

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ  
KESİN RAPORU**

**Diyabetik Sıçanlarda Düşük Doz Kronik Fluvastatin  
Tedavisinin Periferik Dokularda  
Oksidatif / Nitrozatif Stres Üzerine Etkileri**

Prof.Dr.Nuray Arı

Proje No. :**2008 0803061**

Başlama Tarihi: 21.08.2008

Bitiş Tarihi: 21.04.2010

Rapor Tarihi: 29.06.2010

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri

Ankara - " 2010 "

## I.

### **Diyabetik Sıçanlarda Düşük Doz, Kronik Fluvastatin Tedavisinin Periferik Dokularda Oksidatif / Nitrozatif Stres Üzerine Etkileri**

#### **Özet**

Hiperkolesterolemi tedavisinde kullanılan statinlerin (HMG-CoA redüktaz inhibitörleri) antioksidan ve antienflamatuvar gibi kolesterol- bağımsız (pleiotropik) etkileri kardiyovasküler ve kronik nörolojik hastalıklardan korunma ya da tedavi için büyük ilgi alanı olmaya devam etmektedir. Öte yandan, diyabetik komplikasyonlarda oksidatif stresin önemli rolü bulunmaktadır. Çalışmamızda kolesterol düzeylerini etkilemeyen düşük dozdaki fluvastatin ile kronik tedavi görmüş diyabetik sıçanların periferik dokularında ve plazmada ilacın antioksidan etkinliği araştırılmıştır. Diyabet yetişkin erkek Wistar sıçanlarda streptozotosin (STZ, 55 mg/kg, ip) ile oluşturulmuştur. Bir kısmına ve kontrol grubuna altı ay boyunca fluvastatin (2 mg/kg/gün, oral) verilmiştir. Fluvastatin STZ enjeksiyonundan bir hafta sonra uygulanmaya başlanmıştır (preventif çalışma). Doku homojenatlarında süperoksit dismutaz ve katalaz aktiviteleri, glutation, malondialdehit, protein karbonilasyonu, ileri protein oksidasyon ürünleri, hidroperoksit ve 3-nitrotirozin düzeyleri, plazmada ise hidroksinonenal 4-histidin ile 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin düzeyleri ölçümlenmiştir. Bulgularımız, kolesterol düzeylerini düşürmeyen düşük dozdaki fluvastatinin diyabetik durumda kolesterol düşürücü etkiden bağımsız olarak ortaya çıkan önemli ölçüde antioksidan etkinliği olduğunu göstermektedir. Bu etki diyabetin yol açtığı komplikasyonlardan korunma ve erken tedavide önemli rol oynayabilir.

Anahtar sözcükler: Fluvastatin, sıçan, oksidatif / nitrozatif stres, STZ- diyabet,

## **Diyabetik Sıçanlarda Düşük Doz, Kronik Fluvastatin Tedavisinin Periferik Dokularda Oksidatif / Nitrozatif Stres Üzerine Etkileri**

### **Summary**

The pleiotropic effects of statins (HMG-CoA reductase inhibitors), including antioxidant and anti-inflammatory properties, represent an area of great interest in prevention and therapy of cardiovascular and neurological chronic diseases. Oxidative stress is universal in diabetes, being ultimately involved with the development complications. This study examined antioxidant effect of low-dose (non cholesterol lowering dose), long-term fluvastatin treatment in peripheral tissues and in plasma from diabetic rats. Experiments were conducted in Wistar adult male rats. The rats were made diabetic by streptozotocin (STZ, 55 mg/kg, ip). Some of them and control rats were treated orally for six months with fluvastatin (2mg/kg/day, p.o) starting one week after STZ injection (preventive study). In tissue homogenates, superoxide dismutase, catalase activities, glutathion, malondialdehit, protein carbonyl content, advanced oxidation protein products, lipit hydroperoxide, 3-nitrotyrosine levels and in plasma hidroksinonenal 4-histidin and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels were measured. Generally fluvastatine showed antioxidant effect on most parameters which were increased in diabetes. Antioxidant property of fluvastatin, independent of cholesterol lowering, may play a role in prevention and therapy of early diabetic complications.

Key words: Fluvastatin, oxidative - nitrozative stress, rat, STZ- diabetes,

## II. Amaç ve Kapsam

Dünyada en çok satılan ilaçlar arasında yer alan statinler (*3-hidroksi-3-metilglutaril Koenzim A* (HMG-KoA) *redüktaz* inhibitörleri) gerek diyabetik, gerekse diyabetik olmayan bireylerde hiperkolesterolemi tedavisinde çok yaygın kullanılan ilaç grubudur. Geniş ölçekli klinik çalışmalarda statinlerin kardiyovasküler hastalıklardan ölümleri azalttıklarının gösterilmesi son yıllarda tüm dikkatlerin bu ilaçlar üzerine çekilmesine neden olmuştur. Öte yandan, statinlerin kolesterol düşürücü etkilerinden bağımsız olarak ortaya çıkan kardiyovasküler protektif etkileri, önemleri ve ortaya çıkış mekanizmaları üzerinde son yıllarda yoğun araştırmalar bulunmaktadır. Bu etkiler arasında endotel disfonksiyonunun düzelmesi, aterosklerotik plağın stabilizasyonu, oksidatif stres, enflamasyonun ve düz kas proliferasyonunun azalması, trombojenik yanıtın inhibisyonu sayılabilir (1-4). Yararlı *pleiotropik* etkiler olarak adlandırılan bu etkilerin statinlerin kardiyovasküler morbidite ve mortaliteyi azaltıcı etkinliklerinde büyük paylarının olduğu giderek artan sayıdaki deneysel ve klinik bulgularla kanıtlanmaktadır.

Öte yandan, diyabetik hastalarda statinler diyabetik dislipidemi tedavisinde de kullanılan ilk sıra ilaçlardır ve bu ilaçlar diyabetik hastalarda da hem makrovasküler aterosklerotik komplikasyonlar, hem de nefropati ve retinopati gibi mikrovasküler diyabetik komplikasyonlarda koruma oluşturmaktadırlar (5-7). Şimdiye kadar statin türevi ilaçlarla deneysel diyabet modeli oluşturulmuş deney hayvanlarında kolesterol düşürücü dozlarla çalışmalar yapılmış olmasına karşın (8-13) oksidatif stres üzerine olan etkilerin ve mekanizmalarının diyabette araştırıldığı az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Diabetes mellitus ve komplikasyonları günümüzde tüm dünyada artan bir şekilde önemli bir tıbbi sorun haline gelmiştir. Tedavide hedef, çok yönlü koruyucu bir strateji ile diyabetin erken döneminde bu komplikasyonların gelişmesini önlemektir. Kronik hiperglisemi diyabetik komplikasyonların başlaması ve gelişmesinde en önemli tetikleyicidir ve karmaşık mekanizmalarla mikroanjiopati, nefropati ve nöropati gibi erken ve geç dönem komplikasyonlara neden olur (14,15). Hipergliseminin, en önemli zarar verici etkisi (glukotoksisite) hücre ve dokularda serbest oksijen radikalleri (SOR) nin aşırı artmasıyla gerçekleşir ve beraberinde antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalmasıyla gelişen

oksidatif stres doku ve hücelere zarar vererek diyabetik komplikasyonların ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır (16-21). Diyabette hiperglisemi aracılı SOR esas olarak glukoz otooksidasyonu ve ileri glikozillenme son ürünleri oluşumu ve poliöl yolaklarında aşırı miktarlarda üretilirler (14,22). SOR kaynaklı oksidatif hasar en çok protein, lipid ve nükleik asit gibi biyomolekülleri etkilediğinden oksidatif stresin rolünün araştırılmasında genellikle bu biyomoleküllerin oksidatif ürünlerine yönelik belirteçler ölçümlenmektedir. Bu amaçla genellikle stabil, uzun ömürlü protein ve lipid oksidasyon ürünleri, antioksidan enzimler ve total antioksidan kapasite saptanmaktadır. Öte yandan, nitrik oksit (NO) kaynaklı oksidan ürünlerin (örn. peroksinitrit) aşırı oluşumları sonucu proteinlerin nitrozillenmesi nitrozatif stres olarak bilinmekte ve ortaya çıkan ürün 3-NT (3-nitro tirozin)' in serum ve doku düzeyleri önemli bir oksidatif belirteç olarak kabul edilmektedir (16,18,23)

Diyabette artan oksidatif strese karşı antioksidanların preventif amaçla kullanılabilceği önerilmektedir (19,24,25-27) ve bir çok çalışma ile de statinlerin güçlü antioksidan aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir. O nedenle, diyabet ve patolojilerinde artmış oksidatif stresin olduğu öteki kronik hastalıklara bağlı komplikasyonların önlenmesi ve tedavisinde statinlerin kolesterol düşürücü etkiden bağımsız olarak antioksidan aktivite ile de yararlı etkiler oluşturabilecekleri umulmaktadır. Hem kolesterol düzeylerini düşüren dozlar, hem de düşürmeyen düşük dozlar ile çalışılan araştırmalarda statinlerin antioksidan etkiyle kardiyovasküler oksidatif stresi azalttıkları, böylece ateroskleroz, hipertansiyon, insülin rezistansı, diyabet, kalp yetersizliği gibi kronik hastalıklarda kardiyovasküler disfonksiyon üzerinde yararlı etkiler oluşturdukları gözlenmiştir (4,28, 31-39). Gerçekte lipid düşürücü etki oksidatif stresi azaltsa da, statinlerin antioksidan etkileri kolesterol düşürücü etkiden bağımsız olarak da ortaya çıkmaktadır.

Statin grubundan fluvastatin'in de önemli ölçüde antioksidan etkinliği olduğu bilinmektedir (29,40,41) ve bu yönde fluvastatin ile diyabette vasküler sistem ağırlıklı az sayıda da olsa çalışmalar yapılmıştır (33,42,43). Ne var ki, yukarıda söz edildiği gibi statinlerle diyabetik modellerde yapılan çalışmalar ağırlıklı olarak kolesterol düşürücü dozlarla gerçekleştirildiğinden *pleiotropik* etkilerin mekanizmalarının anlaşılması ve yorumlanması güçleşmektedir. O nedenle bu etkilerin ayırt edilebilmesi için kolesterol düzeylerini düşürmeyen ancak *pleiotropik* etkilerin ortaya çıktığı dozlarla yapılan çalışmaların sayılarının artması gerekmektedir. Örn. yeni ve ilginç bir araştırma romatoid artrit modeli oluşturulmuş sıçanlarda yürütülmüştür. Primer koruma amaçlı 21 gün süreyle kolesterol

düzeylelerini etkilemeyen dozda (5mg/kg/gün) fluvastatin tedavisi yapıldığında, aortada artmış olan 3-NT düzeyleri ve NAD(P)H oksidaz komponenti olan p22phox mRNA ekspresyonu düşmüş, eNOS ekspresyonu ise etkilenmemiştir. Ancak, artritte azalmış olan eNOS ekspresyonu ise etkilenmemiştir. Ancak, artritte azalmış olan eNOS kofaktörü tetrahidrobiopterinin serum düzeyleri tedavi sonunda artmıştır. Araştırmacılar romatoid artritli hastalarda statinlerin kardiyovasküler mortaliteyi azaltabileceğini önermişlerdir. (44). Bir başka ilginç çalışma da spontan hipertansif sıçanlarda yürütülmüştür. Bu sıçanlar kolesterol düzeylerini düşürmeyen dozlarda fluvastatin ile tedavi edildiklerinde hipertansif mezenterik arterde azalmış olan NO ve EDHF bağımlı yanıtlardan sadece NO-bağımlı yanıtlar düzelmiştir. Araştırmacılar fluvastatinin *pleiotropik* yararlı etkisinin endotelde sadece NO yolağı üzerinde oluştuğunu ve bunun da endotel hücrelerdeki aşırı üretilen süperoksit anyonlarının fluvastatin tedavisi ile azaltıldığını ve ek olarak da eNOS up-regülasyonunun gerçekleşebileceğini önermişlerdir. (29). Ateroskleroz modeli oluşturulan tavşanlarda da preventif amaçla, düşük doz (2mg/kg/gün) 12 hafta süreyle fluvastatin uygulandığında aterosklerotik aortada bozulmuş NO yanıtları düzelmiş olarak bulunmuştur. Bu etki hem endotelde eNOS mRNA up-regülasyonunu hem de süperoksit radikalinin azalmasıyla açıklanmıştır (45). Benzer olarak *Mitani ve ark. da* yüksek kolesterol diyeti ile ateroskleroz oluşturdukları tavşanlarda preventif amaçla, düşük dozda (2mg/kg/gün) 20 hafta boyunca fluvastatin uyguladıklarında aortada ve plazmada ateroskleroz belirteçleri ile plak stabilizasyonunda olumlu etkiler saptamışlardır (46). *Rikitake ve ark. nın* da benzer deney tasarımı ile 12 haftalık düşük doz fluvastatin tedavisi sonunda aortada NO-bağımlı gevşemeler düzelmiş, süperoksit anyonları, LDL oksidasyonu ve intimal plak oluşumu azalmıştır (47). STZ-diyabetik sıçanlarda yürütüğümüz bir araştırmada da kolesterol düzeylerini etkilemeyen dozda (2mg/kg/gün) kronik fluvastatin tedavisinin diyabetik aortada azalmış olan NO-bağımlı gevşemeleri normalize ettiği saptanmıştır (43).

Öte yandan, kolesterol düzeylerini düşüren dozlarda 11 aylık fluvastatin tedavisi uygulanmış STZ- diyabetik tavşanlarda sadece renal fonksiyonların ve böbrek dokusunda antioksidan enzimlerden glutation peroksidaz (GSH-Px), katalaz (KAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerinin ölçümlendiği bir çalışmada fluvastatin diyabette bozulmuş olan renal fonksiyonu düzeltmiş, GSH-Px aktivitesinde de düzelmeye sağlamış, ancak CAT ve SOD aktivitelerini anlamlı olarak düzeltmemiştir (48). Bu çalışma diyabetik sıçanlarda fluvastatin tedavisinin böbrekler üzerindeki fonksiyonel ve antioksidan etkilerinin araştırıldığı tek deneysel çalışmadır. Ancak, araştırmada kolesterol düzeylerini düşüren doz ile

çalışılmıştır. STZ diyabetik sıçanlarda yürüttüğümüz araştırmalarda da kolesterol düzeylerini düşüren dozlarda uygulanan simvastatin tedavisiyle doku ve serumda ölçümlenen parametrelere göre antioksidan etkinlik belirlenmiştir (8,10,11).

Öte yandan, küçük ölçekli bir klinik çalışmada (10 hasta) hiperlipidemik tip 2 diyabetik hastalarda fluvastatinin antioksidan etkisi 12 haftalık tedavi sonrası araştırılmış ve serum oksidatif stres belirteçlerindeki değişimler pravastatin ve simvastatin tedavisi ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada kolesterol düşürücü dozlar kullanılmış ve oksidatif stres üzerinde yararlı etkiler bulunmuştur (49).

Statinlerin antioksidan etki de dahil olmak üzere pleiotropik etkileri için genel olarak açıklanan mekanizma/lar bu ilaçların hücrelerde kolesterol biyosentez yolağında yer alan isoprenoid sentezini inhibe etmeleriyle ilişkilendirilmektedir. Oksidatif stresdeki artışı önleyici etkileri Rho geranil geranilasyonunun inhibisyonu ve Rac 1 aracılı süperoksit üretiminin azalmasıyla açıklanmıştır (50). Rho GTPaz ailesinden olan Rac1 and RhoAhipertrofinin mediyatörleri olarak da bilinmektedirler. Rho proteinleri post-translasyonel isoprenilasyona uğrayarak aktive olurlar. Spontan hipertansif sıçan kalbinde statinlerin bu küçük G proteinlerin isoprenilasyonlarını (aktivasyonlarını) engelleyerek kardiyak hipertrofiyi önledikleri gösterilmiş ve araştırmacılar statinler ile miyokardial Rho GTPaz' ların hedeflenmesinin kardiyak hipertrofinin önlenmesinde yeni bir tedavi stratejisi olarak önermişlerdir (51). Yüksek glukoz ortamındaki insan aortik endotel hücre kültürlerinde ve diyabetik fare damarlarında da statinlerin Rac 1 ve sonuçta NADPH oksidaz inhibisyonu ile antioksidan aktivite gösterdikleri saptanmıştır (52). Özetle, bulgular statinlerin kalp ve damarlarda Rac1 aracılı NADPH oksidaz aktivasyonunu inhibe ederek azalttığını göstermektedir (38,52). Oksidatif stresin arttığı durumlar olan diyabet ve hipertansiyonda kardiyovasküler anjiyotensin AT-1 reseptörlerinin *upregülasyona* uğradığı saptanmıştır (53,54). Bu reseptörlerin uyarılması NADPH oksidaz aktivasyonu ile aşırı SOR üretimine ve redoks duyarlı genlerin (kemotaksis, adhezyon molekülleri, proenflamatuvar sitokinler ve matriks metaloproteinaz) aktivasyonuna neden olmaktadır (55-57). Statinler anjiyotensin AT-1 reseptörlerinin ekspresyonlarını da azaltmaktadırlar (54).

Patolojilerinde oksidatif stres ve enflamasyonun rol oynadığı santral sinir sistemi hastalıklarında da statinlerin yararları araştırılmaktadır. İnme (*stroke*) ye karşı da *pleiotropik* etkiler ile koruma oluşturabildikleri gösterilmiştir (58).

Fluvastatin' in diyabette periferik dokularda antioksidan etkinliğine ilişkin kapsamlı bir araştırma bulunmamasından yola çıktığımız bu projemizde kolesterol düzeyini düşürmeyen dozda (2mg/kg, gün) kronik (6 ay) fluvastatin tedavisinin STZ- diyabetik sıçanların periferik dokularında artmış olan lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu ile antioksidan defans enzimler ve düşük molekül ağırlıklı antioksidan moleküllerin düzeyleri üzerindeki etkileri saptanmıştır. Böylece düşük doz -kronik statin tedavisinin diyabetik durumda hipergliseminin indüklediği oksidatif stresi ne ölçüde önleyebileceği ve kronik kullanımdaki öneminin aydınlatılması sağlanmıştır. Araştırmamızda fluvastatin tedavisine diyabet oluşur oluşmaz (komplikasyonlar ortaya çıkmadan önce) başlanarak preventif açıdan değerlendirme yapılması amaçlanmıştır. Öte yandan, *pleiotropik* etkiler kısa zamanda ortaya çıktıkları için literatürde bu yönde uzun süreli bir çalışma bulunmamaktadır. Oysa yararlı pleiotropik etkilerin kronik kullanımda da geçerli olup olmayacağının bilinmesi önemlidir. Diyabetin yanı sıra, bulgular arttıkça oksidatif stresin patolojilerinde önemli rol oynadığı öteki kronik hastalıklarda da (ateroskleroz, hipertansiyon, romatoid artrit ve diğer enflamatuvar hastalıklar, nörolojik hastalıklar gibi) primer koruma amaçlı olarak statinlerin kullanılmaları belki de gelecekte mümkün olabilecektir.

### III. Materyal ve Yöntem

Araştırmamızda yetişkin erkek Wistar sıçanlar kullanılmıştır. Oluşturulan dört grup şu şekildedir:

- Eş yaş kontrol grubu (n=15) (K),
- Diyabetik grup (n=15) (D),
- Fluvastatin tedavili kontrol grubu (n=15) (KF)
- Fluvastatin tedavili diyabetik grup (n=15) (KF)

Hayvanların beslenmeleri, sıçanlar için özel üretilmiş “standart yem”ler ile sağlanmıştır. Yem ve su kısıtlaması uygulanmamıştır.

Diyabet, 55 mg/kg dozdaki streptozotosin (STZ)' in tek doz, i.p. uygulamasıyla oluşturulmuştur. STZ, sodyum sitrat tamponu içinde (0.05 M, pH 4.5) hazırlanarak ve bekletmeden injekte edilmiştir. 1 hafta sonunda kuyruk veninden elde edilen bir damla kanda



stikler aracılığı ile glukoz ölçer ile glukoz düzeyleri saptanmış ve kan glukoz düzeyi 250 mg/dl ve daha üzeri olanlar diyabetik olarak kabul edilmiştir ve 2 mg/kg dozda oral gavaj ile başlanan (preventif çalışma) fluvastatin tedavisi 6 ay sürdürülmüştür (fluvastatin saf toz halinde Novartis® –İsviçre’ den sağlanmıştır). Eş-yaş kontrol grubudaki hayvanlara bir kez sadece diyabetojen ajan STZ yerine çözücü sitrat tamponu uygun hacimde i.p. olarak uygulanmıştır. Sonrasında oral gavajla fluvastatin yerine 6 ay boyunca sadece uygun hacimde çözücü su verilmiştir

Tedavi sonlandığında sıçanların beden ağırlıkları ölçülmüş, ketamin (100 mg/kg, ip, Ketalar®, Pfizer) anestezisi altında kalp, böbrek, pankreas ve karaciğerleri alınarak dokular -80<sup>0</sup> C’ lik derin dondurucuda biyokimyasal çalışmalar gerçekleştirilinceye kadar saklanmıştır.

Kan örneklerinde glukoz Accu-Check go<sup>®</sup> (Roche) glukoz ölçer ile sıçanların dokuları alınmadan hemen önce anestezi altında kalpten alınan kanlarda, total kolesterol ve trigliserid konsantrasyonları ise elde edilen plazmalarda otoanalizörde ölçümlenmiştir.

Dokularda ölçümlenen parametreler şunlardır:

- SOD (süperoksit dismutaz) aktivitesi (spektrofotometrik yöntem) (59),
- CAT (katalaz) aktivitesi (spektrofotometrik yöntem), (60),
- GSH (glutation) düzeyleri (spektrofotometrik yöntem, kit ile),
- LHP (lipit hidroperoksit: lipit hidroperoksidasyon göstergesi) düzeyleri (spektrofotometrik yöntem), (61),
- TBARS (tiyobarbitürik asit reaktif substans: MDA prekürsörü, lipit oksidasyon belirteci ) düzeyleri (spektrofotometrik yöntem), (62),
- 3-NT (3-nitrotirozin : nitrosatif stres belirteci) düzeyleri (ELISA),
- PCC (protein carbonyl content: protein karbonilasyon belirteci: PK) düzeyleri (spektrofotometrik yöntem), (63),
- AOPP (advanced oxidation protein products: ileri oksitlenmiş protein ürünleri: protein oksidasyon belirteci) düzeyleri (spektrofotometrik yöntem), (64),

Plazmada ölçümlenen parametreler şunlardır:

- HNE-4 His (hidroksinonenal- 4 histidin: doymamış yağ asitlerinin oksidasyon ürünü) düzeyleri (ELISA)
- 8-OhdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: DNA oksidatif hasar belirteci) düzeyleri (ELISA)

Total protein düzeyleri ise Bradford' un tanımladığı yöntemle, bovin serum albümin kullanılarak ölçümlenmiştir (65).

#### IV. Analiz ve Bulgular

##### İstatistik analiz

Ölçümlenen değerler ortalama standart hataları (OSH) ile birlikte verilmiştir. Gruplar arası farkın analizi ANOVA ile yapılmıştır. Ardından Student-Newman-Keul's post test uygulanmıştır. Anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  olarak belirlenmiştir.

##### Hayvanların genel karakteristikleri:

Hayvanların genel karakteristikleri Çizelge 1' de sunulmuştur. Uygulanan düşük dozdaki fluvastatin diyabetik grupta artmış olan kan glukoz, kolesterol ve trigliserid değerlerini etkilememiştir. Fluvastatin tedavisi diyabette ortaya çıkan kilo kaybı üzerine de herhangi bir etki göstermemiştir.

Çizelge 1. Gruplardaki ratların genel karakteristik özellikleri

	Kontrol	Diyabetik	Fluvastatin tedavili diyabetik	Fluvastatin tedavili kontrol
<b>Beden ağı (g)</b>	352 ± 20	240 ± 25*	250 ± 28*	342 ± 12
<b>Glukoz (mg/dl)</b>	122 ± 10	543 ± 32*	555 ± 27*	129 ± 13
<b>Trigliserit (mg/dl)</b>	55 ± 4	80 ± 6*	81 ± 7*	58 ± 6
<b>Kolesterol(mg/dl)</b>	48 ± 5	65 ± 3*	60 ± 3*	51 ± 3

\* Kontrol ve Fluvastatin tedavili gruplara göre farklı,  $p < 0.05$ , n: 10-12

## **Gruplarda ölçümlenen oksidatif / nitrozatif stres parametreleri :**

Çizelge 2 ‘ de dokularda ölçümlenmiş parametreler, Çizelge 3’ de ise plazmada ölçümlenmiş parametreler gösterilmiştir.

- Periferik dokularda ölçümlenen parametreler :

### **Kalp:**

Kontrol krubu ile karşılaştırıldığında diyabetik grubun kalp homojenatlarında TBARS, LHP, PCC, 3-NT düzeyleri ve CAT aktivitesi anlamlı olarak artmış (sırasıyla %.72, %.68, %58, %18. ve %64), glutatyon düzeyleri ise anlamlı olarak (%25) düşmüştür. Fluvastatin tedavisi glutatyon düzeylerini etkilememiş, ancak sözü edilen öteki parametrelerdeki artışları büyük oranda anlamlı olarak önlemiştir. Bu dokuda SOD aktivitesi ve AOPP düzeyleri hiçbir grupta anlamlı olarak değişmemiştir.

### **Karaciğer**

Diyabetik hayvanların karaciğer homojenatlarında TBARS, PCC, 3-NT ve AOPP düzeyleri kontrollerininkine göre sırasıyla % 57, % 42, % 32, ve %58 ; SOD aktivitesi ise % 28 oranlarında artmış olarak bulunmuştur. Fluvastatin tedavisi bu parametreleri kontrol değerlerine düşürmüştür. Öte yandan, glutatyon ve LHP düzeyleri ile CAT aktivitesi hiçbir grupta anlamlı olarak değişmemiştir.

### **Pankreas:**

Diyabetik hayvanların pankreas homojenatlarında TBARS, 3-NT, PCC düzeyleri ile SOD ve CAT aktiviteleri kontrol gruplarına göre anlamlı olarak sırasıyla % 45, % 45, % 56, % 81 ve % 40 oranlarında artmıştır. Fluvastatin tedavisi bu parametrelerin bazılarını tamamen kontrol değerlerine çekmiş, bazılarını ise kontrol değerlere ulaşmasa da düşürmüştür. Öte yandan, glutatyon, LHP ve AOPP düzeyleri kontrollerine göre hiçbir grupta anlamlı olarak değişmemiştir.

Böbrek:

Diyabetik hayvanların böbrek homojenatlarında TBARS, 3-NT ve PCC düzeyleri kontrol grubuna göre sırasıyla % 14, % 26 ve % 30 oranlarında artmış, CAT aktivitesi ise %14 oranlarında azalmış olarak bulunmuştur. Glutasyon düzeyi de kontrol grubuna göre diyabetik grupta % 17 oranında azalmış olarak bulunmuştur. Fluvastatin tedavisi bu bozuklukları büyük oranda önlemiştir. Öte yandan AOPP ve LHP düzeyleri ile SOD aktivitelerindeki değişimler hiçbir grupta anlamlı bulunmamıştır.

- Plazmada ölçümlenen parametreler:

Kontrollerine göre diyabetik grupta plazma HNE-4His ve 8-OhdG düzeyleri sırasıyla % 25 ve % 104 oranlarında anlamlı olarak artmıştır. Fluvastatin tedavisi bu değerlerdeki artışları az önlemiştir ve azalmalar istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Çizelge 2. Gruplardaki doku homojenatlarında fluvastatin (FLUV) tedavisinin oksidatif / nitrosatif parametreleri üzerine etkileri

GRUPLAR ↵		KONTROL	FLUV TEDAVİLİ KONTROL	DİYABETİK	FLUV TEDAVİLİ DİYABETİK
<b>DOKULAR</b>					
<b>KALP</b>	<b>TBARS</b>	1.80±0.20	2.50±0.42	3.10±0.35*	2.12±0.18 <sup>#</sup>
	<b>LHP</b>	9.32±0.33	9.04±0.58	15.71±1.23*	9.73±0.80 <sup>#</sup>
	<b>PCC</b>	12.48±1.31	14.42±2.73	19.75±1.98*	16.12±1.20 <sup>*,#</sup>
	<b>AOPPs</b>	3.78±0.27	3.73±0.31	4.41±0.33	4.20±0.37
	<b>3-NT</b>	82.13±2.81	73.56±6.05	96.66±4.21*	60.98±3.28 <sup>*,#</sup>
	<b>SOD</b>	0.075±0.01	0.077±0.011	0.089±0.005	0.089±0.005
	<b>CAT</b>	24.58±2.80	36.23±1.95	40.45±2.38*	39.93±1.36 <sup>*</sup>
	<b>GSH</b>	18.77±1.30	16.26±0.95	14.00±1.01 <sup>*</sup>	16.13±0.80
<b>KARACİĞER</b>	<b>TBARS</b>	0.85±0.03	0.88±0.11	1.29±0.05*	1.08±0.19
	<b>LHP</b>	4.39±0.37	5.31±0.96	4.89±0.16	4.61±0.4
	<b>PCC</b>	10.01±0.80	9.80±1.08	14.21±1.50*	9.05±1.33 <sup>#</sup>
	<b>AOPPs</b>	2.25±0.24	2.50±0.23	3.55±0.29*	3.23±0.37
	<b>3-NT</b>	74.45±4.04	85.05±3.90	100.35±5.16*	78.49±5.20 <sup>#</sup>
	<b>SOD</b>	0.13±0.01	0.18±0.005	0.16±0.009*	0.15±0.003 <sup>#</sup>
	<b>CAT</b>	1093±70	1216±44	1251±60	1196±64
	<b>GSH</b>	24.90±2.06	24.19±0.98	22.08±1.97	25.01±1.86
<b>PANKREAS</b>	<b>TBARS</b>	0.48±0.029	0.38±0.039	0.70±0.083*	0.47±0.033 <sup>#</sup>
	<b>LHP</b>	4.71±1.66	3.61±0.72	5.80±0.62	5.80±0.62
	<b>PCC</b>	23.07±3.34	31.18±6.19	35.90±2.67*	29.93±1.41 <sup>#</sup>
	<b>AOPPs</b>	2.12±0.21	2.62±0.69	2.48±0.23	2.53±0.51
	<b>3-NT</b>	83.38±8.99	101.73±8.46*	121.21±11.95*	74.13±4.13 <sup>#</sup>
	<b>SOD</b>	0.098±0.022	0.152±0.020	0.178±0.020*	0.181±0.021*
	<b>CAT</b>	312.87±24.66	306.64±13.73	436.57±28.34*	339.62±12.11 <sup>#</sup>
	<b>GSH</b>	10.19±1.01	9.57±0.77	9.19±0.69	11.62±0.42
<b>BÖBREK</b>	<b>TBARS</b>	1.65±0.22	1.99±0.40	2.25±0.19*	1.71±0.19 <sup>#</sup>
	<b>LHP</b>	9.40±0.18	12.06±2.47	11.10±1.48	8.38±0.78
	<b>PCC</b>	10.25±0.60	12.45±0.79	14.72±0.43*	11.47±1.10 <sup>#</sup>
	<b>AOPPs</b>	2.65±0.24	2.65±0.16	3.47±0.23	2.96±0.34
	<b>3-NT</b>	139.24±2.13	146.31±7.08	162.17±5.94*	140.44±4.96
	<b>SOD</b>	0.106±0.006	0.114±0.009	0.144±0.036	0.130±0.087
	<b>CAT</b>	917.28±64.27	952.48±92.84	792.67±42.81*	888.06±24.26
	<b>GSH</b>	19.73±0.46	19.77±1.92	16.28±1.33*	16.36±0.62

Tiyobarbitürik asit reaktif bileşikler (TBARs; nmol/mg protein, Lipid hidroperoksit (LHP; nmol/mg protein), Protein karbonilasyon ürünleri (PCC; nmol/mg protein), İlerlemiş protein oksidasyon ürünleri (AOPPs; nmol/mg protein), 3-Nitrotirosin, (3-NT, pmol/mg protein), Glutasyon (GSH; nmol/mg protein), Superoksit Dismutaz aktivitesi, (SOD; IU/mg protein), Katalaz aktivitesi (CAT; IU/mg protein). \* Kontrol grubuna göre farklılık, <sup>#</sup> diyabetik gruba göre farklılık, n:6, p<0.05

Çizelge 3. Plazmada ölçümlenmiş parametreler

	<b>Kontrol</b>	<b>Fluvastatin tedavili kontrol</b>	<b>Diyabetik</b>	<b>Fluvastatin tedavili diyabetik</b>
<b>HNE-4His</b>	3.09 ± 0.49	3.05 ± 0.49	3.84 ± 0.19*	3.51 ± 0.45
<b>8-OhdG</b>	1.31 ± 0.40	2.00 ± 0.44	2.68 ± 0.85*	2.57 ± 0.88

*HNE 4-His : Hidroksinonenal-4 histidin : ug/mg protein n :7 ; 8-OhdG : 8-hidroksi-2'-deoksiguanosin : ng/ml ; n :5-7, \* Kontrol grubuna göre farklılık, p<0.05.*

## V. Sonuç ve Öneriler

Fluvastatin tedavisinin diyabette periferik dokularda antioksidan etkinliğine ilişkin kapsamlı bir araştırma bulunmamasından yola çıktığımız bu projemizde kolesterol düzeyini düşürmeyen dozda (2mg/kg, gün) kronik (6 ay) fluvastatin tedavisinin STZ- diyabetik sıçanların periferik dokularında artmış olan lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu ile antioksidan defans enzimler ve düşük molekül ağırlıklı antioksidan moleküllerin düzeyleri üzerindeki etkileri saptanmıştır. Araştırmamızda fluvastatin tedavisine diyabet oluşur olmaz (komplikasyonlar ortaya çıkmadan önce) başlanarak preventif açıdan değerlendirme yapılması amaçlanmıştır. Bulgularımız fluvastatinin diyabetik durumda kronik olarak ve kolesterol düzeylerini düşürmeyen dozda uygulanmasının diyabette hiperglisemi kaynaklı artan oksidatif stresi bir çok parametre üzerinden olumlu yönde etkilediğini göstermiştir. Düşük dozdaki fluvastatinin bu etkisi beklendiği gibi kan glukozu, kolesterol ve trigliserid düzeylerini etkilemeksizin ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamızda, ölçüm yapılan tüm diyabetik dokularda (kalp, karaciğer, böbrek, pankreas ve karaciğer) beklendiği gibi, TBARS düzeyleri sağlıklı (kontrol) grupdakilere göre anlamlı olarak artmış ve fluvastatin tedavisi bu artışları önlemiştir. Lipit peroksidasyon reaksiyonları sırasında oluşan reaktif aldehit düzeyleri diyabetik dokularda artmış oksidatif stresin şiddetiyle bağlantılı olarak dokulara zarar verirler. Bu reaktif aldehitler proteinler, fosfolipitler, ve nükleotidler ile reaksiyona girerek stabil ürünlere dönüşürler. Böylece bu toksik aldehitlerin diyabet sürecinde kronik olarak aktivasyonları DNA ve protein sentezinde inhibisyona, antioksidan ve başka öteki enzimlerde inaktivasyona, ve nötrofil migrasyonunun uyarılmasına neden olurlar. Çalışmamızda lipit peroksidasyonunun göstergesi olan lipit hidroperoksit (LHP) düzeyi sadece diyabetik kalpte kontrollere göre anlamlı olarak artmış ve

fluvastatin bu artışı kısmen önlemiştir. Çeşitli deneysel modellerde fluvastatin ve metabolitlerinin kimyasal yapılarıyla ilişkili olarak lipit peroksidasyonu üzerindeki antioksidan yararlı etkisi gösterilmiştir (37, 67-69). Diyabette hiperglisemi aracılı artan lipit peroksidasyonu özellikle damarlarda aterosklerozun gelişmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Fluvastatinin kalp üzerindeki bu etkisi de antioksidan etkiyle koruma açısından önemli olabilir. Yeni klinik ve epidemiyolojik çalışmalar tedaviye antioksidan etkili bileşiklerin eklenmesinin diyabet dahil olmak üzere patolojilerinde aşırı SOR aracılı hasarlanmanın rol oynadığı hastalık ve komplikasyon riskini azaltabildiğini göstermektedir (19,66).

Öte yandan, serbest radikal aracılı protein oksidasyonu ve protein karbonil oluşumu gibi aminoasitlerdeki modifikasyonlar, protein sülfidril gruplarının azalması / tüketilmesi, tirozin rezidülerinin nitrozillenmesi ve AOPP oluşumları hücrelerde enzim aktivitelerinde bozulmaya / azalmaya, hücrelerde proteinlerin agregasyon, fragmentasyon ve denaturasyonlarına neden olur. Tüm bunlar diyabetik komplikasyonların en önemli nedenlerindedir. Çalışmamızda protein oksidasyonu, karbonilasyonu ve 3-NT düzeyleri ölçüm yapılan dokuların çoğunda kontrollerine göre artmış olarak bulunmuştur. Protein oksidasyonu, hidroperoksi, peroksinitrit, hidroksi ve peroksi gibi SOR türevleri varlığında, direkt ve indirekt bir çok yolla gerçekleşebilir. Protein oksidasyon ürünleri arasında PCC, 3-NT gibi yan zincir oksidasyon ürünleri, AOPP gibi çapraz bağlanma ürünleri bulunmaktadır. Oksidatif stresin erken aşamasında oluşan ve diğer stres parametrelerine göre daha uzun süre ve stabil kalabilen bu göstergeler güvenilir göstergeler olarak kabul edilmektedir (70). Peroksinitrit oluşumundaki artışlar diyabetik komplikasyonların gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Peroksinitrit anyonu proteinlerin tiyol gruplarını oksitleyerek, lipit peroksidasyonunu başlatarak ve aminoasitlerin tirozin grubunda nitrasiyona (nitro tirozin oluşumuna) neden olarak hücrelerde toksik etki gösterir. Nitrasyon antioksidan enzimlerin inhibisyonuna, signal ileti yollarında bozukluklara ve pankreas beta hücrelerde yıkıma neden olur (69). Çalışmamızda protein nitrasyonunun önemli bir göstergesi olan 3-NT düzeyleri de ölçümlenmiştir ve diyabette arttığı bilinen bu biyogösterge (71,72) çalıştığımız tüm dokularda kontrol grubuna göre anlamlı artışlar göstermiştir, bir başka deyişle nitrozatif stres artmış ve tedaviden sonra çoğu dokuda kontrol değerlerine düşmüştür.

Araştırmamızda çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyon ürünü olan HNE-4 histidin (4-hidroksi 2 nonenal-4 histidin) de plazmada ölçümlenmiştir. Oksidatif stres koşullarında HNE-4 his düzeyleri aşırı artmakta, yıkımları azalmaktadır. Bu ürün de proteinlere bağlanarak yapılarını bozar, böylece disfonksiyona neden olur. Diyabetik plazmada artmış olarak bulduğumuz HNE-4 düzeyleri fluvastatin tedavisinden sonra anlamlı olmayan az miktarda bir düşüş göstermiştir.

Öte yandan, bir çok araştırmacı kronik hipergliseminin antioksidan defans enzimlerinde aktivasyona neden olduğunu göstermiştir ve genel olarak bu durum artan oksidatif strese karşı artan bir defans mekanizması olarak yorumlanmaktadır(67,69,72,73,). Bizim çalışmamızda diyabetik grupta pankreas ve karaciğer homojenatlarında SOD aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. İlginç olarak, fluvastatinin SOD aktivitesini anlamlı olarak arttırdığı kontrol tedavili gruptaki çoğu doku homojenatlarında gözlenmiştir. CAT aktivitesi de kontrol - fluvastatin tedavisinden sonra pankreas dışındaki dokularda anlamlı olarak artmıştır. Kontrol grubunda tedaviden sonra GSH düzeyleri kalp ve böbrekte anlamlı olarak azalmıştır, diğer dokularda azalmalar anlamlı bulunmamıştır. Yapılan çalışmalarda diyabetik durumda GSH düzeylerinin sağlıklı durumdakine göre anlamlı şekilde düşük olduğu rapor edilmiştir (73). Bu durum aşırı oksidatif stresin GSH' ı tüketmesiyle ilişkilendirilmektedir. Öte yandan, STZ- diyabetik tavşanlarda yapılan bir çalışmada kolesterol düzeylerini düşüren dozlarda 11 ay fluvastatin tedavisinin böbrek dokusunda GSH-Px aktivitesinde düzelme sağladığı, CAT ve SOD aktivitelerini ise anlamlı olarak düzeltmediği, buna karşın, böbrek fonksiyonlarında düzelme sağladığı bildirilmiştir. (48). Öte yandan, literatürde deneysel diyabetik durumda GSH düzeyleri ve antioksidan enzim aktivitelerindeki farklı bulgular (azalma, artma ya da değişmeme) diyabetin süresi ve şiddeti ve de çalışılan dokulardaki farklılıklar ile açıklanmaya çalışılmaktadır.

Küçük ölçekli bir klinik çalışmada ise hiperlipidemik tip 2 diyabetik hastalarda fluvastatin ile kolesterol düşürücü dozlardaki tedavi ile oksidatif stres üzerinde yararlı etkiler bulunmuştur (49). Deneysel hiperkolesterolemik tavşan karotid arterinde de fluvastatin antioksidan etkiyle olumlu fonksiyonel etkiler göstermiştir (33). STZ- diyabetik sıçanlarda yürüttüğümüz araştırmalarda da kolesterol düzeylerini düşüren dozlarda uygulanan simvastatin tedavisiyle doku ve serumda ölçümlenen parametrelere göre antioksidan etkinlik belirlenmiştir (8,10,11).



Özetle bulgularımız, beklendiği gibi, kronik diyabette periferik dokularda oksidatif stresin arttığını ve düşük doz fluvastatin ile tedavinin bir çok oksidatif /nitrosatif stresle ilgili biyogöstergeleri olumlu yönde etkilediğini göstermiştir. Statinlerin antioksidan etki de dahil olmak üzere pleiotropik etkilerin çoğu için genel olarak açıklanan mekanizma/lar bu ilaçların hücrelerde kolesterol biyosentez yolağında yer alan isoprenoid sentezini inhibe etmeleriyle ilişkilendirilmektedir. (50). Statinlerin Rac 1 ve sonuçta NADPH oksidaz inhibisyonu ile antioksidan aktivite gösterdikleri saptanmıştır (52). Aşırı NADPH oksidaz aktivasyonu aşırı SOR üretimine ve sonuçta redoks duyarlı genlerin (kemotaksis, adhezyon molekülleri, proenflamatuvar sitokinler ve matriks metaloproteinaz) aktivasyonuna neden olmaktadır (55-57).

Araştırmamızda plazmada, oksidatif DNA hasar göstergelerinden olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanosin (8-OhdG ) düzeyleri de ölçümlenmiştir. Fluvastatinin oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etkinliği olduğu daha önce yapılan bir çalışmada gösterilmiştir ve bu etkinin fluvastatin ve metabolitlerinin hidroksil ve süperoksit radikallerini söndürücü özelliğine bağlı olarak geliştiği bildirilmiştir (41). Çalışmamızda plazma 8-OhdG düzeyleri, kontrol grubuna göre diyabetik grupta anlamlı olarak artmıştır. Fluvastatin tedavisi bu parametredaki artışı düşürmüştür, ne var ki, bu düşüş anlamlı düzeye erişememiştir. Bu konuda daha fazla çalışmaya gerek vardır. Düşük doz belki de bu yönde yeterli olmamaktadır. Doku 8-OhdG düzeylerinin de ölçülmesi ve doz- bağımlı çalışmaların yapılması bu yönüyle ilginç olabilir.

Bulgularımız, diyabetin erken döneminde komplikasyonlar ilerlemeden ya da pre-diyabetik dönemde statinlerin gelecekte düşük dozlarda kullanımlarının yararlı olabileceğini göstermektedir. Böylece oksidatif strese bağlı olarak gelişen organ hasarı hiperlipidemiye bakılmaksızın erken –düşük doz statin tedavisi ile önlenir. Ek olarak, diyabetin yanı sıra oksidatif stresin ve dolayısı ile enflamasyonun önemli olduğu öteki kronik hastalıklarda (ateroskleroz, hipertansiyon, romatoid artrit ve diğer enflamatuvar hastalıklar, nörolojik hastalıklar gibi) primer koruma amaçlı kullanım için de düşük doz fluvastatin ile yeni araştırmalar yapılabilir.

## **VI. Kaynaklar**

1. Kinlay S. Potential vascular benefits of statins. *Am J Med Suppl.*12A:62-67, 2005.
2. İrat AM, Ceylan-İşik A. HMG-KoA redüktaz inhibitörlerinin pleiotropik etkileri, *Ank Ecz Fak.Derg.* 35:197-209, 2006.
3. Zhou Q ve Liao JK. Statins and cardiovascular diseases: from cholesterol lowering to pleiotropy. *Curr Pharm Des* 15:467478, 2009.
4. Zhou Q ve Liao JK. Pleiotropic effects.of statins. *Circ J* 74: 818-826, 2010.
5. Carmena R ve Betteridge DJ. Statins and diabetes. *Semin Vasc Mol* 4:321-32, 2004.
6. Ginsberg HN. Efficacy and mechanism of action of statins in the treatment of diabetic dyslipidemia. *J Clin Endocr Metab* 91:383-392, 2006.
7. Ludwig S ve Shen GX. Statins for diabetic cardiovascular complications. *Curr Vasc Pharmacol* 3: 245-251, 2006.
8. Ceylan A, Karasu C, Aktan F, Güven C, Can B, Ozansoy G. Effects of simvastatin treatment on oxidant/antioxidant state and ultrastructure of diabetic rat myocardium. *Gen Physiol Biophys* 22: 535-47, 2003.
9. Nangle MR, Cotter MA, Cameron NE. Effects of rosuvastatin on nitric oxide-dependent function in aorta and corpus cavernosum of diabetic mice. Relationship to cholesterol biosynthesis pathway inhibition and lipid lowering. *Diabetes*, 52: 2396-2402, 2003.
10. Ceylan A, Karasu C, Aktan F, Ozansoy G. Simvastatin treatment restores vasoconstriction and the inhibitory effect of LPC on endothelial relaxation via affecting oxidizing metabolism in diabetic rats. *Diabetes Nutr Metab* 17:203-10, 2004.
11. Ozansoy G, Guven C, Ceylan A, Can B, Aktan F, Oz E, Gonul B. Effects of simvastatin treatment on oxidant/antioxidant state and ultrastructure of streptozotocin-diabetic rat lung. *Cell Biochem Funct* 12: 297-302, 2004.
12. Mahfouz MM. ve Kummerow F.A. Atorvastatin reduces the plasma lipids and oxidative stress but did not reverse the inhibition of prostacyclin generation by aortas in STZ diabetic rats. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 76:59-73, 2005.
13. Schafer A, Fraccarollo D, Vogt C, Flier LU, Hemberger M, Tas P, Ertl G, Bauersachs J. Improved endothelial function and reduced platelet activation by chronic HMG-CoA reductase inhibition with rosuvastatin in rats with STZ-induced diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol* 73:1367-1375, 2007.
14. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk J Biochem* 31:51-56, 2006.
15. Tripathi BK. Diabetes mellitus: Complications and therapeutics. *Med Sci Monit* 12:130-147, 2006.
16. Sawa T ve Akaike MH. Tyrosine nitration by peroxynitrite formed from nitric oxide and superoxide generated by xanthine oxidase. *J Biol Chem* 275:32467-32474, 2000.
17. Niedowicz DM ve Daleke DL. The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem Biophys* 43:289-330, 2005.
18. Elai M, Naseen K., Matata BM. Nitric oxide in blood. The nitrosative-oxidative disequilibrium hypothesis on the pathogenesis of cardiovascular disease. *FEBS J* 274: 806-823, 2007.
19. Valko M, Leibfritz D, Mançol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39:44-84, 2007.
20. Shen GX. Oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders: roles of mitochondria and NADPH oxidase. *Can J Physiol Pharmacol* 88: 241-248, 2010.
21. Sivitz WI ve Yorek MA. Mitochondrial dysfunction in diabetes: From molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 12:537-577, 2010.
22. Nessar A. AGES in pathology of diabetic complications. *Diab Res Clin Pract.* 67:3-21, 2005.
23. Haendeler J, Hoffmann J, Zehier AM., Dimmeler S. Antioxidant effects of statins via S-nitrosylation and activation of thioredoxin in endothelial cells: a novel vasculoprotective function of statins. *Circulation* 110, 856-861, 2004.
24. Fang YZ, Yang S, Guoyoa W. Free radicals, antioxidants, and nutrition. 18:872-879, 2002.
25. Ulusu NN, Sahilli M, Avcı A, Canbolat O, Ozansoy G, Arı N, Bali M, Stefek M, Stolc S, Gajdosik A, Karasu C. Pentose phosphate pathway, glutathione-dependent enzymes and

- antioxidant defense during oxidative stress in diabetic rodent brain and peripheral organs: Effects of stobadine and vitamin E. *Neurochem Res* 28:815-823, 2003.
26. Hamilton CA, Miller WH, Al-Benna S, Brosnan MJ, Drammond RD, McBride MW, Dominiczak AF. Strategies to reduce oxidative stress in cardiovascular disease. *Clin Sci* 106:219-34, 2004.
  27. Da Ros R, Assaloni R, Ceriello A. Antioxidant therapy in diabetic complications: what is new? *Curr Vasc Pharmacol* 2:335-41, 2004.
  28. Rosenson RS. Statins in atherosclerosis: lipid-lowering agents with antioxidant capabilities. *Atherosclerosis* 173:1-12, 2004.
  29. Fujii K, Goto K, Abe I, Iida M. Effects of fluvastatin on endothelium-derived hyperpolarizing factor- and nitric oxide-mediated relaxations in arteries of hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31:354-359, 2004.
  30. Zhou MS, Jaimes EA, Raj L. Atorvastatin prevents end-organ injury in salt sensitive hypertension. Role of eNOS and oxidant stress. *Hypertension* 44:186-190, 2004.
  31. Da Ros R, Assaloni R, Ceriello A. Molecular targets of diabetic vascular complications and potential new drugs. *Curr Drug Targets* 6:503-509, 2005.
  32. Marinou K, Stefanadi E, Latsios G, Stefanadis C. Novel therapies targeting vascular endothelium. *Endothelium* 13: 411-421, 2006.
  33. Sevin G, Gökçe G, Kerry Z. Fluvastatin improves vascular functions in rabbit carotid arteries loaded with oxidative stress *Ank Ecz Fak.Derg* 36:75-85, 2007.
  34. Lahera V, Goicoechea M, de Vinouse SG, Miana M, de las Heras N. Endothelial dysfunction, oxidative stress and inflammation in atherosclerosis: beneficial effects of statins. *Curr Med Chem* 14:243-248, 2007.
  35. Ulusoylar Ş, Ceylan-Işık A, Arı N, Ozansoy G. The investigation of effects of combination of hormone replacement therapy with atorvastatin on vascular functions of ovariectomized rats. *Gyn Endocrinol* 24 (Suppl.1):145, 2008.
  36. Uydeş-Doğan S, Arı N. Kardiyovasküler sistem ilaçlarının antoksidan etkileri ve statinler ile tedavinin anti-aging faydaları. *Türkiye Klin* 28(suppl 1) S48-S51, 2008.
  37. Bartoli M, Al-Shabrawey M, Labazi M, Behzadian MA, Istanbuli M, El-Remessy AB, Caldwell RW, Marcus DM, Marcus DM, Caldwell RB. HMG-CoA reductase inhibitors (statin) prevents retinal neovascularization in a model of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 50:4934-40, 2009.
  38. Briones AM, Rodriguez-Criado N, Hernanz R, Garcia-Redondo AB, Rodriguez-Diez RR ve ark., Atorvastatin prevents angiotensin II-induced vascular remodeling and oxidative stress. *Hypertension* 54:142-149, 2009.
  39. Montecucco F ve Mach F. Update on statin-mediated anti-inflammatory activities in atherosclerosis. *Semin Immunopathol* 31:127-142, 2009.
  40. Rikitake Y. ve Liao JK. Rho GTPases, statins and nitric oxide. *Circ.Res* 97:1232-1235, 2005.
  41. Imaeda A, Kaneko T, Aoki T, Kondo Y, Nakamura Y, Nagase H, Yoshikawa T. Antioxidative effects of fluvastatin and its metabolites against DNA damage in streptozotocin-treated mice. *Food Chem Toxicol* 40:1415-1422, 2002.
  42. Danesh F, Kanwar Y.S. Modulatory effects of HMG-CoA reductase inhibitors in diabetic microangiopathy. *FASEB J* 18:805-815, 2004.
  43. Ulusoylar Ş, Ceylan- Işık A, Arı N. Ozansoy G. Effects of chronically low-dose fluvastatin treatment in STZ-induced diabetic rats on vascular reactivity of aorta. *Atherosclerosis suppl.* 7(3), 2006.
  44. Haruna Y, Morita Y, Yada T, Satoh M, Fox DA, Kashibara N. Fluvastatin reverses endothelial dysfunction and increased vascular oxidative stress in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 56: 1827-1835, 2007.
  45. Sumi D, Hayashi T, Thakur NK, Jayachandran M, Asai Y, Kano H, Matsui H, Iguchi AA. HMG-CoA reductase inhibitor possesses a potent anti-atherosclerotic effect other than serum lipid lowering effects-the relevance of endothelial nitric oxide synthase and superoxide anion scavenging action. *Atherosclerosis* 155: 347-357, 2001.

46. Mitani H, Egashira K, Kimura M, A HMG-CoA reductase inhibitor, fluvastatin, has cholesterol-lowering independent “direct” effects on atherosclerotic vessel in high cholesterol diet-fed rabbits. *Pharmacol.Res.* 48:417-27, 2003.
47. Rikitake Y, Kawashima S, Takeshita S, Yamashita T, Azumi H, Yasahura M, Nishi H, Inoue N, Yokoyama M. Antioxidative properties of fluvastatin, a HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, 154:87-96, 2001.
48. Kurusu A, Shou I, Nakamura S, Fukui S, Shirato I, Tomino Y. Effects of the new HMG-CoA reductase inhibitor fluvastatin on anti-oxidant enzyme activities and renal function in STZ-induced diabetic rats. *Clin Experim Pharmacol Physiol* 27:767-770, 2000.
49. Miwa S, Watada H, Omura C, Takayanagi N, Nishiyama K, Tanaka Y, Onuma T, Kawamori R. Antioxidative effects of fluvastatin in hyperlipidemic type 2 diabetic patients. *Endocrine J* 52:259-264, 2005.
50. Takemoto M ve Liao JK. Pleiotropic effects of 3HMG-CoA inhibitors. *Arterioscler. Thromb.Vasc Biol* 21:1712-1719, 2001.
51. Laufs U, Kilter H, Konkol C, Wassmann S, Böhm M, Nickenig G. Impact of HMG -CoA reductase inhibition on small GTPases in the heart. *Cardiovasc Res* 53: 911-20, 2002.
52. Vecchione C, Gentile T, Aretini A, Marino G, Poulet R, Maffei A. A novel mechanism of action for statins against diabetes-induced oxidative stress. *Diabetologia* 50:874-880, 2007.
53. Wassmann S, Nickenig G. Pathophysiological regulation of AT1-receptor and implications for vascular disease. *J Hypertens* 24(Suppl 1):S15-21, 2006.
54. Yu Y, Fukuda N, Yao EH, Matsumoto T, Kobayashi N, Suzuki R, Tahira Y, Ueno T, Matsumoto K. Effects of an ARB on endothelial progenitor cell function and cardiovascular oxidation in hypertension. *Am J Hypert* 21:72-27, 2008.
55. Leiter LA ve Lewanczuk RZ. Of the renin-angiotensin system and reactive oxygen species Type 2 diabetes and angiotensin II inhibition. *Am J Hypertens* 18:121-8, 2005.
56. Dandona P, Ghanim H, Chaudhuri A. Angiotensin II and inflammation: the effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockade. *J Hum Hypertension* 21:20-7, 2007.
57. Skultetvova D, Filipova S., Riečanský I, Skultetv J. The role of angiotensin type I receptor in inflammation and endothelial dysfunction. *Rec Pat Cardiovasc Discov* 2:23-7, 2007.
58. Mazighi M, Lavallée PC, Labreuche J, Amarenco P. Statin therapy and stroke prevention: what known, what is new and what is next? *Curr Opin Lipidol* 18:622-25, 2007.
59. Sun Y, Oberley LW, Li YA. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 34, 497-500, 1998.
60. Aebi, H. Catalase. In: *Methods in Enzymology*. Packer L. (Ed.), Academic Press, Orlando, FL, pp. 125–126, 1984.
61. Zadeh-Nourooz J, Tajaddini-Sarmadi J, Wolff S. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal Biochem* 1994; 220:403–9, 1994
62. Uchiyama M ve Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86 : 271–278, 1978.
63. Reznick AZ ve Packer L. Oxidative damage to proteins : spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 233 : 357-63, 1994.
64. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Khoa TN, Capeillère-Blandin C, Anh Thu Nguyen A.T, Caneloup S, Dayer JM , Paul JP, Drüeke T, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immun* 161: 2524-32,1998.
65. Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Anal. Biochem.* 72:248–254, 1976.
66. Koh KK, Oh PC, Quon MJ. Does reversal of oxidative stress and inflammation provide vascular function. *Cardiovasc Res* 81:649-59,2009.
67. Nakashima A, Ohtawa M, Masuda N, Morikawa H, Iwasaki K. [Antioxidative effects of fluvastatin, and its major metabolites- II *Yakugaku Zasshi.* 121:113-6,2001.

68. Suzumura K, Ohashi N, Oka K, Yasuhara M, Narita H. Fluvastatin depresses the enhanced lipid peroxidation in vitamin E-deficient hamsters. *Free Radic Res.*35:815-23,2001.
69. Stadtman ER ve Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids.* 25:207-18, 2003.
70. Yazıcı C ve Köse K. Kronik böbrek yetmezliğinde oksidatif stres ve “biyomarkır”ları. *Nefroloji Derg.* 13:117-124, 2004.
71. Cumaoglu A, Cevik C, Rackova L, Ari N, Karasu C. Effects of antioxidant stobadine on protein carbonylation, advanced oxidation protein products and reductive capacity of liver in streptozotocin-diabetic rats: role of oxidative/nitrosative stress. *Biofactors* 30:171-8, 2007.
72. Li J, Sun YM, Wang YM, Li ZQ, Pan W, Cao HY. Comparison of effects of simvastatin versus atorvastatin on oxidative stres in patients with coronary heart disease. *Clin Cardiol,* 33:222-7, 2010.
73. Memişoğulları R. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fak Derg* 3:30-39, 2005.

## **VII. Ekler**

**a) Mali Bilanço ve Açıklamaları**

Ödenek: 22.500.00 TL

Harcanan: 14.950.00 TL

**b) Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar**

Makine ve teçhizat alınmamıştır

**c) Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar (varsa Kesim III'de yer almayan analiz ayrıntıları)**

-

**d) Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar) (Altyapı Projeleri için uygulanmaz)**

**BİLDİRİLER**

**Uluslar arası Bildiriler:**

- Cumaoglu A, İrat AM., Karasu Ç, Arıcıoglu A., Ozansoy G, Arı N. Oxidative stress parameters in kidney from streptozotocin diabetic rats: Effects of low-dose and long-term fluvastatin treatment. *SFRR-Europe Meeting 2009, Rome, Italy. Free Rad Res, 43:84(Supp. 1), p.no: 5, 2009.*
- İrat, A. Cumaoglu, E. Yuksel, T. Akhayeva, C. Karasu, A. Arıcıoglu, G. Ozansoy, N. Arı. Effects of low-dose, long-term fluvastatin treatment on oxidative/antioxidative parameters in the pancreas and heart from streptozotocin-induced diabetic rats. *45<sup>th</sup> Annual Meeting of The European Association for the Study of Diabetes (EASD), Vienna, Austria, 2009, Sept. 29 - Oct 02, Diabetologia, 52 (suppl 1): p1254, 2009.*

**Ulusal Bildiriler:**

- Cumağlu A, İrat A.M., Karasu Ç, Arıcıoğlu A, Ozansoy G. Arı N. Diyabetik sıçan karaciğerinde düşük doz kronik fluvastatin tedavisinin oksidatif stres parametreleri üzerindeki etkisi. *2. Antiaging ve Estetik Tıp Kongresi, 22-25 Ekim 2009, İzmir, Türkiye Klinikleri, 28(suppl ), s134, P-16, 2009.*

e) Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler **(Altyapı Projeleri için uygulanmaz)**

**Yayına hazırlanmaktadır.**

**NOT** :Verilen kesin rapor bir (1) nüsha olarak ciltsiz şekilde verilecek, kesin rapor Komisyon onayından sonra ciltlenerek bir kopyasının yer aldığı CD ile birlikte sunulacaktır. Kesin raporda proje sonuçlarını içeren, ISI' nın SCI veya SSCI veya AHCI dizinleri kapsamında ve diğer uluslar arası dizinlerce taranan hakemli dergilerde yayınlanmış makaleler, III. Materyal ve Yöntem ve IV. Analiz ve Bulgular bölümleri yerine kabul edilir.