakcije. Međutim rezultati analize programa MetaPrint2D, ukazuju da je na atomu C26 u bočnom nizu veoma mala verovatnoća odigravanja reakcije demetilacije tako da prisustvo ovog jedinjenja najverovatnije nije posledica enzimske aktivnosti probiotskih bakterija već se ono nalazi u ispitivanom jedinjenju kao polazna nečistoća.

5.2.1.6. Metabolit M-416

Na osnovu molekulske mase metabolita M-416 koja iznosi 416 Da, pretpostavljeno je da se radi o jedinjenju koje ima 2 atoma vodonika manje u odnosu na simvastatin, odnosno jednu dvostruku vezu više. U Farmakopeji je jedinjenje molekulske mase 416 Da opisano kao polazna nečistoća simvastatina (Nečistoća G) (European Pharmacopoeia, 2009). Prema literaturnim podacima (Kumar Basniwal & Jain, 2012) položaj dodatne dvostruke veze u nečistoći G se nalazi se u bočnom nizu. S druge strane, prema rezultatima MetaPrint2D analize, u bočnom nizu su male šanse za odigravanje reakcije oksidacije C-C veze. Najveća verovatnoća odigravanja reakcije oksidacije i prelaska jednostruke u dvostruku vezu je između atoma C22 i C23 u laktoskoj strukturi, kao i između atoma C8 i C9 u naftalenskom delu. U masenom spektru drugog reda uočavaju se fragmentni joni karakteristični za laktoski deo i naftalensku strukturu koji su za 2 m/z manji nego u slučaju simvastatina. Ovim je potvrđeno da mesto dvostruke veze kod detektovanog metabolita nije u bočnom nizu, nego u naftalenskom delu molekula, budući da on poslednji podleže fragmentaciji. U slučaju da je položaj dvostruke veze u bočnom nizu, jedina razlika bi bila u molekulskom jonu jer bi se već u prvom koraku odvojio bočni niz dajući karakteristični fragmentni jon m/z 303. Na osnovu svega iznetog, zaključeno je da je pozicija na kojoj je došlo do oksidacije jednostruke veze do dvostruke između atoma C8 i C9 u naftalenskom delu molekula, prema oznakama u programu MetaPrint2D.

Dakle, pored polazne nečistoće u samoj supstanci, u kojoj se dvostruka veza nalazi u bočnom nizu, postoji mogućnost nastanka metabolita simvastatina sa istom molekulskom masom odnosno njegovog izomera sa različitim položajem dvostruke veze. Pomenuta jedinjenja, tj. stereoizomeri, imaju različite logP vrednosti izračunate u Molinspiration i VolSurf+ programima, što je u skladu sa dobijenim ekstrahovanim hromatogramima gde za m/z 439 (adukt sa natrijumom) postoje dva pika na različitim retencionim vremenima.

Za formiranje jedinjenja M-416 polazeći od simvastatina, neophodno je prisustvo enzima dehidrogenaza koje bi dovele do oksidacije jednostruke C-C veze do dvostruke uklanjanjem 2 atoma vodonika. Pretraživanjem jedne od najvećih baza podataka o enzimima (BRENDA) kod ispitivanih probiotskih vrsta utvrđeno je prisustvo brojnih dehidrogenaza kao što su glukoza-6 fosfat dehidrogenaza, glicerol dehidrogenaza, aldehid dehidrogenaza, sukcinat dehidrogenaza. Oksidoreduktivni enzim morfin-6-dehidrogenaza (E.C.1.1.1.28), prisutan kod vrste *Lactobacillus acidophilus*, katališe reakciju konverzije morfina u morfinon, pri čemu se hidroksilna grupa oksiduje do keto grupe. Sličnu funkciju

ima i enzim laktat dehidrogenaza (E.C.1.1.1.27) koji katališe konverziju laktata u piruvat, gde se takođe hidroksilna grupa oksiduje do keto grupe. Međutim, ni jedan od ovih enzima ne vrši oksidaciju jednostruke C-C veze do dvostruke da bi učestvovala u ovoj reakciji. U skladu s tim, pretpostavlja se da je prisustvo ovog jedinjenja samo posledica prisustva u polaznoj supstanci.

5.2.1.7. Metabolit M-420

Identifikacija jedinjenja M-420 izvršena je na osnovu molekulske mase određene iz masenog spektra prvog reda i karakterističnih fragmentnih jona (m/z 305, 287, 269, 245) koji su za 2 m/z veći od fragmentnih jona u spektru simvastatina. Na osnovu toga donet je zaključak o strukturi pomenutog jedinjenja tj. da se radi o metabolitu simvastatina - dihidrosimvastatinu, kod kog je izvršena redukcija jedne dvostruke veze. Na osnovu mehanizma fragmentacije i rezultata MetaPrint2D analize zaključeno je da se redukcija dvostruke veze dešava na atomu C12. U nedavno sprovedenoj studiji, navedeni metabolit je identifikovan kao nečistoća simvastatina (Hirth, 2011).

Kod probiotskih bakterija dokazano je prisustvo enzima reduktaza koji bi mogle biti odgovorne za nastanak metabolita M-420. Naime još od 80-ih godina prošlog veka je poznato da su upravo reduktaze crevne mikroflore razlog inaktivacije kardiotoničnog leka digoksina. Kod ovog leka, redukcija dvostruke veze se dešava u petočlanom laktonskom prstenu što dovodi do nastanka kardioinaktivnog metabolita (Butler et al., 1983).

5.2.1.8. Metabolit M-432

M-432 metabolit predstavlja metil etar simvastatina. Maseni spektar ovog jedinjenja karakteriše većina jona prisutnih u masenom spektru simvastatina. To su joni m/z 285, 267, 225 i 199 koji su specifični za naftalenski i laktonski deo simvastatina. U masenom spektru drugog reda jedinjenja M-432, uočen je intenzivan fragmentni jon m/z 317, a odsustvo jona m/z 303 koji se nalazi u spektru simvastatina. Na osnovu navedene razlike, kao i razlike u molekulskim masama, donet je zaključak o položaju formirane etarske veze. Prvi prelaz od molekulskog jona m/z 433 do fragmentnog jona m/z 317 ($C_{20}H_{28}O_3H^+$) odgovara neutralnom gubitku 2,2-dimetil butanske kiseline ($m/z=116$). Ovaj neutralni gubitak je takođe prisutan u MS/MS spektru simvastatina i karakterističan je za estarsku vezu prisutnu u bočnom nizu. Stoga, glavna razlika u masenim spektrima između simvastatina i metabolita M-432 uočena je prilikom druge tranzicije m/z 317 do m/z 285 koja je karakteristična za grananje na

laktonskom prstenu. Kako ona odgovara neutralnom gubitku metanola ($m/z=32$), zaključeno je da se radi o metil etru simvastatina sa položajem etarske veze u laktonskom prstenu. Ovaj proizvod je identifikovan u ranije publikovanoj studiji kao simvastatinu srodno jedinjenje (Hirth, 2011). Takođe je utvrđen njegov mehanizam fragmentacije u ESI/MS uslovima čime smo potvrdili pretpostavljenu strukturu jedinjenja.

Prema trenutno dostupnoj literaturi, ne postoje podaci o prisustvu odgovarajućih enzima (metil transferaza) u ispitivanim probiotskim bakterijama koji bi mogli dovesti do reakcija metilacije. Iako je navedeni metabolit najverovatnije samo posledica prisustva već u polaznoj supstanci, analizom višestrukih masenih spektara, nedvosmisleno je potvrđena njegova struktura. Isto tako, moguće je postojanje određenih metil transferaza u probiotskim bakterijama čije prisustvo još nije dokazano i koje bi mogle dovesti do njegovog nastanka.

5.2.1.9. *Metabolit M-400*

M-400 je identifikovan kao dehidro proizvod simvastatina. Kod ovog jedinjenja u masenom spektru drugog reda, najintenzivniji je fragmentni jon m/z 285 koji nastaje prilikom prvog prelaza, odnosno odvajanja 2,2-dimetil butanske kiseline ($m/z=116$) od molekulskog jona m/z 401. Na osnovu toga, kao i na osnovu rezultata MetaPrint2D analize, donet je zaključak o strukturi ovog jedinjenja. Dehidratacija se dešava na laktonskom prstenu na atomu C22 pri čemu se uklanja molekul vode i nastaje dvostruka veza između molekula C21 i C22.

U ispitivanim probiotskim bakterijama je utvrđeno prisustvo pojedinih dehidrataza, kao što su karbonat dehidrataza, fosfoglukonat dehidrataza, glicerol dehidrataza, propanediol dehidrataza (BRENDA *database*), čija je zajednička funkcija uklanjanje molekula vode iz molekula. Ovi podaci idu u prilog pretpostavci da se metabolit M-400 stvara prilikom inkubacije simvastatina sa ispitivanim bakterijama. Navedeno jedinjenje je opisano u Farmakopeji kao nečistoća C (European Pharmacopoeia, 2009).

5.2.2. Semikvantitativna analiza metabolita

Kao što se može uočiti, u polaznoj supstanci simvastatina, u određenoj meri je zabeleženo prisustvo identifikovanih metaboličkih produkata. Ove nečistoće, koje predstavljaju strukturno srodna jedinjenja sa simvastatinom, mogu da potiču od polaznog materijala, da nastanu kao intermedijeri ili sporedni produkti tokom sinteze aktivne supstance, mogu biti degradacioni produkti nastali tokom procesa proizvodnje i/ili tokom perioda čuvanja i transporta gotovog farmaceutskog doziranog oblika. Pored toga, u farmaceutskim proizvodima nečistoće mogu nastati i prilikom interakcija aktivne sa ostalim ekscipijensima formulacije ili kontaktnom ambalažom (Bari et al., 2007). Njihove koncentracije su se održale stabilnim u kontrolnoj grupi tokom vremena, odnosno nije bilo statistički značajnih razlika na početku i nakon četiri časa inkubacije. Dakle, povećanje koncentracija metabolita u uzorcima sa probiotskim bakterijama se ne može pripisati spontanoj degradaciji leka već ukazuje na to da su posledica enzimske aktivnosti probiotskih bakterija, što je i bio cilj da se ispita. Jedina razlika u kontrolnoj grupi uočena je kod metabolita M-436 čija se koncentracija značajno povećala nakon 4 sata, što je posledica spontane degradacije simvastatina odnosno otvaranja laktonskog prstena i nastanka simvastatinske kiseline (Álvarez-Lueje et al., 2005).

Poređenjem kontrolne grupe i grupe sa probioticima nakon 4 sata inkubacije utvrđene su veće koncentracije metabolita u grupi sa probioticima, dok su statistički značajno veće koncentracije utvrđene samo kod metabolita M-452. Izuzetak je bio metabolit M-436 čija je koncentracija nakon 4 časa bila statistički značajno veća u kontrolnoj grupi, zbog pomenute spontane degradacije. Na osnovu toga, pretpostavlja se da probiotske bakterije imaju ulogu u smanjenju spontane degradacije leka, bez obzira na prisustvo enzima koji mogu dovesti do formiranja ovog metabolita. Imajući u vidu činjenicu da je degradacija simvastatina pH zavisna i mnogo više izražena u alkalnoj nego u kiseloj sredini (Álvarez-Lueje et al., 2005), ovakav rezultat se može objasniti smanjenjem pH u rastvoru inkubiranom sa bakterijama kao posledice metaboličke aktivnosti probiotskih bakterija i produkcije organskih kiselina (mlečna, sirćetna, mravlja) što je potvrđeno brojnim studijama (Tsigarida & Nychas, 2001; Randazzo et al., 2013). Eksperiment je vršen na pH 7,4, a praćenjem pH tokom vremena utvrđeno je da se u rastvoru sa probioticima, pH smanjuje za oko 1,5 pH jedinicu što favorizuje interkonverziju simvastatinske kiseline u laktonski oblik (Novakova et al., 2008).

Poređenjem ekstracelularnog sa intracelularnim sadržajem metabolita pokazano je da se jedinjenja M-452, M-436 i M-390 pretežno nalaze izvan ćelija, dok se metabolit M-404

akumulira pretežno intracelularno. Ostali metaboliti simvastatina su u približno istim količinama zabeleženi i unutar i izvan ćelija. Ovi rezultati su u skladu sa izračunatim molekulskim deskriptorima koji opisuju lipofilnost ovih jedinjenja, odnosno sa činjenicom da veću sposobnost prolaska kroz membrane imaju lipofilna jedinjenja, i obrnuto.

5.2.3. Računarsko modelovanje: molekulski deskriptori u predikciji farmakokinetičkih osobina identifikovanih metaboličkih produkata simvastatina

Pored razvoja MS tehnologija, izuzetno značajnu ulogu i doprinos u analizi metaboličkog profila jedinjenja predstavljaju *in silico* metode predviđanja u kombinaciji sa statističkim metodama analize, kao što su korelacija i multivarijantna analiza. Poslednjih godina veliku pažnju privlači razvoj *in silico* analiza i računarske hemije kojima je moguće predvideti ponašanje leka u organizmu na osnovu fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih osobina, dok su u relativno bliskoj prošlosti za takve rezultate bili neophodni sati eksperimentalnog laboratorijskog i kliničkog rada (Klünemann et al.; Ekins et al., 2007; Di & Kerns, 2003).

Kako bi se ispitala opravdanost daljih ispitivanja identifikovanih metaboličkih produkata simvastatina u pravcu razvoja novih farmakološki aktivnih supstanci, izvršeno je *in silico* određivanje odabranih molekulskih deskriptora koji opisuju fizičko-hemijske osobine molekula ali i predviđaju farmakokinetičko ponašanje.

Uzimajući u obzir kriterijume definisane pravilom Lipinskog, odnosno da supstanca ne sadrži više od 5 donora vodoničnih veza, da nema više od 10 akceptora vodoničnih veza, da je molekulska masa ispod 500 Da i da je particioni koeficijent manji od 5 (Lipinski et al., 2012), utvrđeno je da ni jedno ispitivano jedinjenje ne krši više od jednog pravila što ih sve čini pogodnim kandidatima za dalju analizu kao potencijalne farmakološki aktivne supstance. Jedina odstupanja uočena su kod metabolita M-432 i M-400 koji pokazuju logP vrednost veću od 5. Ove vrednosti idu u prilog eksperimentalno dobijenim rezultatima hromatografske analize u kojima je pokazano da se ova dva jedinjenja duže zadržavaju na koloni od simvastatina. Veći logP ukazuje na veću lipofilnost ovih jedinjenja pa samim tim i na veći afinitet ka nepolarnoj stacionarnoj fazi na koloni. Imajući u vidu interakcije između supstance, mobilne i stacionarne faze, može se zaključiti da logP vrednosti svih detektovanih metabolita odgovaraju njihovom zadržavanju na koloni. Ono što je interesantno spomenuti je da pH utiče u manjoj meri na retencionna vremena polarnih struktura kao što su M-452 i M-436. Na nižim pH vrednostima, u kiseljoj sredini, ova jedinjenja se nalaze u većoj meri u

molekulskom obliku, tako da se nešto duže zadržavaju na koloni. Pomeranje retencionog vremena (0,3-0,9 min) za ove metabolite uočeno je na osnovu dobijenih hromatograma iz uzoraka inkubiranih sa bakterijama, što je u skladu sa zabeleženom promenom pH u rastvoru, najverovatnije usled metaboličke aktivnosti probiotskih bakterija i produkcije organskih kiselina (mlečna, sirćetna, mravlja) (Tsigarida & Nychas, 2001; Randazzo et al., 2013).

Kako optimalan balans između rastvorljivosti i permeabilnosti pokazuju supstance čiji je logP u opsegu 0-3 (Di & Kerns, 2003), moglo bi se očekivati da će metabolit M-452 u *in vivo* uslovima pokazati najbolje rezultate u pogledu apsorpcije i biorasploživosti.

Molekulska težina predstavlja najčešće korišćeni deskriptor za opisivanje veličine molekula jer za njegovo izračunavanje nisu neophodni optimizacija molekula i dodatni proračuni. Poznato je da povećanje molekulske mase može dovesti do smanjenja rastvorljivosti i biorasploživosti supstanci (Savjani et al., 2012). Ispitivana jedinjenja imaju opseg molekulskih masa 390-452 Da čime je zadovoljeno pravilo Lipinskog.

Kako permeabilnost i apsorpcija nekog jedinjenja u velikoj meri zavise od sposobnosti stvaranja vodoničnih veza (Raevsky & Schaper, 1998), broj donora i akceptora vodoničnih veza u molekulu predstavlja jedan od ključnih kriterijuma prilikom ispitivanja *drug-like* osobina molekula. Povećanje broja vodoničnih veza smanjuje particiju iz vodenog u lipidni sloj ćelijske membrane utičući na taj način na permeabilnost (Lipinski et al., 2012). Stoga, metaboliti koji poseduju veći broj donora i akceptora vodoničnih veza (M-452 i M-436) imaju bolju rastvorljivost u vodi i manji afinitet ka lipidnoj membrani što potvrđuje eksperimentalno dobijene rezultate. Prilikom inkubacije sa probiotskim bakterijama, koncentracije ovih metabolita bile su daleko veće u ekstracelularnom prostoru u poređenju sa intracelularnim, za razliku od ostalih metabolita koji u svojim strukturama imaju manje donora i akceptora vodoničnih veza, pa samim tim i veći afinitet ka lipidnoj membrani bakterijskih ćelija.

U softverskom paketu VolSurf+ određeni su molekulske deskriptori vezani za polarnost i farmakokinetičke osobine ispitivanih jedinjenja. Uzimajući u obzir činjenicu da je rastvorljivost ograničavajući faktor za biorasploživost simvastatina (Gupta et al., 2012), interesantno je primetiti da većina identifikovanih jedinjenja (M-452, M-390, M-436, M-404, M-416) pokazuje bolju intrinzičku rastvorljivost od simvastatina. Međutim, kako se parametar SOLY odnosi na rastvorljivost neutralnih vrsta u vodi nezavisno od pKa jedinjenja, ovaj parametar ne možemo smatrati najboljim pokazateljem rastvorljivosti lekovite supstance u telesnim tečnostima. Mnogo bolji pokazatelj je rastvorljivost na određenom pH.

Polarna površina molekula (PSA) se definiše se kao površina molekula u kom se nalaze izrazito elektronegativni atomi, prvenstveno kiseonik i azot, uključujući i atome vodonika koji su vezani za njih. Ovi polarni atomi učestvuju u vodoničnom vezivanju i drugim elektrostatičkim interakcijama. Utvrđeno je da PSA pokazuje visoku korelaciju sa intestinalnom apsorpcijom, permeabilnošću kroz Caco-2 ćelije kao i sa prodorom kroz krvno moždanu barijeru. (Ertl et al., 2000), zbog čega je našao primenu u brojnim studijama koje se bave predikcijom transporta lekova. Na osnovu predviđenih vrednosti PSA, očekuje se da će u *in vivo* uslovima jedinjenje M-452 pokazati najbolju apsorpciju, kao i prodor kroz Caco-2 ćelije, dok se za jedinjenje M-400 predviđa najlošija apsorpcija. Ipak, ovaj deskriptor ne uzima u obzir to da različiti atomi azota i kiseonika mogu na različite načine stupati u interakcije sa hidrofilnom sredinom što može imati posledice na permeabilnost i apsorpciju supstanci. Tako su na primer, Zamora i saradnici (2006) ustanovili da nitrobenzen i benzoeva kiselina imaju veoma slične vrednosti PSA (40.128 i 45.825 Å²) dok su mehanizmi interakcija sa vodenom sredinom prilično različiti.

Za razliku od PSA, parametar HSA predstavlja hidrofobnu površinu molekula. Vrednosti HSA nisu se u velikoj meri razlikovale među ispitivanim jedinjenjima, tako da je mnogo bolji pokazatelj hidrofilnih odnosno hidrofobnih svojstava odnos polarne prema ukupnoj (PSAR) odnosno polarne prema hidrofobnoj površini molekula (PHSAR). Na osnovu vrednosti PSAR i PHSAR potvrđeno je da jedinjenja M-452 i M-436 poseduju najviše izražene hidrofilne osobine, dok su ostali metaboliti prilično sličnih osobina sa izraženijim hidrofobnim karakterom.

Ovi rezultati su u skladu sa procenjenim vrednostima logP i logD. Kao što je za očekivati, kod polarnijih molekula, kao što su M-452 i M436 promena pH utiče na promenu logD zbog jonizacije, dok kod ostalih hidrofobnijih jedinjenja logD na pH 7,4 praktično je jednak njegovom particionom koeficijentu jer se molekul nalazi pretežno u svom neutralnom obliku.

Na osnovu vrednosti PSA, HSA, PSAR, PHSAR, logP, logD i SOLY zaključuje se da M-452 poseduje najviše izražene polarne osobine koje bi značajno mogle da doprinesu njegovoj rastvorljivosti u *in vivo* uslovima što bi za posledicu imalo povećanje biološke raspoloživosti.

Pored pomenutih fizičko-hemijskih karakteristika, potencijalno aktivna jedinjenja bi trebalo da imaju dobre farmakokinetičke karakteristike. U pogledu vezivanja za proteine plazme, lipofilnija jedinjenja, odnosno ona koja bolje stupaju u interakcije sa hidrofobnom

sredinom, pokazala su veći stepen vezivanja za proteine plazme, što je u skladu sa očekivanjima na osnovu njihovih fizičko-hemijskih osobina. Takođe, za ova jedinjenja su predviđeni veći volumeni distribucije kao i bolji prolazak kroz Caco-2 ćelije. Iako se za metabolite M-452 i M-436 kod kojih je laktonski prsten hidrolizovan, predviđa lošiji prolazak kroz Caco-2 ćelije od simvastatina, u literaturi se navodi da se laktonski oblik ne apsorbuje nužno bolje od oblika kiseline (Stella et al., 2007) tako da bi ove pretpostavke trebalo potvrditi *in vivo* eksperimentima. S druge strane, kod ova dva metabolita (M-452 i M-436) je utvrđena veća metabolička stabilnost koja se definiše kao procenat leka koji ostaje nepromenjen nakon inkubacije sa humanim CYP3A4 enzimom. Kako MetStab vrednost preko 50% ukazuje na stabilno ponašanje jedinjenja, zaključuje se da se samo metabolički produkti M-452 i M-436 mogu smatrati metabolički stabilnim.

Kao što se može primetiti, uz pomoć molekulskih deskriptora moguće je u velikoj meri izvršiti predikciju ponašanja ispitivanih jedinjenja u organizmu. Očigledno je da male promene u hemijskoj strukturi značajno menjaju fizičko-hemijske i farmakokinetičke osobine molekula.

Na osnovu svega navedenog može se izvesti zaključak da od svih analiziranih simvastatinu strukturno srodnih jedinjenja, metabolit M-452, iako pokazuje slabiju permeabilnost kroz Caco-2 ćelije od simvastatina, predstavlja najpogodnijeg kandidata sa aspekta fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih osobina za dalja ispitivanja u pravcu potencijalne farmakološke aktivnosti.

5.3. Uticaj žučnih kiselina na transport simvastatina u probiotske bakterije

Zbog uloge žučnih kiselina u modifikaciji transporta kroz ćelijske membrane, ispitan je njihov uticaj na transport simvastatina u probiotske bakterije. Kako bi se izbegao membranolički efekat, ispitivane koncentracije žučnih kiselina (0,25 mM) bile su ispod njihovih KMK koje iznose 4,09 mM za CA, 13,35 mM za 12-MKC i 1,69 mM za DCA (Yang et al., 2009). Uočeno je da u ispitivanim koncentracijama žučne kiseline ne dovode do statistički značajnih razlika u odnosu na kontrolu (bez žučnih kiselina). Ipak, u nekim vremenskim tačkama primećena je nešto veća koncentracija leka u ekstracelularnom prostoru u grupama sa žučnim kiselinama. Naime, razlike se uočavaju od petnaestog minuta do drugog sata kod 12-MKC i DCA, dok u grupi sa CA nisu uočene.

Kako se transport leka može ostvariti aktivnim i pasivnim transportom, potencijalne interakcije analizirane su sa oba aspekta.

Ove razlike se mogu delimično objasniti rezultatima određivanja distribucionog koeficijenta simvastatina u prisustvu žučnih kiselina o čemu je diskutovano u narednom poglavlju. Dodatak žučnih kiselina doveo je do smanjenja distribucionog koeficijenta simvastatina (Djanic et al., 2016b) što za posledicu ima smanjen afinitet leka za lipidnu membranu, povećanje afiniteta za vodeni medijum i samim tim, redukciju transporta u ćelije. Ipak, nedostatak ovog *in vitro* modela je što ne može sa sigurnošću predvideti šta se dešava u *in vivo* uslovima jer mnoge supstance sposobne da vrše modifikaciju transporta kroz membrane, svoju aktivnost ispoljavaju i preko transporterata, a ne samo uticajem na pasivnu difuziju (Yang et al., 2011a; Chen et al., 2012; Yang et al., 2011b). Dakle, postoji mogućnost interakcija simvastatina i žučnih kiselina na nivou transporterata probiotskih bakterija. U prilog tome govore dostupni literaturni podaci koji navode da u transportu žučnih kiselina i simvastatina učestvuju isti eukariotski transportni proteini (P-gp, MRP2 i OATP1B1) (Klaassen & Aleksunes, 2010; Chen et al., 2005). Kako u bakterijskoj ćeliji postoje bliski homologni proteini eukariotskih transporterata koji poseduju srodnu supstratnu specifičnost (Kourtesi et al., 2013), očekuje se da je moguće ostvarivanje kompeticije simvastatina i žučnih kiselina i na nivou bakterijskih transporterata. O potencijalnom uticaju žučnih kiselina na aktivni transport simvastatina detaljno je diskutovano u poglavlju 5.5 na osnovu rezultata doking analize.

5.4. Uticaj soli žučnih kiselina na distribicioni koeficijent simvastatina

Određivanjem distribucionog koeficijenta simvastatina pod uticajem soli žučnih kiselina u sistemu n-oktanol/pufer ispitali smo da li se uticaj soli žučnih kiselina na prolaz kroz membrane probiotskih bakterija može objasniti fizičko-hemijskim interakcijama, budući da se određivanje vrednosti distribucionog koeficijenta koristi za predviđanje prolaska lekova kroz biološke membrane. Camenisch i saradnici (1998) su krajem 90-ih godina prošlog veka utvrdili da se permeabilnost jedinjenja kroz Caco-2 ćelije putem pasivne difuzije može predvideti na osnovu distribucionog koeficijenta oktanol/voda i molekulske mase jedinjenja. Specifična struktura n-oktanola koja se sastoji od osam hidrofobnih ugljenikovih atoma i jedne hidrofilne primarne alkoholne grupe imitira uslove koji vladaju u biološkim membranama, dok pH pufera odgovara uslovima u intestinalnom traktu, što omogućava simulaciju procesa pasivne difuzije kroz biološke membrane u organizmu (Lukacova et al., 2006).

Na ispitivanim pH vrednostima, u odsustvu jonizujućih grupa, SVL čiji pKa iznosi 13,6 (Chen et al., 2005) nalazi se pretežno u molekulskom neutralnom obliku tako da promena pH ne utiču značajno na promenu vrednosti logD. S druge strane, sa porastom pH distribicioni koeficijent SVK značajno opada, što je u skladu sa osobinama ovog leka kao slabe kiseline čiji pKa iznosi 4,31 (Chen et al., 2005; Shoghi et al., 2013). Dobijeni rezultat je posledica povećane disocijacije SVK na višim pH vrednostima, dok se na nižim pH vrednostima nalazi pretežno u molekulskom obliku. U slučaju slabih kiselina, procenat jonizacije se računa prema formuli $100 / 1 + 10^{pK_a - pH}$, što znači da je na pH 5 disosovano oko 83% molekula dok je na 7,4 gotovo kompletno jonizovan. Poznato je da je jonizovani oblik leka bolje rastvoran u vodi, ne difunduje kroz dvoslojnu lipidnu membranu i preko jonske veze interreaguje sa receptorom. Na drugoj strani, molekulski oblik, koji je slabije rastvoran u vodi, a bolje u nepolarnim rastvaračima, difunduje kroz membranu. Smatra se da će se jonizovani i nejonizovani oblik naći u vodenoj, a nejonizovani oblik molekula u organskoj fazi. U nekim slučajevima, u zavisnosti od okoline jonizujućeg centra molekula i raspodele naelektrisanja koje stabilizuje molekulu, čak i jonizovana molekula može da penetrira u organsku fazu (Avdeef, 2001). Vrednosti logD dobijene eksperimentalnim putem u skladu su sa vrednostima logD koje predviđa program Chemaxon kao i sa rezultatima drugih eksperimentalnih studija (Serajuddin et al., 1991; Joshi et al., 1999).

Prisustvo soli žučnih kiselina u ispitivanim koncentracijama, koje su bile ispod KMK, dovelo je do statistički značajnog smanjenja distribucionog koeficijenta simvastatina, što se može objasniti njihovim fizičko-hemijskim interakcijama (Djanic et al., 2016b). Smanjenje distribucionog koeficijenta tj. lipofilnosti leka, kao posledicu je imalo povećanje rastvorljivosti leka u vodenoj sredini. Do najvećeg smanjenja distribucionog koeficijenta SVK na oba ispitivana pH dovela je NaMKC, dok u slučaju SVL razlike između soli žučnih kiselina nisu bile statistički značajne. Jedina razlika među njima uočena je na pH 5 gde je NaC pokazala statistički značajno veće smanjenje u odnosu na NaMKC.

Interakcije žučnih kiselina sa drugim supstancama u velikoj meri zavise od njihove strukture i hidrofilno-lipofilnog balansa. Tako hidrofobnije žučne kiseline formiraju stabilnije agregate i stoga imaju niže KMK. Citotoksičnost žučnih kiselina opada sa porastom KMK navodeći na zaključak da je smanjena citotoksičnost posledica redukovane sposobnosti da penetriraju kroz ćelijske membrane (Stojančević et al., 2013b). CA sa tri hidroksilne grupe i više izraženim hidrofilnim osobinama ima veću KMK od DCA, koja ima dve hidroksilne grupe i izraženiji hidrofobni karakter. 12-MKC sa dve hidroksilne i jednom keto grupom ima veću KMK i pokazuje manju citotoksičnost ukazujući na značaj keto grupe u ponašanju ove žučne kiseline u biološkom sistemu (Yang et al., 2009a). Poznato je da žučne kiseline u koncentracijama iznad KMK imaju sposobnost solubilizacije nerastvorljivih molekula putem formiranja micela. Ipak, ove koncentracije su toksične i dovode do rupture ćelijskih membrana odnosno do ispoljavanja membranoličkog efekta (Stojančević et al., 2013b). Zato je ispitivanje koncentracija koje su ispod KMK od mnogo većeg značaja. Rezultati naše studije su u skladu sa prethodno objavljenim studijama u kojima je potvrđeno da i submicelarne koncentracije žučnih kiselina mogu dovesti do povećanja rastvorljivosti nekih hidrofobnih supstanci. Tako su Dulfer i Govers (1995) pokazali da žučne kiseline u koncentracijama i iznad i ispod KMK dovode do statistički značajnog povećanja rastvorljivosti polihlorovanih bifenila koji predstavljaju izrazito hidrofobne molekule. U cilju povećanja rastvorljivosti i bioraspoloživosti resveratrola, dokazano je da submicelarne koncentracije keto derivata holne kiseline značajno povećavaju njegovu solubilizaciju (Atanackovic et al., 2009). Kim i saradnici (2011) su ispitivali efekat žučnih kiselina na farmakokinetiku lovastatina nakon peroralne primene. Lovastatin se samo u jednoj metil grupi razlikuje od simvastatina pa imaju slične fizičko-hemijske i farmakokinetičke osobine. Oba leka predstavljaju visoko lipofilna jedinjenja sa izrazito niskom rastvorljivošću u vodi i usled toga, sa malom bioraspoloživostu (<5%). Kako su u pomenutoj studiji utvrdili da žučne

kiseline značajno povećavaju biorasploživost lovastatina, pretpostavili su da je razlog tome povećanje rastvorljivosti supstance. Na osnovu rezultata pomenute studije može se izvesti pretpostavka da povećanje rastvorljivosti simvastatina dodatkom soli žučnih kiselina može takođe za posledicu imati povećanje njegove biološke rasploživosti u *in vivo* uslovima što bi trebalo da se potvrdi u daljim ispitivanjima.

5.4.1. Kompleksacija simvastatina sa žučnim kiselinama

Povećanje rastvorljivosti simvastatina pomoću soli žučnih kiselina može se delimično objasniti formiranjem hidrofilnog kompleksa između simvastatina sa žučnim kiselinama. Optimizacijom nastalih kompleksa utvrđeno je da između molekula leka i žučnih kiselina postoje hidrofobne interakcije, dok su hidroksilne i keto grupe okrenute ka spoljašnjoj strani agregata. Stoga, formirani agregati su hidrofilniji od samog molekula simvastatina, što doprinosi boljoj rastvorljivosti u vodenim rastvorima.

Analiza odabranih molekulskih deskriptora, doprinela je objašnjenju interakcija između žučnih kiselina i simvastatina. Kako je poznato da se pri minimalnoj energiji jedinjenja nalaze u najstabilnijoj konformaciji, utvrđeno je da stabilizaciji analiziranih optimizovanih kompleksa najviše doprinose $n-1,4$ VDW sile. Izračunate Konolijeve površine su u skladu sa eksperimentalno dobijenim rezultatima. Naime, SAS, MS i SEV vrednosti kompleksa SVL i SVK sa žučnim kiselinama bile su u pozitivnoj korelaciji sa eksperimentalno određenim koncentracijama leka u vodenoj fazi nakon postizanja ravnotežnog stanja. S druge strane, vrednosti ovih parametara bili su u negativnoj korelaciji sa vrednostima distribucionog koeficijenta. Dakle veće vrednosti SAS, MS i SEV potvrđuju veću hidrofilnost formiranog kompleksa u odnosu na sam lek i na taj način objašnjavaju retenciju simvastatina u vodenoj fazi.

Na osnovu svega navedenog, može se izvesti zaključak da bi povećanje rastvorljivosti simvastatina pomoću soli žučnih kiselina moglo značajno doprineti poboljšanju njegove biorasploživosti. Kako je NaMKC pokazala najizraženije efekte u pogledu smanjenja $\log D$ simvastatina, zbog svoje specifične strukture i niskog membranolitičkog potencijala, ova žučna kiselina se predlaže kao kandidat za dalja ispitivanja sa ciljem razvoja novih farmaceutskih formulacija u kojima bi simvastatin imao bolju rastvorljivost i biorasploživost.

5.5. *In silico* ispitivanje interakcija simvastatina i žučnih kiselina sa probiotskim bakterijama na nivou transportera - doking studije

Brojnim studijama dokazan je uticaj transportnih proteina prisutnih u gastrointestinalnom traktu ljudi na farmakokinetiku lekova, kao i uticaj pojedinih lekova na modifikaciju ekspresije transportnih proteina, što može dovesti do promene farmakokinetičkih parametara kao i neočekivanog farmakološkog efekta leka (Maeda & Sugiyama, 2013). Ono o čemu se mnogo manje zna su interakcije lekova na nivou bakterijskih transportnih proteina.

Pored fizičko-hemijskih interakcija i uticaja na pasivni transport leka, žučne kiseline svoj uticaj mogu ostvariti i delovanjem na transportne proteine na membranama probiotskih bakterija ispoljavajući efekat na aktivni transport leka. Stoga je jedan od ciljeva ovog rada bio da se pomoću kompjuterskih tehnika i softvera predvide potencijalne interakcije žučnih kiselina sa simvastatinom na nivou *multidrug* transportera probiotskih bakterija, a o čemu do sada ne postoje literaturni podaci. Radi evaluacije mehanizama uključenih u interakcije između probiotika, žučnih kiselina i simvastatina sprovedena je doking studija. Izračunate su i upoređene energije vezivanja simvastatina i tri različite žučne kiseline za transportne *multidrug* proteine probiotskih bakterija LA i BL.

Analizom transportnih proteina prisutnih kod ispitivanih bakterija utvrđeno je da kod obe vrste većinu čine sekundarni u odnosu na ABC transportere. To je u skladu sa činjenicom, da za razliku od eukariotskih ćelija, gde transporteri za lekove uglavnom pripadaju ABC familiji, većina transportera u bakterijskim ćelijama koji su do danas karakterisani pripada grupi sekundarnih transportera (Putman et al., 2000).

Rezultatima doking studija procenjeno je da ispitivane žučne kiseline (CA, 12-MKC i DCA) imaju veći afinitet prema čak 80% *multidrug* transportera bakterija BL i LA u odnosu na simvastatin. Taj podatak nam govori o mogućnosti ostvarivanja interakcija žučnih kiselina sa ovim lekom na nivou transportnih proteina. Poznato je da u eukariotskim ćelijama isti transportni proteini (P-gp, MRP2 i OATP1B1) učestvuju u transportu žučnih kiselina i simvastatina (Klaassen & Aleksunes, 2010; Chen et al., 2005). Stoga, slična situacija se očekuje i u probiotskim bakterijama zbog postojanja homologije u proteinima i njihovim supstratima (Kourtesi et al., 2013).

Pored mogućnosti da direktno inhibišu ulazak/izlazak leka iz bakterijske ćelije kompetitivnim vezivanjem za transportni protein, žučne kiseline svoj efekat mogu ispoljiti i regulacijom ekspresije gena koji kodiraju sintezu odgovarajućih transportnih proteina. Tako je

analiziranjem podataka dobijenih sekvencioniranjem genoma probiotika *Lactobacillus acidophilus* NCFM, utvrđeno da su tolerancija na nizak pH i žučne soli u gastrointestinalnom traktu posledica povećane ekspresije gena koji kodiraju sintezu dva transportna proteina iz grupe MFS (LBA1429 i LBA1446) i jednog proteina koji pripada ABC familiji (LBA1679) koji su zaduženi za efluks žučnih kiselina iz ćelije (Pfeiler & Klaenhammer, 2009; Bull et al., 2013).

Rezultati našeg istraživanja ukazuju na različito ponašanje pojedinih žučnih kiselina prema analiziranim transportnim proteinima. Poređenjem energije vezivanja CA, 12-MKC i DCA za *multidrug* transportere prisutne kod LA i BL utvrđeno je da najjači afinitet prema najvećem broju transportera ima 12-MKC. Potom sledi CA, dok je DCA pokazala najjači afinitet vezivanja za najmanji broj proteina. Kako ne postoje studije kojima bi se potvrdilo koji od ispitivanih transportera učestvuju u transportu simvastatina u probiotske bakterije, može se samo izvesti pretpostavka da su interakcije simvastatina na nivou transportnih proteina najverovatnije sa 12-MKC. Najjači afinitet 12-MKC za najveći broj transportera može se tumačiti specifičnošću njene strukture. Pretpostavlja se da keto grupa na ugljenikovom atomu u položaju 12 u steroidnom jezgru ima značajan uticaj na osobine 12-MKC i interakcije sa membranskim transporterima (Djanic et al., 2016a). Na osnovu izračunate vrednosti Pearsonovog koeficijenta zaključeno je da pored vodoničnih interakcija, stabilnosti analiziranih kompleksa doprinose i druge vrste interakcija kao što su hidrofobne.

Dobijeni rezultati koji govore o potencijalu žučnih kiselina, pre svega 12-MKC, da stupaju u interakcije sa lekom na nivou *multidrug* transportera probiotskih bakterija, su u skladu sa prethodnim istraživanjima vezanim za neke eukariotske transportere. Al-Salami i saradnici (2008) su pokazali da 12-MKC dovodi do smanjenja permeacije gliklazida kod zdravih pacova od mukoze ka serozi, što su objasnili selektivnom inhibicijom MRP3 proteina. Proučavajući efekat žučnih kiselina na transcelularni transport rodamina 123 kroz krvno moždanu barijeru, Yang i saradnici (2011a) su pokazali da je od 4 ispitivane žučne kiseline, 12-MKC pokazala najveće povećanje preuzimanja i smanjenje efluksa rodamina 123, najverovatnije putem inhibicije P-gp. *In vitro* ispitivanjima je pokazano da CA, DCA i TCA nisu uticali na funkciju P-gp, dok su 12-MKC, TLCA, TCDCA, GCDCA i UDCA dovele do inhibicije transporta lekova posredovanog P-gp (Mazzanti et al., 1994). Odsustvo hidroksilne grupe na ugljenikovom atomu u položaju 12 steroidnog jezgra je jedina karakteristika zajednička za TLCA, TCDCA, GCDCA, UDCA i 12-MKC, što ukazuje na njen presudan značaj u interakciji sa P-gp. Pored toga, Kim i saradnici (2011) su povećanje biološke

raspoloživosti lovastatina nakon dodatka žučnih kiselina kod eksperimentalnih životinja objasnili inhibicijom P-gp žučnim kiselinama

Kao što je navedeno u poglavlju 5.3, u *in vitro* uslovima, žučne kiseline nisu dovele do statistički značajne promene transporta simvastatina u/iz probiotskih bakterija. Ipak, u nekim vremenskim tačkama uočena je veća koncentracija leka izvan ćelije nego u kontroli što bi moglo da bude posledica inhibicije influks transportera žučnim kiselinama. S druge strane, koncentracije žučnih kiselina korišćene u eksperimentu bile su ispod KMK što takođe može biti jedan od razloga malog uticaja na transport leka. Usled kompleksnosti procesa transporta kroz ćelijske membrane i velikog broja faktora koji na njega utiču, neophodna su dodatna *in vivo* istraživanja kako bi se sa sigurnošću razjasnili dobijeni rezultati.

6. ZAKLJUČAK

Rezultati eksperimenta pokazali su da prilikom dvadesetčetvoročasovne inkubacije simvastatina sa probiotskim bakterijama iz roda *Lactobalillus* i *Bifidobacterium*, koje čine deo normalne crevne mikroflore, dolazi do visokog stepena preuzimanja simvastatina od strane probiotskih bakterija kao i do smanjenja ukupne količine simvastatina u ekstracelularnom i intracelularnom sadržaju u odnosu na kontrolu navodeći na zaključak da se deo simvastatina metaboliše pod dejstvom enzima probiotskih bakterija.

Tehnikom tečne hromatografije kuplovane sa tandemskom masenom spektrometrijom izvršena je detaljna kvalitativna analiza metabolita simvastatina. Detektovano je osam metaboličkih produkata i potom je izvršena njihova strukturna identifikacija i interpretacija. To su sledeća jedinjenja: M-452 odnosno hidroksilovani derivat simvastatinske kiseline, M-390 koji se od simvastatina razlikuje za jednu etil grupu u bočnom nizu, M-436 odnosno simvastatinska kiselina, M-404 koji odgovara lovastatinu/epilovastatinu, metabolit M-416 sa jednom dvostrukom vezom više u odnosu na simvastatin, M-420 kod kog je došlo do redukcije jedne dvostruke veze u odnosu na simvastatin, M-432 identifikovan kao metil etar simvastatina i metabolit M-400 odnosno dehidro-simvastatin.

U kontroli je u određenoj meri zabeleženo prisustvo metaboličkih produkata usled prisustva u polaznoj supstanci. Njihove koncentracije u kontrolnoj grupi su održane stabilnim tokom vremena. Utvrđeno je da inkubacija sa probiotskim bakterijama dovodi do porasta koncentracije metabolita. Statistički značajno povećanje zabeleženo je samo kod metabolita M-452. Pored toga, dokazano je da probiotske bakterije značajno smanjuju spontanu degradaciju leka.

Na osnovu izračunatih vrednosti molekulskih deskriptora, utvrđeno je da male strukturne promene kod metabolita u odnosu na simvastatin dovode do velikih razlika u fizičko-hemijskim i farmakokinetskim svojstvima ispitivanih jedinjenja. Kako je rastvorljivost ograničavajući faktor za biološku raspoloživost simvastatina, modifikacije strukture u cilju dobijanja polarnijih jedinjenja, kao što su metaboliti M-452 i M-436 su od izuzetne važnosti. Pored toga, ova jedinjenja pokazuju daleko veću metaboličku stabilnost od samog simvastatina. Ipak, dalja ispitivanja su potrebna kako bi se u *in vivo* uslovima ispitala potencijalna farmakološka aktivnost identifikovanih metabolita simvastatina.

Pokazano je da ispitivane žučne kiseline gotovo ne utiču na transport simvastatina u probiotske bakterije. Male razlike uočene su sa DCA i 12-MKC, smanjenjem prodora u

bakterije. Primenom *in silico* metode molekuskog dokinga i na osnovu rezultata određivanja distribucionog koeficijenta, u izvesnoj meri su razjašnjeni efekti dobijeni tokom *in vitro* ispitivanja.

Utvrđeno je da ispitivane soli žučnih kiselina dovode do statistički značajnog smanjenja distribucionog koeficijenta simvastatina odnosno do povećavanja rastvorljivosti u vodenoj fazi pri fiziološkim pH vrednostima usled formiranja hidrofilnijih kompleksa između simvastatina i žučne kiseline. Povećanje rastvorljivosti ispitivanog leka dodatkom soli žučnih kiselina moglo bi da posluži kao osnova novih farmaceutskih formulacija simvastatina sa poboljšanim fizičko-hemijskim i farmakokinetičkim osobinama. Kako je NaMKC pokazala najizraženije efekte u pogledu smanjenje logD simvastatina, zbog svoje specifične strukture i niskog membranolitičkog potencijala, ova žučna kiselina se predlaže kao kandidat za dalja ispitivanja.

Radi procene potencijalnih interakcija žučnih kiselina sa simvastatinom na nivou *multidrug* transportera probiotskih bakterija *Lactobacillus acidophilus* NCFM i *Bifidobacterium longum* NCC2705 sprovedene su doking studije. Rezultatima doking studija procenjeno je da ispitivane žučne kiseline (CA, 12-MKC i DCA) imaju veći afinitet prema čak 80% *multidrug* transportera bakterija u odnosu na simvastatin. Utvrđeno je da najjači afinitet prema najvećem broju *multidrug* transportera ima 12-MKC. Ovi podaci govore o mogućnosti ostvarivanja interakcija žučnih kiselina sa simvastatinom na nivou transportnih proteina. Pored mogućnosti da direktno inhibišu ulazak/izlazak leka iz bakterijske ćelije kompetitivnim vezivanjem za transportni protein, žučne kiseline svoj efekat mogu ispoljiti i regulacijom ekspresije gena koji kodiraju sintezu odgovarajućih transportnih proteina. Rezultati ove *in silico* studije mogu da posluže kao osnova za predviđanje interakcija žučnih kiselina na nivou transportera probiotskih bakterija sa različitim lekovima.

Iz svega navedenog, može se izvesti pretpostavka o postojanju interakcija između simvastatina, žučnih kiselina i probiotika u *in vivo* uslovima. Ponašanje ovog leka u prisustvu probiotskih bakterija, kao i identifikacija potencijalnih metabolita nastalih ovim putem, od izuzetne je važnosti, s obzirom na mogućnost izmene poznatog metaboličkog puta simvastatina u organizmu, a samim tim i terapijskog odgovora. Razumevanje uticaja crevne mikroflore na farmakološki i bezbednosni profil lekova je od krucijalne važnosti za projektovanje farmakokinetike lekova i moglo bi dovesti do poboljšanja farmakokinetičkih parametara u otkrivanju i razvoju novih lekova. Studije o metabolizmu lekova putem crevne mikroflore trebalo bi da postanu sastavni deo razvojnog puta lekova.

Potrebno je u *in vivo* eksperimentima potvrditi efekat interakcija žučnih kiselina i probiotika kako bi se dao konačan odgovor o uticaju na biološku raspoloživost i na terapijski odgovor simvastatina. Detaljnije razumevanje mehanizama kojima probiotici i žučne kiseline utiču na terapijski odgovor simvastatina, nudi brojne mogućnosti u terapiji dislipidemija i može biti od izuzetnog značaja u optimizaciji individualne terapije za pacijenta.

7. LITERATURA

Acree WE, Jr, Grubbs LM, Abraham MH. Prediction of Partition Coefficients and Permeability of Drug Molecules in Biological Systems with Abraham Model Solute Descriptors Derived from Measured Solubilities and Water-to-Organic Solvent Partition Coefficients. In: Acree, B. (ed.). Toxicity and Drug Testing. In Tech Open Access Publisher, 2012.

Al-Salami H, Butt G, Tucker I, Golocorbin-Kon S, Mikov M. Probiotics decreased the bioavailability of the bile acid analog, monoketocholic acid, when coadministered with gliclazide, in healthy but not diabetic rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2012a;37(2):99-108.

Al-Salami H, Butt G, Tucker I, Mikov M. Influence of the semisynthetic bile acid (MKC) on the ileal permeation of gliclazide in healthy and diabetic rats. *Pharmacol Rep.* 2008;60(4):532.

Al-Salami H, Mikov M, Caccetta R, Golocorbin-Kon S. Probiotics applications in autoimmune diseases. INTECH Open Access Publisher, 2012b.

Álvarez-Lueje A, Valenzuela C, Squella JA, Núñez-Vergara LJ. Stability study of simvastatin under hydrolytic conditions assessed by liquid chromatography. *J AOAC Int.* 2005;88(6):1631-6.

Arora G, Lee B, Lamoureux M. Characterization of enzyme profiles of *Lactobacillus casei* species by a rapid API ZYM system. *J Dairy Sci.* 1990;73(2):264-73.

Atanackovic M, Posa M, Heinle H, Gojkovic-Bukarica L, Cvejic J. Solubilization of resveratrol in micellar solutions of different bile acids. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2009;72(1):148-54.

Aura AM, Mattila I, Hyotylainen T, Gopalacharyulu P, Bounsaythip C, Oresic M, et al. Drug metabolome of the simvastatin formed by human intestinal microbiota in vitro. *Mol Biosyst.* 2011;7(2):437-46.

Avdeef A. Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). *Curr Top Med Chem.* 2001;1(4):277-351.

Banerjee S, Mazumdar S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int J Anal Chem.* 2012;2012:40.

Bari SB, Kadam BR, Jaiswal YS, Shirkhedkar AA. Impurity profile: significance in active pharmaceutical ingredient. *Eurasian J Anal Chem.* 2007;2(1):32-53.

Basit AW, Podczeczek F, Newton JM, Waddington WA, Ell PJ, Lacey LF. The use of formulation technology to assess regional gastrointestinal drug absorption in humans. *Eur J Pharm Sci.* 2004;21(2):179-89.

Bertacche V, Milanese A, Nava D, Pini E, Stradi R. Structural elucidation of an unknown Simvastatin by-product in industrial synthesis starting from Lovastatin. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;45(4):642-7.

Berthelot M, Jungfleisch E. On the laws that operate for the partition of a substance between two solvents. *Ann Chim Phys.* 1872;26:396-407.

Berthod A, Carda-Broch S. Determination of liquid-liquid partition coefficients by separation methods. *J Chromatogr A.* 2004;1037(1):3-14.

Bhat KL, Garg A, Bock CW. Calculated values of the octanol-water partition coefficient and aqueous solubility for aminoazobenzene dyes and related structures. *Dyes Pigments.* 2002;52(2):145-59.

Blaut M, Clavel T. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *J Nutr.* 2007;137(3):751s-5s.

Blauw GJ, Lagaay AM, Smelt AH, Westendorp RG. Stroke, statins, and cholesterol a meta-analysis of randomized, placebo-controlled, double-blind trials with HMG-CoA reductase inhibitors. *Stroke.* 1997;28(5):946-50.

Bonetti PO, Lerman LO, Napoli C, Lerman A. Statin effects beyond lipid lowering--are they clinically relevant? *Eur Heart J.* 2003;24(3):225-48.

Breckenridge AM. Interindividual differences in the response to oral anticoagulants. *Drugs.* 1977;14(5):367-75.

Brod FC, Vernal J, Bertoldo JB, Terenzi H, Arisi AC. Cloning, expression, purification, and characterization of a novel esterase from *Lactobacillus plantarum*. *Mol Biotechnol*. 2010;44(3):242-9.

Bron PA, Marco M, Hoffer SM, Van Mullekom E, De Vos WM, Kleerebezem M. Genetic characterization of the bile salt response in *Lactobacillus plantarum* and analysis of responsive promoters in vitro and in situ in the gastrointestinal tract. *J Bacteriol*. 2004;186(23):7829-35.

Bull M, Plummer S, Marchesi J, Mahenthiralingam E. The life history of *Lactobacillus acidophilus* as a probiotic: a tale of revisionary taxonomy, misidentification and commercial success. *FEMS Microbiol Lett*. 2013;349(2):77-87.

Butler V, Neu H, Lindenbaum J. Digoxin-inactivating bacteria: identification in human gut flora. *Science*. 1983;220(4594):325-7.

Camenisch G, Alsenz J, Van De Waterbeemd H, Folkers G. Estimation of permeability by passive diffusion through Caco-2 cell monolayers using the drugs' lipophilicity and molecular weight. *Eur J Pharm Sci*. 1998;6(4):317-24.

Carey MC, Small DM. Micelle formation by bile salts: Physical-chemical and thermodynamic considerations. *Arch Intern Med*. 1972;130(4):506-27.

Carlsson L, Spjuth O, Adams S, Glen RC, Boyer S. Use of historic metabolic biotransformation data as a means of anticipating metabolic sites using MetaPrint2D and Bioclipse. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:362. doi: 10.1186/1471-2105-11-362.

Carlucci G, Mazzeo P, Biordi L, Bologna M. Simultaneous determination of simvastatin and its hydroxy acid form in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection. *J Pharmaceut Biomed*. 1992;10(9):693-7.

Chen C, Mireles RJ, Campbell SD, Lin J, Mills JB, Xu JJ, et al. Differential interaction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coa reductase inhibitors with ABCB1, ABCC2, and OATP1B1. *Drug Metab Dispos*. 2005;33(4):537-46.

Chen G, Yang L, Zhang H, Tucker IG, Fawcett JP. Effect of ketocholate derivatives on methotrexate uptake in Caco-2 cell monolayers. *Int J Pharm*. 2012;433(1-2):89-93.

Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*. 2012;148(6):1258-70.

Cruciani G, Pastor M, Guba W. VolSurf: a new tool for the pharmacokinetic optimization of lead compounds. *Eur J Pharm Sci*. 2000;11(2):S29-39.

De Preter V, Hamer HM, Windey K, Verbeke K. The impact of pre-and/or probiotics on human colonic metabolism: Does it affect human health? *Mol Nutr Food Res*. 2011;55(1):46-57.

Di L, Kerns EH. Profiling drug-like properties in discovery research. *Curr Opin Chem Biol*. 2003;7(3):402-8.

Djanic M, Pavlovic N, Stanimirov B, Stojančević T, Golocorbin-Kon S, Bojic G, et al. Docking-based preliminary study on the interactions of bile acids with drugs at the transporter level in intestinal bacteria. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016a;20(3):553-60.

Djanic M, Pavlovic N, Stanimirov B, Vukmirovic S, Nikolic K, Agbaba D, et al. The influence of bile salts on the distribution of simvastatin in the octanol/buffer system. *Drug Dev Ind Pharm*. 2016b;42(4):661-7.

Dolghih E, Bryant C, Renslo AR, Jacobson MP. Predicting binding to p-glycoprotein by flexible receptor docking. *PLoS Comput. Biol*. 2011;7(6):e1002083.

Drouault S, Corthier G, Ehrlich SD, Renault P. Survival, Physiology, and Lysis of *Lactococcus lactis* in the Digestive Tract. *Appl Environ Microb*. 1999;65(11):4881-6.

Dulfer WJ, Govers HA. Solubility and micelle-water partitioning of polychlorinated biphenyls in solutions of bile salt micelles. *Chemosphere*. 1995;30(2):293-306.

Ekins S, Mestres J, Testa B. In silico pharmacology for drug discovery: applications to targets and beyond. *Brit J Pharmacol*. 2007;152(1):21-37.

Elkins CA, Savage DC. CbsT2 from *Lactobacillus johnsonii* 100-100 is a transport protein of the major facilitator superfamily that facilitates bile acid antiport. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2003;6(2):76-87.

Emami J. In vitro-in vivo correlation: from theory to applications. *J Pharm Pharm Sci.* 2006;9(2):169-89.

Endo A. A gift from nature: the birth of the statins. *Nat Med.* 2008;14(10):1050-2.

Erić S, Kalinić M. Računarski modeli za predviđanje transporta lekova posredovanog P-glikoproteinom. *Arh Farm.* 2015;65:89-114.

Ertl P, Rohde B, Selzer P. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *J Med Chem.* 2000;43(20):3714-7.

European Pharmacopoeia 7th edition. Monograph on simvastatin (04/2009:1563).

Ferreira CL, Salminen S, Grzeskowiak L, Brizuela MA, Sanchez L, Carneiro H, et al. Terminology concepts of probiotic and prebiotic and their role in human and animal health. *Rev Salud Anim.* 2011;33(3):137-9.

Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastro Hepat.* 2012;9(10):577-89.

Fonarow GC, Wright RS, Spencer FA, Fredrick PD, Dong W, Every N, et al. Effect of statin use within the first 24 hours of admission for acute myocardial infarction on early morbidity and mortality. *Am J Cardiol* 2005;96(5):611-6.

Frishman WH, Horn J. Statin-drug interactions: not a class effect. *Cardiol Rev.* 2008;16(4):205-12.

Gambhire M, Bhalekar M, Shrivastava B. Bioavailability assessment of simvastatin loaded solid lipid nanoparticles after oral administration. *Asian J Pharm Sci.* 2011;6:251-8.

Gavini F, Pourcher AM, Neut C, Monget D, Romond C, Oger C, et al. Phenotypic differentiation of bifidobacteria of human and animal origins. *Int J Syst Bacteriol.* 1991;41(4):548-57.

Gazzerro P, Proto MC, Gangemi G, Malfitano AM, Ciaglia E, Pisanti S, et al. Pharmacological actions of statins: a critical appraisal in the management of cancer. *Pharmacol Rev.* 2012;64(1):102-46.

- Gilliland S, Nelson C, Maxwell C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol*. 1985;49(2):377-81.
- Gilliland S, Speck M. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. *Appl Environ Microbiol*. 1977;33(1):15-8.
- Gingell R, Bridges JW, Williams RT. Gut flora and the metabolism of prontosils in the rat. *Biochem J*. 1969;114(1):5P-6P.
- Goldin BR, Peppercorn MA, Goldman P. Contributions of host and intestinal microflora in the metabolism of L-dopa by the rat. *J Pharm Exp Ther*. 1973;186(1):160-6.
- Golocorbin-Kon S, Mikov M, Arafat M, Lepojevic Z, Mikov I, Sahman-Zaimovic M, et al. Cefotaxime pharmacokinetics after oral application in the form of 3 α , 7 α -dihydroxy-12-keto-5 β -cholanate microvesicles in rat. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2009;34(1):31-6.
- Gonzalez A, Stombaugh J, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Gordon JI, Knight R. The mind-body-microbial continuum. *Dialogues Clin Neurosci*. 2011;13(1):55-62.
- Gorbach S. Probiotics in the third millennium. *Digest Liver Dis*. 2002;34:S2-S7.
- Grbović L, Radenković M, Đokić J, Gojković-Bukarica L, Dragović GJ. New bearings in pharmacotherapeutic strategies: Pharmacogenetics and gene therapy. *Vojnosanit pregl*. 2007;64(10):707-13.
- Grundmann O. The gut microbiome and pre-systemic metabolism: current state and evolving research. *J Drug Metab Toxicol*. 2010;1:104. doi: 10.4172/2157-7609.1000104.
- Gueimonde M, Garrigues C, Van Sinderen D, Clara G, Margolles A. Bile-inducible efflux transporter from *Bifidobacterium longum* NCC2705, conferring bile resistance. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(10):3153-60.
- Gupta AK, Joshi M, Sabarwal N, Agrawal PY, Jain S. Novel prodrug of simvastatin as cascade latentiated inhibitor of HMG-COA reductase. *Asian J Pharm Clin Res*. 2012;5(1):50-2.
- Guvench O, Mackerell AD, Jr. Computational evaluation of protein-small molecule binding. *Curr Opin Struct Biol*. 2009;19(1):56-61.

Hardin C, Pogorelov TV, Luthey-Schulten Z. Ab initio protein structure prediction. *Curr Opin Struc Biol.* 2002;12(2):176-81.

Hartmann T, Schmitt J. Lipophilicity - beyond octanol/water: a short comparison of modern technologies. *Drug Discov Today Technol.* 2004;1(4):431-9.

Hirth D. A new combined LC (ESI+) MS/MS QTOF impurity fingerprinting and chemometrics approach for discriminating active pharmaceutical ingredient origins: example of simvastatin. *Analytical chemistry.* 2011;<dumas-00960820>.

Hofmann AF. Enterohepatic circulation of bile acids. American Physiological Society, 2011.

Holt R. The bacterial degradation of chloramphenicol. *Lancet.* 1967;289(7502):1259-60.

Hughes LD, Palmer DS, Nigsch F, Mitchell JB. Why are some properties more difficult to predict than others? A study of QSPR models of solubility, melting point, and Log P. *J Chem Inf Model.* 2008;48(1):220-32.

Jeger R, Dieterle T. Statins: have we found the Holy Grail. *Swiss Med Wkly.* 2012;142:w13515.

Guidelines for the evaluation of probiotics in food: report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London, Ontario, Canada. 2002, 2007.

Jones ML, Tomaro-Duchesneau C, Martoni CJ, Prakash S. Cholesterol lowering with bile salt hydrolase-active probiotic bacteria, mechanism of action, clinical evidence, and future direction for heart health applications. *Expert Opin Biol Ther.* 2013;13(5):631-42.

Joshi HN, Fakes MG, Serajuddin A. Differentiation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors by their relative lipophilicity. *Pharm Pharmacol Commun* 1999;5(4):269-71.

Kaddurah-Daouk R, Baillie RA, Zhu H, Zeng ZB, Wiest MM, Nguyen UT, et al. Enteric microbiome metabolites correlate with response to simvastatin treatment. *PLoS One.* 2011;6(10):e25482.

Kang MJ, Kim HG, Kim JS, Oh DG, Um YJ, Seo CS, et al. The effect of gut microbiota on drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2013;9(10):1295-308.

Kansara H, Panola R, Mishra A. Techniques used to Enhance Bioavailability of BCS Class II Drugs: A Review. *Int J Drug Dev Res.* 2015;7(1):82-93.

Karlson BW, Wiklund O, Palmer MK, Nicholls SJ, Lundman P, Barter PJ. Variability of low-density lipoprotein cholesterol response with different doses of atorvastatin, rosuvastatin, and simvastatin: results from VOYAGER. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother.* 2016;pvw006.

Karolewicz B, Gajda M, Owczarek A, Pluta J, Gorniak A. Physicochemical and dissolution studies of simvastatin solid dispersions with Pluronic F127. *Pharmazie.* 2014;69(8):589-94.

Kellogg GE, Joshi GS, Abraham DJ. New tools for modeling and understanding hydrophobicity and hydrophobic interactions. *Med Chem Res.* 1992;1:444-53.

Keppler K, Humpf HU. Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorg Med Chem.* 2005;13(17):5195-205.

Kim K, Yoon I, Chun I, Lee N, Kim T, Gwak HS. Effects of bile salts on the lovastatin pharmacokinetics following oral administration to rats. *Drug deliv.* 2011;18(1):79-83.

Kim KR, Oh DK. Production of hydroxy fatty acids by microbial fatty acid-hydroxylation enzymes. *Biotechnol Adv.* 2013;31(8):1473-85.

Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(11):935-49.

Kitzmiller JP, Binkley PF, Pandey SR, Suhy AM, Baldassarre D, Hartmann K. Statin pharmacogenomics: pursuing biomarkers for predicting clinical outcomes. *Discov med.* 2013;16(86):45.

Klaassen CD, Aleksunes LM. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol Rev.* 2010;62(1):1-96.

Kleerebezem M, Vaughan EE. Probiotic and gut lactobacilli and bifidobacteria: molecular approaches to study diversity and activity. *Annu Rev Physiol.* 2009;63:269-90.

Klünemann M, Schmid M, Patil KR. Computational tools for modeling xenometabolism of the human gut microbiota. *Trends Biotechnol.* 32(3):157-65.

Kourtesi C, Ball AR, Huang Y-Y, Jachak SM, Vera DMA, Khondkar P, et al. Suppl 1: Microbial efflux systems and inhibitors: approaches to drug discovery and the challenge of clinical implementation. *Open Microbiol J.* 2013;7:34.

Kuhajda I, Poša M, Jakovljević V, Ivetić V, Mikov M. Effect of 12-monoketocholic acid on modulation of analgesic action of morphine and tramadol. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2009;34(2):73-8.

Kuhajda K, Kandrak J, Kevresan S, Mikov M, Fawcett J. Structure and origin of bile acids: An overview. In: Mikov, M. & Fawcett, J. (eds.). *Bile acids: chemistry, biosynthesis, analysis, chemical and metabolic transformations and pharmacology.* Geneva: Mediset, 2007.

Kumar Basniwal P, Jain D. Simvastatin: review of updates on recent trends in pharmacokinetics, pharmacodynamics, drug-drug interaction, impurities and analytical methods. *Curr Pharm Anal.* 2012;8(2):135-56.

Kumar M, Nagpal R, Kumar R, Hemalatha R, Verma V, Kumar A, et al. Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Exp diabetes res.* 2012;2012.

Kumar P, Singh C. A study on solubility enhancement methods for poorly water soluble drugs. *Nature.* 2013;1(4):67-73.

Lalić-Popović M, Vasović V, Milijašević B, Goločorbin-Kon S, Al-Salami H, Mikov M. Deoxycholic acid as a modifier of the permeation of gliclazide through the blood brain barrier of a rat. *J Diabetes Res.* 2013;2013.

Lee HJ, Zhang H, Orlovich DA, Fawcett JP. The influence of probiotic treatment on sulfasalazine metabolism in rat. *Xenobiotica.* 2012;42(8):791-7.

Lee WJ, Hase K. Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nat Chem Biol.* 2014;10(6):416-24.

Lengauer T, Rarey M. Computational methods for biomolecular docking. *Curr Opin Struct Biol.* 1996;6(3):402-6.

- Leo A. Calculating log Poct from structures. *Chem Revs.* 1993;93(4):1281-306.
- Li H, Jia W. Cometabolism of microbes and host: implications for drug metabolism and drug-induced toxicity. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;94(5):574-81.
- Li S, He H, Parthiban LJ, Yin H, Serajuddin A. IV-IVC considerations in the development of immediate-release oral dosage form. *J Pharm Sci.* 2005;94(7):1396-417.
- Li X-Z, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs.* 2009;69(12):1555-623.
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64:4-17.
- Luckey TD. Introduction to intestinal microecology. *Am J Clin Nutr.* 1972;25(12):1292-4.
- Lukacova V, Peng M, Tandlich R, Hinderliter A, Balaz S. Partitioning of organic compounds in phases imitating the headgroup and core regions of phospholipid bilayers. *Langmuir.* 2006;22(4):1869-74.
- Ma Q, Lu AY. Pharmacogenetics, pharmacogenomics, and individualized medicine. *Pharmacol Rev.* 2011;63(2):437-59.
- Madjd A, Taylor MA, Mousavi N, Delavari A, Malekzadeh R, Macdonald IA, et al. Comparison of the effect of daily consumption of probiotic compared with low-fat conventional yogurt on weight loss in healthy obese women following an energy-restricted diet: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2015:ajcn120170.
- Maeda K, Sugiyama Y. Transporter biology in drug approval: regulatory aspects. *Mol Aspects Med.* 2013;34(2-3):711-8.
- Malenović A, Jančić-Stojanović B, Ivanović D, Medenica M. Forced degradation studies of simvastatin using microemulsion liquid chromatography. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2010;33(4):536-47.
- Malenović A, Medenica M, Ivanović D, Jančić B. Monitoring of simvastatin impurities by HPLC with microemulsion eluents. *Chromatographia.* 2006;63(13):S95-S100.

Mälkiä A, Murtomäki L, Urtti A, Kontturi K. Drug permeation in biomembranes: in vitro and in silico prediction and influence of physicochemical properties. *Eur J Pharm Sci.* 2004;23(1):13-47.

Mann GV, Spoerry A. Studies of a surfactant and cholesteremia in the Maasai. *Am J Clin Nutr.* 1974;27(5):464-9.

Margolles A, Florez AB, Moreno JA, Van Sinderen D, De Los Reyes-Gavilan CG. Two membrane proteins from *Bifidobacterium breve* UCC2003 constitute an ABC-type multidrug transporter. *Microbiology.* 2006;152(Pt 12):3497-505.

Marik PE. Colonic flora, probiotics, obesity and diabetes. *Front Endocrinol.* 2012;3:87. doi: 10.3389/fendo.2012.00087

Marin L, Miguelez EM, Villar CJ, Lombo F. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *Biomed Res Int.* 2015;2015:905215.

Mathur S, Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *Int J Food Microbiol.* 2005;105(3):281-95.

Mazzanti R, Fantappiè O, Kamimoto Y, Gatmaitan Z, Gentilini P, Arias IM. Bile acid inhibition of P-glycoprotein-mediated transport in multidrug-resistant cells and rat liver canalicular membrane vesicles. *Hepatology.* 1994;20(1):170-6.

Meaney C, O'driscoll C. A comparison of the permeation enhancement potential of simple bile salt and mixed bile salt: fatty acid micellar systems using the CaCo-2 cell culture model. *Int J Pharm.* 2000;207(1):21-30.

Mehmeti I, Kiran F, Osmanagaoglu O. Comparison of three methods for determination of protein concentration in lactic acid bacteria for proteomics studies. *Afr J Biotechnol.* 2013;10(11):2178-1285.

Metchnikoff L 2004. *The prolongation of life: Optimistic studies* (reprinted edition 1907). New York, NY, USA: Springer.

Meyer VR. *Practical high-performance liquid chromatography*. Chichester, UK, John Wiley & Sons, 2013.

- Mikov M. The metabolism of drugs by the gut flora. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1994;19(3):201-7.
- Mikov M, Fawcett JP. Bile acids. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2006;31(3):133-4.
- Mikov M, Kevresan S, Kuhajda K, Jakovljevic V, Vasovic V. 3a, 7a-Dihydroxy-12-oxo-5b-cholanate as blood-brain barrier permeator. *Pol J Pharmacol.* 2004;56:367-71.
- Mikov M, Lee HJ, Fawcett JP. The influence of probiotic treatment on sulfasalazine metabolism in rat gut contents. *Asian J Pharmacodynam Pharmacokinet.* 2006;6(4):337-42.
- Miljkovic D, Kuhajda K, Mikov M, Kevresan S, Sabo A 2000. Bile acids and their derivatives as glycoregulatory agents. Google Patents.
- Million M, Maraninchi M, Henry M, Armougom F, Richet H, Carrieri P, et al. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *Int J Obes.* 2012;36(6):817-25.
- Monte MJ, Marin JJ, Antelo A, Vazquez-Tato J. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol.* 2009;15(7):804-16.
- Mozaffarian D, Nye R, Levy WC. Statin therapy is associated with lower mortality among patients with severe heart failure. *Am J Cardiol.* 2004;93(9):1124-9.
- Mukhopadhyay S, Maitra U. Chemistry and biology of bile acids. *Curr Sci.* 2004;87(12):1666-83.
- Myers SP. The causes of intestinal dysbiosis: a review. *Altern Med Rev.* 2004;9(2):180-97.
- Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje lipidskih poremećaja, Beograd, Ministarstvo zdravlja Republike Srbije, 2012.
- Nigović B, Mornar A, Sertić M. A Review of Current Trends and Advances in Analytical Methods for Determination of Statins: Chromatography and Capillary Electrophoresis. In: Calderon, L. (ed.). *Chromatography-the most versatile method of chemical analysis.* InTech, 2012.
- Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science.* 1994;264(5157):382-8.

Novakova L, Šatínský D, Solich P. HPLC methods for the determination of simvastatin and atorvastatin. *Trends Analyt Chem.* 2008;27(4):352-67.

Oelschlaeger TA. Mechanisms of probiotic actions—a review. *Int J Med Microbiol.* 2010;300(1):57-62.

Okuda H, Ogura K, Kato A, Takubo H, Watabe T. A possible mechanism of eighteen patient deaths caused by interactions of sorivudine, a new antiviral drug, with oral 5-fluorouracil prodrugs. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;287(2):791-9.

Ooi L-G, Liong M-T. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. *Int J Mol Sci.* 2010;11(6):2499-522.

Palinski W. New evidence for beneficial effects of statins unrelated to lipid lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(1):3-5.

Patterson AD, Turnbaugh PJ. Microbial determinants of biochemical individuality and their impact on toxicology and pharmacology. *Cell Metab.* 2014;20(5):761-8.

Pavlović N, Stankov K, Mikov M. Probiotics—interactions with bile acids and impact on cholesterol metabolism. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012;168(7):1880-95.

Pearlman RS. Rapid generation of high quality approximate 3D molecular structures. *Chem Des Autom News.* 1987;2:5-7.

Petronijević M, Pokrajac M, Miljković B, Vučićević K. Biofarmaceutski sistem klasifikacije (BSK) kao osnova za selektivni pristup ispitivanju biološke raspoloživosti/biološke ekvivalentnosti (BA/BE) farmaceutskih preparata. *Arh Farm.* 2006;56(1):1-15.

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25(13):1605-12.

Pfeiler EA, Klaenhammer TR. Role of transporter proteins in bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(18):6013-6.

Plumb RS, Jones MD, Rainville P, Castro-Perez JM. The rapid detection and identification of the impurities of simvastatin using high resolution sub 2 μm particle LC coupled to hybrid

quadrupole time of flight MS operating with alternating high-low collision energy. *J Sep Sci.* 2007;30(16):2666-75.

Posa M. QSPR study of the effect of steroidal hydroxy and oxo substituents on the critical micellar concentration of bile acids. *Steroids.* 2011;76(1-2):85-93.

Posa M, Kevresan S, Mikov M, Cirin-Novta V, Kuhajda K. Effect of cholic acid and its keto derivatives on the analgesic action of lidocaine and associated biochemical parameters in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2007a;32(2):109-17.

Posa M, Kevresan S, Mikov M, Cirin-Novta V, Sarbu C, Kuhajda K. Determination of critical micellar concentrations of cholic acid and its keto derivatives. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2007b;59(2):179-83.

Price CE, Reid SJ, Driessen AJ, Abratt VR. The *Bifidobacterium longum* NCIMB 702259T *ctr* gene codes for a novel cholate transporter. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(1):923-6.

Prueksaritanont T, Ma B, Yu N. The human hepatic metabolism of simvastatin hydroxy acid is mediated primarily by CYP3A, and not CYP2D6. *Br J Clin Pharmacol.* 2003;56(1):120-4.

Prueksaritanont T, Qiu Y, Mu L, Michel K, Brunner J, Richards KM, et al. Interconversion pharmacokinetics of simvastatin and its hydroxy acid in dogs: effects of gemfibrozil. *Pharm Res.* 2005;22(7):1101-9.

Putman M, Van Veen HW, Konings WN. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64(4):672-93.

Raevsky OA, Schaper K-J. Quantitative estimation of hydrogen bond contribution to permeability and absorption processes of some chemicals and drugs. *Eur J Med Chem.* 1998;33(10):799-807.

Randazzo CL, Pitino I, Licciardello F, Muratore G, Caggia C. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* probiotic strains in peach jam during storage at different temperatures. *Food Sci Technol.* 2013;33:652-9.

Reddy GV, Kumar AP, Reddy BV, Sreeramulu J. Application of ion-trap mass spectrometry for identification and structural determination of an unknown impurity in simvastatin. *Pharmazie.* 2009;64(10):638-41.

Reiner Ž, De Backer G, Fras Z. EUROASPIRE IV survey reveals much room for improvement in guideline-recommended statin prescription. *Atherosclerosis*. 2016;246:243-50.

Ren Q, Chen K, Paulsen IT. TransportDB: a comprehensive database resource for cytoplasmic membrane transport systems and outer membrane channels. *Nucleic Acids Res*. 2007; 35(Database issue):D274–9.

Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res*. 2006;47(2):241-59.

Roda A, Hofmann AF, Mysels KJ. The influence of bile salt structure on self-association in aqueous solutions. *J Biol Chem*. 1983;258(10):6362-70.

Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc*. 2010;5(4):725-38.

Saad R, Rizkallah MR, Aziz RK. Gut Pharmacomicrobiomics: the tip of an iceberg of complex interactions between drugs and gut-associated microbes. *Gut Pathog*. 2012;4(1):16.

Sakamoto K, Margolles A, Van Veen HW, Konings WN. Hop resistance in the beer spoilage bacterium *Lactobacillus brevis* is mediated by the ATP-binding cassette multidrug transporter HorA. *J Bacteriol*. 2001;183(18):5371-5.

Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2008;134(2):577-94.

Savjani KT, Gajjar AK, Savjani JK. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *ISRN Pharm*. 2012;2012.

Schomburg I, Chang A, Schomburg D. BRENDA, enzyme data and metabolic information. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(1):47-9.

Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*. 2010;90(3):859-904.

Sender R, Fuchs S, Milo R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*. 2016;164(3):337-40.

Serajuddin A, Ranadive SA, Mahoney EM. Relative lipophilicities, solubilities, and structure-pharmacological considerations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a (HMG-COA) reductase inhibitors pravastatin, lovastatin, mevastatin, and simvastatin. *J Pharm Sci.* 1991;80(9):830-4.

Shargel L, Yu ABC. *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics, Seventh Edition.* New York: McGraw-Hill Education, 2016.

Sharma P, Varma MV, Chawla HP, Panchagnula R. Absorption enhancement, mechanistic and toxicity studies of medium chain fatty acids, cyclodextrins and bile salts as peroral absorption enhancers. *Farmaco.* 2005;60(11-12):884-93.

Shawahna R, Rahman N. Evaluation of the use of partition coefficients and molecular surface properties as predictors of drug absorption: a provisional biopharmaceutical classification of the list of national essential medicines of Pakistan. *Daru.* 2011;19(2):83-99.

Shoghi E, Fuguet E, Bosch E, Rafols C. Solubility-pH profiles of some acidic, basic and amphoteric drugs. *Eur J Pharm Sci.* 2013;48:291-300.

Sievänen E. Exploitation of bile acid transport systems in prodrug design. *Molecules.* 2007;12(8):1859-89.

Simonović BR, Momirović M. Determination of critical micelle concentration of bile acid salts by micro-calorimetric titration. *Microchim Acta.* 1997;127(1-2):101-4.

Sirtori CR, Mombelli G, Triolo M, Laaksonen R. Clinical response to statins: mechanism (s) of variable activity and adverse effects. *Annals of medicine.* 2012;44(5):419-32.

Small DM, Dowling RH, Redinger RN. The enterohepatic circulation of bile salts. *Arch Intern Med.* 1972;130(4):552-73.

Smith G, Griffiths L. Metabolism of N-acylated and O-alkylated drugs by the intestinal microflora during anaerobic incubation in vitro. *Xenobiotica.* 1974;4(8):477-87.

Sousa SF, Fernandes PA, Ramos MJ. Protein-ligand docking: current status and future challenges. *Proteins: Struct, Funct, Bioinf.* 2006;65(1):15-26.

Sousa T, Paterson R, Moore V, Carlsson A, Abrahamsson B, Basit AW. The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs. *Int J Pharm.* 2008;363(1):1-25.

Speck M. Interactions among lactobacilli and man. *J Dairy Sci.* 1976;59(2):338-43.

Stain-TeXier F, Sandouk P, Scherrmann JM. Intestinal absorption and stability of morphine 6-glucuronide in different physiological compartments of the rat. *Drug Metab Dispos.* 1998;26(5):383-7.

Stancu C, Sima A. Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med.* 2001;5(4):378-87.

Stanimirov B, Stankov K, Mikov M. Pleiotropic functions of bile acids mediated by the farnesoid X receptor. *Acta Gastroenterol Belg.* 2012;75(4):389-98.

Stanimirov B, Stankov K, Mikov M. Bile acid signaling through farnesoid X and TGR5 receptors in hepatobiliary and intestinal diseases. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2015;14(1):18-33.

Stella V, Borchardt R, Hageman M, Oliyai R, Maag H, Tilley J. *Prodrugs: challenges and rewards.* Springer Science & Business Media, 2007.

Stepanov V, Stankov K, Mikov M. The bile acid membrane receptor TGR5: a novel pharmacological target in metabolic, inflammatory and neoplastic disorders. *J Recept Signal Transduct Res.* 2013;33(4):213-23.

Stojančević M, Bojić G, Al-Salami H, Mikov M. The influence of intestinal tract and probiotics on the fate of orally administered drugs. *Curr Issues Mol Biol.* 2013a;4(16):2.

Stojančević M, Pavlović N, Goločorbin-Kon S, Mikov M. Application of bile acids in drug formulation and delivery. *Front Life Sci.* 2013b;7(3-4):112-22.

Stojančević M, Stankov K, Mikov M. The impact of farnesoid X receptor activation on intestinal permeability in inflammatory bowel disease. *Can J Gastroenterol.* 2012;26(9):631.

Strong H, Oates J, Sembi J, Renwick A, George C. Role of the gut flora in the reduction of sulfinpyrazone in humans. *J Pharmacol Exp Ther.* 1984;230(3):726-32.

Takeo S, Sakai T. Involvement of the intestinal microflora in nitrazepam-induced teratogenicity in rats and its relationship to nitroreduction. *Teratology*. 1991;44(2):209-14.

Taylor RD, Jewsbury PJ, Essex JW. A review of protein-small molecule docking methods. *J Comput Aided Mol Des*. 2002;16(3):151-66.

Tobert JA. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(7):517-26.

Triolo A, Altamura M, Dimoulas T, Guidi A, Lecci A, Tramontana M. In vivo metabolite detection and identification in drug discovery via LC-MS/MS with data-dependent scanning and postacquisition data mining. *J Mass Spectrom*. 2005;40(12):1572-82.

Tsigarida E, Nychas GJ. Ecophysiological attributes of a *Lactobacillus* sp. and a *Pseudomonas* sp. on sterile beef fillets in relation to storage temperature and film permeability. *J Appl Microbiol*. 2001;90(5):696-705.

Tubic-Grozdanis M, Hilfinger JM, Amidon GL, Kim JS, Kijek P, Staubach P, et al. Pharmacokinetics of the CYP 3A substrate simvastatin following administration of delayed versus immediate release oral dosage forms. *Pharm Res*. 2008;25(7):1591-600.

Vasiljevic T, Shah NP. Probiotics—from Metchnikoff to bioactives. *Int Dairy J*. 2008;18(7):714-28.

Vrieze A, Holleman F, Zoetendal E, De Vos W, Hoekstra J, Nieuwdorp M. The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia*. 2010;53(4):606-13.

Wang H, Wu Y, Zhao Z. Fragmentation study of simvastatin and lovastatin using electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2001;36(1):58-70.

Weng TC, Yang YHK, Lin SJ, Tai SH. A systematic review and meta-analysis on the therapeutic equivalence of statins. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*. 2010;35(2):139-51.

Wilson I, Nicholson J. The role of gut microbiota in drug response. *Curr Pharm Des*. 2009;15(13):1519-23.

Wong GKC, Poon WS. The biochemical basis of hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitors as neuroprotective agents in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Pharmaceuticals*. 2010;3(10):3186-99.

Xiang Z. Advances in homology protein structure modeling. *Curr Protein Pept Sc*. 2006;7(3):217.

Yang DJ, Hwang LS. Study on the conversion of three natural statins from lactone forms to their corresponding hydroxy acid forms and their determination in Pu-Erh tea. *J Chromatogr A*. 2006;1119(1-2):277-84.

Yang L, Fawcett JP, Østergaard J, Zhang H, Tucker IG. Mechanistic studies of the effect of bile salts on rhodamine 123 uptake into RBE4 cells. *Mol Pharm*. 2011a;9(1):29-36.

Yang L, Zhang H, Fawcett JP, Mikov M, Tucker IG. Effect of bile salts on the transport of morphine-6-glucuronide in rat brain endothelial cells. *J Pharm Sci*. 2011b;100(4):1516-24.

Yang L, Zhang H, Mikov M, Tucker IG. Physicochemical and biological characterization of monoketocholic acid, a novel permeability enhancer. *Mol Pharm*. 2009;6(2):448-56.

Yoo DH, Kim IS, Van Le TK, Jung IH, Yoo HH, Kim DH. Gut microbiota-mediated drug interactions between lovastatin and antibiotics. *Drug Metab Dispos*. 2014;42(9):1508-13.

Yoshinari M, Matsuzaka K, Hashimoto S, Ishihara K, Inoue T, Oda Y, et al. Controlled release of simvastatin acid using cyclodextrin inclusion system. *Dent Mater J*. 2007;26(3):451-6.

Zaidi AH, Bakkes PJ, Lubelski J, Agustiandari H, Kuipers OP, Driessen AJ. The ABC-type multidrug resistance transporter LmrCD is responsible for an extrusion-based mechanism of bile acid resistance in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol*. 2008;190(22):7357-66.

Zamora I. Molecular Descriptors for Predicting ADMET Properties. In: Testa, B. & Turski, L. (eds.). *Virtual ADMET Assessment in Target Selection and Maturation*. Amsterdam: IOS Press, 2006.

Zeino M, Saeed ME, Kadioglu O, Efferth T. The ability of molecular docking to unravel the controversy and challenges related to P-glycoprotein--a well-known, yet poorly understood drug transporter. *Invest New Drugs*. 2014;32(4):618-25.

8. PRILOG

PUBLIKOVANI RADOVI

1. Đanić M, Pavlović N, Stanimirov B, Vukmirović S, Nikolić K, Agbaba D, Mikov M. The influence of bile salts on the distribution of simvastatin in octanol/buffer system. *Drug Dev Ind Pharm.* 2016;42(4):661-7. (M22; IF 2015=2,429)
2. Đanić M, Pavlović N, Stanimirov B, Stojančević T, Goločorbin-Kon S, Bojić G, Mikov M. Docking-based preliminary study on the interactions of bile acids with drugs at the transporter level in intestinal bacteria. *Eur Rev Med Pharmacol.* 2016;20(3):553-60. (M23; IF 2015=1,575)
3. Stojančević M, Bojić G, Salami HA, Mikov M. The Influence of Intestinal Tract and Probiotics on the Fate of Orally Administered Drugs. *Curr Issues Mol Biol.* 2013;16(2):55-68. (M21; IF 2013=6,000)
4. Stojančević M, Pavlović N, Goločorbin-Kon S, Mikov M. Application of bile acids in drug formulation and delivery. *Front Life Sci (HFSP Journal).* 2013; 7(3-4):112-22. (M21; IF 2012=1,471)
5. Mooranian A, Negrulj R, Mathavan S, Martinez J, Sciarretta J, Chen-Tan N, Mukkur TK, Mikov M, Lalic-Popovic M, Stojančević M, Golocorbin-Kon S, Al-Salami H. An advanced microencapsulated system: a platform for optimized oral delivery of antidiabetic drug-bile acid formulations. *Pharm Dev Technol.* 2015;20(6):702-9. (M23; IF 2015= 1,566)
6. Mooranian A, Negrulj R, Mathavan S, Martinez J, Sciarretta J, Chen-Tan N, Mukkur T, Mikov M, Lalic-Popovic M, Stojančević M, Golocorbin-Kon S, Al-Salami H. Stability and Release Kinetics of an Advanced Gliclazide-Cholic Acid Formulation: The Use of Artificial-Cell Microencapsulation in Slow Release Targeted Oral Delivery of Antidiabetics. *J Pharm Innov.* 2014;9:150-7. (M23; IF 2014=1,000)
7. Stojančević M, Stankov K, Mikov M. The impact of farnesoid X receptor activation on intestinal permeability in inflammatory bowel disease. *Can J Gastroenterol.* 2012; 26(9): 631-7. (M23; IF 2012=1,532)

RESEARCH ARTICLE

The influence of bile salts on the distribution of simvastatin in the octanol/buffer system

Maja Đanić¹, Nebojša Pavlović¹, Bojan Stanimirov¹, Saša Vukmirović¹, Katarina Nikolić², Danica Agbaba², and Momir Mikov^{1,3}¹Department of Pharmacology, Toxicology and Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Novi Sad, Serbia, ²Institute of Pharmaceutical Chemistry and Drug Analysis, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia, and ³Curtin Health Innovation Research Institute, School of Pharmacy, Curtin University, Perth, WA, Australia**Abstract**

Introduction: Distribution coefficient (D) is useful parameter for evaluating drugs permeability properties across biological membranes, which are of importance for drugs bioavailability. Given that bile acids are intensively studied as drug permeation-modifying and -solubilizing agents, the aim of this study was to estimate the influence of sodium salts of cholic (CA), deoxycholic (DCA) and 12-monoketocholeic acids (MKC) on distribution coefficient of simvastatin (SV) (lactone [SVL] and acid form [SVA]) which is a highly lipophilic compound with extremely low water solubility and bioavailability.

Methods: LogD values of SVA and SVL with or without bile salts were measured by liquid–liquid extraction in *n*-octanol/buffer systems at pH 5 and 7.4. SV concentrations in aqueous phase were determined by HPLC-DAD. Chem3D Ultra program was applied for computation of physico-chemical properties of analyzed compounds and their complexes.

Results: Statistically significant decrease in both SVA and SVL logD was observed for all three studied bile salts at both selected pH. MKC exerted the most pronounced effect in the case of SVA while there were no statistically significant differences between observed bile salts for SVL. The calculated physico-chemical properties of analyzed compounds and their complexes supported experimental results.

Conclusions: Our data indicate that the addition of bile salts into the *n*-octanol/buffer system decreases the values of SV distribution coefficient at both studied pH values. This may be the result of the formation of hydrophilic complexes increasing the solubility of SV that could consequently impact the pharmacokinetic parameters of SV and the final drug response in patients.

Keywords

Bile salts, distribution coefficient, drug transport, hydrophilicity, simvastatin

History

Received 4 March 2015

Revised 24 June 2015

Accepted 25 June 2015

Published online 23 July 2015

Introduction

Predictions of pharmacokinetic properties and bioavailability, based on physico-chemical properties, are still a viable area of contemporary research. They are important for a fast and simple biopharmaceutical assessment during drug discovery¹. The determination of partition coefficient of a drug candidate is mainly applied for evaluating its passive diffusional permeability properties across biological membranes which are of importance for its bioavailability². For drug candidates with ionization properties, partition coefficient is defined as the partitioning of neutral species between *n*-octanol and aqueous buffer. Octanol is chosen as an appropriate model of lipid phase because it most

closely simulates the properties of biological membranes. Thus, partition coefficient is a constant and refers to molecules or species partitioning between two immiscible phases³.

For drugs that are weak acids or weak bases (approximately 80% of drugs) which can ionize, we can more properly understand their lipophilicity using distribution coefficient that quantifies pH-dependent behavior of these drugs, thus giving more appropriate description of the complex octanol/buffer partitioning equilibria^{4,5}. Distribution coefficient of drug candidates is related to partition coefficient but refers to total species distribution between two immiscible phases, regardless of its chemical form⁶. As a measure of hydrophobicity, the logarithm of the octanol/buffer distribution coefficient (logD) is commonly reported in the literature. LogD values of compounds have been widely used in numerous quantitative structure–activity relationship models for predicting the pharmaceutical properties of molecules⁷.

Simvastatin (SV) is a drug from the group of statins, a class of cholesterol-lowering drugs used to manage and prevent

Address for correspondence: Maja Đanić, Department of Pharmacology, Toxicology and Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Serbia. Tel: +381 21 522 172. E-mail: majadjanic@gmail.com

Docking-based preliminary study on the interactions of bile acids with drugs at the transporter level in intestinal bacteria

M. DJANIC¹, N. PAVLOVIC¹, B. STANIMIROV¹, T. STOJANCEVIC^{2,3},
S. GOLOCORBIN-KON⁴, G. BOJIC⁵, M. MIKOV^{1,6}

¹Department of Pharmacology, Toxicology and Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Serbia

²Department of Mathematics and Informatics, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Serbia

³Department of Fundamentals Sciences, Faculty of Technical Sciences, University of Novi Sad, Serbia

⁴Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Serbia

⁵Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Serbia

⁶School of Pharmacy, Curtin Health Innovation Research Institute, Curtin University, Perth WA, Australia

Abstract. – OBJECTIVE: The aim of this study was to estimate the binding-affinities of different bile acids towards drug transporters in *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum* in order to predict the influence of bile acids and probiotics interactions on drug pharmacokinetics.

MATERIALS AND METHODS: In order to study interactions of bile acids with transporters of intestinal bacteria, molecular-docking step was performed, using SwissDock web-service. For the purpose of comparison, two natural bile acids, cholic acid (CA) and deoxycholic acid (DCA), and one semi-synthetic bile acid, 12-monoketocholeic acid (MKC), were studied in parallel. The free-binding energy was used as the main criterion for ranking ligands.

RESULTS: Studied bile acids exhibited different binding affinities towards bacterial transporters with MKC showing the most prominent effect. For the majority of studied transporters, the estimated affinities of bile acids decreased in the following order: MKC–CA–DCA. Namely, 38.7% of examined transport proteins gave the lowest free-binding energy with MKC. The weak inverse relationship between numbers of hydrogen bonds and estimated free-binding energies was revealed.

CONCLUSIONS: The predominant effect of MKC for the majority of studied transport proteins suggests that keto group at carbon 12 of the steroid core has a significant influence on the properties of MKC and consequently, on interactions with membrane transporters. Present findings might have a role in the prediction of potential influence of bile acids and probiotics on drug pharmacokinetics.

Key Words:

Docking study, Probiotics, Transport proteins, Bile acids, Drug transport.

Introduction

Peroral administration of drugs is by far the most favorable route for drug delivery considering the issues of safety and convenience in administration. For orally administered drugs, good bioavailability and low intra- and inter-patient variability are desirable characteristics. It is well known that poor drug bioavailability is one of the major causes of therapeutic variability, associated with the variable drug exposure¹.

Intestinal microflora provides a rich source of inter- and intra- individual differences in drug metabolism². Namely, gut microflora can be regarded as a complex ecosystem composed of 10¹³ to 10¹⁴ microorganisms with huge metabolic capacity, qualitatively and quantitatively different from the body cells and organs^{3,4}. There is a substantial body of evidence that microbiomes vary between populations and individuals with measurable consequences on pharmacokinetic properties of drugs⁵. Each individual organism is thought to develop a unique and complex intestinal flora profile (i.e. “bacterial fingerprint”), which is affected by a number of factors including genetic background, diet, medications, disease and environmental exposure⁶.

The Influence of Intestinal Tract and Probiotics on the Fate of Orally Administered Drugs

Maja Stojančević^{1*}, Gordana Bojić², Hani Al Salami^{3,4} and Momir Mikov^{1,3,5}

¹Department of Pharmacology, Toxicology and Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Serbia

²Department of Microbiology, Institute of Public Health, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Serbia

³School of Pharmacy, Curtin Health Innovation Research Institute, Curtin University, Perth WA, Australia

⁴Faculty of Health Science, Central Queensland University, Queensland, Australia

⁵School of Pharmacy, University of Montenegro, Montenegro

Abstract

Although the liver has long been considered as a main organ responsible for drug metabolism, the role of the gut metabolizing enzymes and the gut microflora is becoming more profoundly evident in drug metabolism, absorption and overall efficacy. This review will explore various mechanisms by which the gut-microflora influences drug pharmacokinetics including biotransformation, bioactivation, and biodegradation as well as up- or down-regulation of the epithelial transporters. The gut-luminal fluids, intestinal mucosa and gut microflora contain high concentrations of various enzymes which are responsible for the oxidation, hydrolysis and conjugation of drugs. Such metabolic reactions may lead to either drug over- or under-dosing, which impacts the drugs efficacy and safety. The processes, by which the intestinal enzymes and gut-protein transporters influence drug pharmacokinetic parameters, will be detailed. Since the intestinal microflora plays an important role in physiological, nutritional, metabolic, and immunological processes in human body, there is currently some interest in the manipulation of its composition and activity by administering probiotics. This review will also examine the capacity of probiotics to interact with resident microbial community, affecting the respective enzymes or by providing their own specific enzymatic activities that may consequently change the bioavailability and pharmacological activity of concomitantly taken drugs.

Introduction

In general, the most common and desirable way of drug administration is the oral route, since it is the easiest and most convenient way of drug application, and many drugs are well absorbed by the gastrointestinal tract (Sastray et al., 2000). Factors that may influence intestinal absorption include the intestinal mucosa (Bourlioux et al., 2003), drug properties such as solubility and permeability, formulation, and physiological variables such as regional pH and intestinal motility. Clearly, good bioavailability and low intra- and inter-patient variability are desirable for oral drug delivery. Preclinical investigations of potentially new

drugs should be designed to describe intestinal absorption mechanisms and to predict oral pharmacokinetics. The gastrointestinal tract functions as a bioactive membrane which prevents toxic and harmful xenobiotics from reaching the systemic circulation, while at the same time digesting and selectively absorbing essential nutrients, fluids, and electrolytes (Li and Hidalgo, 1996). Hence, physical barriers in the GIT as well as pharmacokinetic properties of the drug are the main factors that influence oral drug absorption.

Moreover, oral bioavailability of drugs is significantly influenced by the rate of *in vitro* dissolution, as well as body physiology such as the integrity of the gastrointestinal tract, physiological status, gastrointestinal motility, site of drug absorption, membrane transporters, presystemic drug metabolism, the effect of food or concomitant medication (Lee et al., 2001; Martinez and Amidon, 2002). For an orally administered drug to be absorbed it must be released from the dosage form, dissolved in the gastrointestinal fluids, remain intact in the gastrointestinal lumen and cross the epithelial membrane (Sousa et al., 2008). Anatomical, physiological, and biochemical factors that affect the dissolution, stability, absorption and presystematic elimination of drugs vary through the gastrointestinal tract (Lennernäs, 2010). Besides the role in drug absorption, intestine has a huge influence on drug biotransformation due to presence of numerous enzymes; in particular, those produced by the gut microflora (Rowland, 1988; Goldin, 1990; Laube et al., 2000).

One of the first recognized and mostly studied interactions of intestinal bacteria with drugs is in the case of anticoagulant therapy. Namely, intestinal bacteria has the role in the synthesis of vitamin K. Broad spectrum of antibiotics, by decreasing the population of bacterial flora in the gut, can remove an important source of this vitamin. Vitamin K deficiency may consequently enhance the anticoagulant therapy action causing clinically significant adverse events (Conly and Stein, 1992).

The aim of this review is to summarize the current knowledge regarding drug-presystemic metabolism in the gut, and elucidate the role of intestinal microbiota, enterocytes, transporters and various gut-enzymes on the fate of orally administered drugs. The review will also focus on probiotics as gut-conditioning agents, to modify the gut microfloral composition and activity and which brings about a change of the pharmacokinetics of administered drugs.

Drug metabolism at intestinal level

The liver is known to be the major organ responsible for drug metabolism and biotransformation. However, drug metabolism may start at the intestinal level, which can bring about a significant effect on the drugs efficacy and safety. The combined activity of drug transporters and metabolic enzymes present in luminal fluids and in the intestinal mucosa (Figure 1) have shown to significantly influence pharmacokinetic profile of a range of drugs and result in increased toxicity due to reduced metabolism,

PERSPECTIVE

Application of bile acids in drug formulation and delivery

Maja Stojančević^{a*}, Nebojša Pavlović^a, Svetlana Goločorbin-Kon^b and Momir Mikov^{a,c}^aDepartment of Pharmacology, Toxicology and Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Serbia; ^bDepartment of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Serbia; ^cSchool of Pharmacy, Curtin Health Innovation Research Institute, Curtin University, Perth WA, Australia

(Received 16 October 2013; accepted 30 December 2013)

Bile acids are naturally produced in humans and are known to provide human health benefits through their endocrinological, microfloral, metabolic and other effects that are still to be elucidated. In recent years, there has been a growing interest in using bile acids as absorption enhancers for drug delivery. Bile acids are amphiphilic molecules with a unique ability to facilitate and promote drug permeation through biological membranes. The role of bile acids in promoting drug permeation has been experimentally illustrated in various pharmaceutical formulations including oral, nasal, ocular, buccal, pulmonary and rectal delivery as well as through the blood–brain barrier. Recently, bile acids have drawn attention in the field of drug delivery due to their ability to act as a drug carrier system in the form of mixed micelles, bilosomes and chemical conjugates with drug molecules. Bile acids have demonstrated a unique ability to enhance the epithelial transport of hydrophilic drugs through the paracellular route and that of hydrophobic compounds through both paracellular and transcellular routes. The aim of this review is to discuss various chemical and pharmaceutical aspects of BAs and their potential applications in drug formulation and delivery.

Keywords: bile acids; absorption enhancers; drug delivery; drug bioavailability; pharmaceutical formulations**Introduction**

The unique and distinguishable structure and physicochemical properties of bile acids have enabled them to be used in the development of drugs, as pharmaceutical tools and potential drug carrier systems that could improve, control and localize drug delivery. Over the last decades the interest in bile acids has increased considerably, becoming the focus of intensive research in a variety of different fields (Monte et al. 2009; Pavlović et al. 2012; Stojančević et al. 2012; Stanimirov et al. 2012). Since the lipid-based drug delivery system is one of the most popular approaches to overcome absorption barriers, many lipids, including bile acids, attract continuous attention in the improvement of the bioavailability of drugs, as will be discussed (Nanjwade et al. 2011).

This article aims to provide an overview of the current knowledge related to use of bile acids, their salts and various derivatives as drug penetration modifiers and consequently their potential applications in pharmaceutical dosage forms, which is summarized in Table 1.

Amphiphilic properties of bile acid molecules

Bile acids have a specific chemical structure, different from ordinary aliphatic surfactants, due to the presence of a large, rigid, and planar hydrophobic moiety of a steroid

nucleus carrying 2–4 hydroxyl groups (Sugioka & Moroi 1998). Bile acids contain structural components that are hydrophilic on the concave α side and hydrophobic on the other, convex β side (Mikov & Fawcett 2007). Therefore, bile acids exhibit a great surface activity and, like all aliphatic molecules, can self-associate in water, thus forming polymolecular aggregates or micelles, as long as their concentrations are above a certain concentration, termed the critical micellar concentration (CMC). Each micelle contains 4–50 molecules, depending on the type and structure, which can solubilize other lipids as well as hydrophobic molecules in the form of mixed micelles (Darkoh et al. 2010). Bile acids show distinct behavior in terms of self-association and molecular solubilization, interaction with other substances, the CMC for a given bile salt being largely determined by its hydrophilic/hydrophobic balance (Kim et al. 2011). The hydrophobicity of bile salts and thus their CMC is determined by the number of hydroxyl groups and their stereospecific position in the molecule (Wüstner et al. 2000). The hydrophilicity of the common free and conjugated bile salts decreases in the order ursodeoxycholic acid (UDC) > cholic acid (CA) > chenodeoxycholic acid (CDC) > deoxycholic acid (DC) > lithocholic acid (LC), and taurine-conjugated > glycine-conjugated > free species (Monte et al. 2009). The inclusion of the lipophilic components decreases the CMC

*Corresponding author. Email: majastojancevic@gmail.com

RESEARCH ARTICLE

An advanced microencapsulated system: a platform for optimized oral delivery of antidiabetic drug-bile acid formulations

Armin Mooranian¹, Rebecca Negrulj¹, Sangeetha Mathavan¹, Jorge Martinez², Jessica Sciarretta¹, Nigel Chen-Tan³, T. K. Mukkur⁴, Momir Mikov^{5,6}, Mladena Lalic-Popovic⁷, Maja Stojancevic^{5,6}, Svetlana Golocorbin-Kon^{5,6}, and Hani Al-Salami¹

¹Biotechnology and Drug Development Research Laboratory, School of Pharmacy, CHIRI Biosciences Research Precinct, ²School of Pharmacy, Faculty of Health Science, ³Faculty of Science & Engineering and ⁴Curtin Health Innovation Research Institute, Biosciences Research Precinct, School of Biomedical Science, Curtin University, Perth, WA, Australia, ⁵Department of Pharmacology, Toxicology and Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Serbia, ⁶Faculty of Pharmacy, University of Montenegro Podgorica, 8100 Podgorica, Montenegro, and ⁷Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Novi Sad, Serbia

Abstract

Introduction: In previous studies, we have shown that a gliclazide–cholic acid derivative (G–CA) mixture resulted in an enhanced ileal permeation of G (*ex vivo*). When administered orally to diabetic rats, it brought about a significant hypoglycaemic effect. In this study, we aim to create a novel microencapsulated-formulation of G–CA with uniform and coherent structure that can be further tested in our rat model of type 1 diabetes (T1D). We also aim to examine the effect of CA addition to G microcapsules in the morphology, structure and excipients' compatibility of the newly designed microcapsules.

Method: Microencapsulation was carried out using our Buchi-based microencapsulating system developed in our laboratory. Using sodium alginate (SA) polymer, both formulations were prepared: G–SA (control) and G–CA–SA (test) at a constant ratio (1:3:30), respectively. Complete characterizations of microcapsules were carried out.

Results: The new G–CA–SA formulation is further optimized by the addition of CA exhibiting pseudoplastic-thixotropic rheological characteristics. Bead size remains similar after CA addition, the new microcapsules show no chemical interactions between the excipients and this was supported further by the spectral studies suggesting bead stability.

Conclusion: The new microencapsulated-formulation has good and uniform structural properties and may be suitable for oral delivery of antidiabetic-bile acid formulations.

Keywords

Artificial-cell microencapsulation, bile acids, diabetes, gliclazide

History

Received 12 January 2014

Revised 26 February 2014

Accepted 31 March 2014

Published online 5 May 2014

Introduction

Diabetes mellitus is a metabolic disorder classified as type 1 diabetes (T1D) or type 2 diabetes (T2D). T1D is an autoimmune disease marked by the destruction of the β -cells of the pancreas resulting in a partial or complete lack of insulin production and the inability of the body to control glucose homeostasis¹. T2D is a metabolic disorder with onset most common in middle aged and elderly². Gliclazide (G) is used in T2D to enhance insulin secretion but it also has beneficial extrapancreatic effects which makes it potentially useful in T1D³. In general, controlled absorption of G from the gut is required in order to prevent a sudden increase in blood glucose level after food intake.

Bile acids (BAs) are known as permeation enhancers⁴ and new combinations of G and BAs are anticipated to facilitate G pharmacokinetic and pharmacodynamic properties, as well as safety profile. The absorption rate of G from the GIT remains low and variable due to its poor dissolution and permeability⁵.

In order to design a novel and stable oral delivery system for the targeted delivery of G and optimize its efficacy through the incorporation with the BA ‘‘cholic acid’’, a suitable polymer-based matrix is needed^{4,6}.

Biodegradable polymers have been the major focus in developing efficacious delivery systems for pharmaceutical research⁷. Commonly used polymers include sodium alginate (SA), chitosan and pectin. SA is the salt of alginic acid, a natural polysaccharide derived from seaweeds and consists of variable percentages of (1–4)-linked β -D-mannuronic acid and α -L-guluronic acid residues⁸. In our recently published article, a basic formulation of G–CA was absorbed poorly from the ileum of diabetic rats⁹ suggesting a great potential for a new and enhanced absorption when targeting the cecum using low-viscosity sodium alginate (LVSA).

Recently, we have examined the effect of diabetes-induced physiological changes occurring in the gut, and the resultant impact, on the formulation of antidiabetic drugs. We have also shown that various formulations of BAs and G have great potential in the treatment of T1D^{9,10}. However, our administered formulation has many limitations including low efficacy, associated toxicity, significant gut-metabolism and poor targeted delivery¹¹. Thus, to overcome these limitations, there is a need for a novel and robust design which will encapsulate the

Address for correspondence: Dr Hani Al-Salami, Biotechnology and Drug Development Research Laboratory, Curtin Health Innovation Research Institute, Biosciences Research Precinct, School of Pharmacy, Curtin University, Perth, WA, Australia. E-mail: hani.al-salami@curtin.edu.au

J Pharm Innov (2014) 9:150–157
DOI 10.1007/s12247-014-9182-5

RESEARCH ARTICLE

Stability and Release Kinetics of an Advanced Gliclazide-Cholic Acid Formulation: The Use of Artificial-Cell Microencapsulation in Slow Release Targeted Oral Delivery of Antidiabetics

Armin Mooranian · Rebecca Negrulj · Sangeetha Mathavan · Jorge Martinez · Jessica Sciarretta · Nigel Chen-Tan · TK Mukkur · Momir Mikov · Mladena Lalic-Popovic · Maja Stojančević · Svetlana Golocorbin-Kon · Hani Al-Salami

Published online: 9 April 2014
© The Author(s) 2014. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract

Introduction In previous studies carried out in our laboratory, a bile acid (BA) formulation exerted a hypoglycaemic effect in a rat model of type-1 diabetes (T1D). When the antidiabetic drug gliclazide (G) was added to the bile acid, it augmented the hypoglycaemic effect. In a recent study, we designed a new

formulation of gliclazide-cholic acid (G-CA), with good structural properties, excipient compatibility and exhibits pseudoplastic-thixotropic characteristics. The aim of this study is to test the slow release and pH-controlled properties of this new formulation. The aim is also to examine the effect of CA on G release kinetics at various pH values and different temperatures. **Method** Microencapsulation was carried out using our Buchi-based microencapsulating system developed in our laboratory. Using sodium alginate (SA) polymer, both formulations were prepared: G-SA (control) and G-CA-SA (test) at a constant ratio (1:3:30), respectively. Microcapsules were examined for efficiency, size, release kinetics, stability and swelling studies at pH 1.5, pH 3, pH 7.4 and pH 7.8 and temperatures of 20 and 30 °C.

Results The new formulation is further optimised by the addition of CA. CA reduced microcapsule swelling of the microcapsules at pH 7.8 and pH 3 at 30 °C and pH 3 at 20 °C, and, even though microcapsule size remains similar after CA addition, percent G release was enhanced at high pH values (pH 7.4 and pH 7.8, $p < 0.01$).

Conclusion The new formulation exhibits colon-targeted delivery and the addition of CA prolonged G release suggesting its suitability for the sustained and targeted delivery of G and CA to the lower intestine.

Keywords Artificial-cell microencapsulation · Diabetes · Bile acid · Gliclazide

A. Mooranian · R. Negrulj · S. Mathavan · J. Sciarretta · H. Al-Salami (✉)
Biotechnology and Drug Development Research Laboratory,
Curtin Health Innovation Research Institute,
Biosciences Research Precinct, Curtin University,
Perth, WA, Australia
e-mail: hani.al-salami@curtin.edu.au
URL: http://healthsciences.curtin.edu.au/teaching/pharmacy_people.cfm/Hani.Al-Salami

N. Chen-Tan
Faculty of Science & Engineering, Curtin University,
Perth, WA, Australia

J. Martinez · T. Mukkur
Curtin Health Innovation Research Institute, Biosciences Research
Precinct, School of Biomedical Science, Curtin University,
Perth, WA, Australia

M. Mikov · M. Stojančević · S. Golocorbin-Kon
Department of Pharmacology, Toxicology and Clinical
Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Novi Sad,
Novi Sad, Serbia

M. Lalic-Popovic
Department of Pharmacy, Faculty of Medicine,
University of Novi Sad, Novi Sad, Serbia

M. Mikov · S. Golocorbin-Kon
Faculty of Pharmacy, University of Montenegro Podgorica,
8100 Podgorica, Montenegro

Introduction

Diabetes mellitus is a metabolic disorder classified as type 1 (T1D) or type 2 (T2D). T1D is an autoimmune disease marked

REVIEW

The impact of farnesoid X receptor activation on intestinal permeability in inflammatory bowel disease

Maja Stojancevic MPharm¹, Karmen Stankov MD PhD², Momir Mikov MD PhD¹

M Stojancevic, K Stankov, M Mikov. The impact of farnesoid X receptor activation on intestinal permeability in inflammatory bowel disease. *Can J Gastroenterol* 2012;26(9):631-637.

Les conséquences de l'activation du récepteur farnésioïde X sur la perméabilité intestinale en cas de maladie inflammatoire de l'intestin

The most important function of the intestinal mucosa is to form a barrier that separates luminal contents from the intestine. Defects in the intestinal epithelial barrier have been observed in several intestinal disorders such as inflammatory bowel disease (IBD). Recent studies have identified a number of factors that contribute to development of IBD including environmental triggers, genetic factors, immunoregulatory defects and microbial exposure. The current review focuses on the influence of the farnesoid X receptor (FXR) on the inhibition of intestinal inflammation in patients with IBD. The development and investigation of FXR agonists provide strong support for the regulatory role of FXR in mucosal innate immunity. Activation of FXR in the intestinal tract decreases the production of proinflammatory cytokines such as interleukin (IL) 1-beta, IL-2, IL-6, tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma, thus contributing to a reduction in inflammation and epithelial permeability. In addition, intestinal FXR activation induces the transcription of multiple genes involved in enteroprotection and the prevention of bacterial translocation in the intestinal tract. These data suggest that FXR agonists are potential candidates for exploration as a novel therapeutic strategy for IBD in humans.

La principale fonction de la muqueuse intestinale est de former une barrière qui sépare de l'intestin le contenu de la lumière. On a observé des anomalies de la barrière épithéliale de l'intestin dans plusieurs troubles intestinaux, telles que les maladies inflammatoires de l'intestin (MII). Des études récentes ont permis de repérer un certain nombre de facteurs qui contribuent à l'apparition d'une MII, y compris des déclencheurs environnementaux, des facteurs génétiques, des anomalies immunorégulatrices et une exposition microbienne. La présente analyse aborde l'influence du récepteur farnésioïde X (RFX) sur l'inflammation intestinale chez les patients atteints d'une MII. L'apparition et l'exploration des agonistes du RFX étaient fortement le rôle régulateur du RFX dans l'immunité innée des muqueuses. L'activation du RFX dans le tube digestif réduit la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine (IL) 1-bêta, l'IL-2, l'IL-6, le facteur de nécrose tumorale alpha et l'interféron gamma, contribuant ainsi à une réduction de l'inflammation et de la perméabilité épithéliale. En outre, l'activation du RFX intestinal induit la transcription de multiples gènes qui participent à l'entéroprotection et à la prévention de la translocation bactérienne dans le tube digestif. Ces données laissent croire que les agonistes du RFX sont des candidats potentiels à l'exploration en vue de devenir une nouvelle stratégie thérapeutique des MII chez des humains.

Key Words: *Bile acids; Farnesoid X receptor; Inflammation; Inflammatory bowel disease; Intestinal permeability*

Chronic inflammatory disorders of the gastrointestinal tract, collectively termed inflammatory bowel disease (IBD), include Crohn disease (CD) and ulcerative colitis (UC). It is estimated that 1.5 million Americans suffer from UC and CD. The etiology of UC and CD are unknown, although both are believed to arise from a disordered immune response to gut contents in genetically predisposed individuals (1). The onset of IBD peaks between 15 and 25 years of age (2). Multiple studies have evaluated the epidemiology of IBD in adults from various geographical regions. In the United States, estimates of CD incidence varies between six and eight per 100,000, with a prevalence of 100 to 200 per 100,000 (1).

The intestinal epithelium represents the largest and most important barrier between the host and the luminal contents of the intestine. It acts as a barrier to prevent the passage of harmful intraluminal entities including foreign antigens, microorganisms and their toxins (3). At the same time, the intestinal barrier must be permeable to essential dietary nutrients, electrolytes and water absorbed from the intestinal lumen into the circulation because of their importance to growth and development (4). It has been shown that the function of the intestinal barrier is modulated by the immune system, ingestion of alcohol or nonsteroidal anti-inflammatory drugs, enteric pathogens and their toxins, and proteases (3). Altered intestinal barrier function results in altered epithelial permeability and altered intestinal innate immunity seen in various diseases including IBD. Dysregulation of the immune response to intestinal bacteria in patients with IBD occurs because of a shift in the balance of the secretion of anti-inflammatory mediators toward proinflammatory molecules (5). Recently, the nuclear

farnesoid X receptor (FXR) has been implicated in immune modulation and barrier function in the intestine (6). FXR is activated by bile salts and regulates the transcription of genes involved in bile salt synthesis, transport and metabolism in the liver and intestine, as well as genes involved in many different functions by binding FXR response elements (FXREs) in promoters of target genes as a heterodimer with the retinoid X receptor (RXR) (7). Thus, immune cell modulation by the FXR signalling pathway could lead to improvement in intestinal inflammation (8). Because bile acids and FXR play an important role in modulating a range of inflammatory responses, barrier function and the prevention of bacterial translocation in the intestinal tract, the current review focuses on the influence of FXR on the inhibition of intestinal inflammation in patients with IBD.

IBD AND FACTORS INVOLVED IN INTESTINAL INFLAMMATION

IBD comprises primarily two disorders: UC and CD. It is likely that a number of factors contribute to the development of mucosal inflammation. Recent experimental studies have identified a role for several factors such as environmental triggers, genetic factors, immunoregulatory defects and microbial exposure (9,10). The generally accepted theory is that a combination of environmental agents and a dysfunctional mucosal immune system in genetically susceptible individuals leads to the development of either CD or UC (11,12). The hallmark of IBD is chronic, uncontrolled inflammation of the intestinal mucosa, with potentially severe complications and even mortality (13). CD can involve any part of the gastrointestinal tract, while UC is limited

¹Department of Pharmacology; ²Clinical Center of Vojvodina, Medical Faculty Novi Sad, University of Novi Sad, Hajduk Veljkova, Serbia
Correspondence: Ms Maja Stojancevic, Department of Pharmacology, Medical Faculty Novi Sad, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Serbia.
Telephone 381-62-24-8020, fax 381-21-661-5771, e-mail majastojancevic@gmail.com
Received for publication July 25, 2011. Accepted December 30, 2011