

ATORVASTİN VE ROSUVASTATİNİN NEDEN OLDUĞU MİYOPATİYE KARŞI KAFEİK ASİD FENETİL ESTERİN KORUYUCU ETKİSİ

PROTECTIVE EFFECT OF CAFFEIC ACID PHENETHYL ESTER AGAINST MYOPATHY INDUCED BY ATORVASTIN AND ROSUVASTATIN

Serkan ŞEN, Canan YILMAZ

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı

ÖZET

AMAÇ: Statinlerin bazı hastalarda miyopatiye yol açması nedeni ile hastanın tedaviye uyumu azalmakta, ilacın kullanılmasına son verilmekte veya kullanılan ilaç değiştirilmektedir. Bu çalışmada statinlerin miyopatiye neden olabileceği iki durum olarak oksidatif stress ve inflamasyon üzerinde çalışılmış ve Kafeik asit fenil ester (CAPE)'in koruyucu rolü deneysel olarak test edilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM: Çalışmada rabdomyosarkom (RD) hücre hatları kullanılmıştır. Hücreler kontrol, atorvastatin, rosuvastatin, CAPE, atorvastatin+CAPE ve rosuvastatin+CAPE olmak üzere 6 gruba ayrılmıştır. Spektrofotometrik olarak Total Antioksidan Kapasite (TAC), Total Oksidan Kapasite (TOC) ve Oksidatif Stres İndeksi (OSI) analizleri yapılmış; Interlökin 6 (IL-6) düzeyleri hem protein düzeyinde hem de real time PCR ile mRNA ekspresyonu düzeyinde gösterilmiştir.

BULGULAR: Kontrol grubunda 1739 olan OSI atorvastatin uygulaması ile 3814'e çıkmış, atorvastatinin CAPE ile kombinasyonu sonucunda ise 2109'a inmiştir. Rosuvastatin ve Rosuvastatinin CAPE ile kombinasyonu sonucunda kontrol grubuna göre OSI bakımından bir değişiklik olmamıştır. Atorvastatin grubunda IL-6 mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna benzer bulunurken, Rosuvastatin grubunda kontrol grubuna nazaran 2,369 kat artış gözlenmiştir. Rosuvastatinin CAPE ile kombinasyonu neticesinde IL-6 mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubu seviyesine çekildiği tespit edilmiştir.

SONUÇ: Bu çalışmada Atorvastatinin RD hücre hatlarında oksidatif stresi tetiklediği, rosuvastatinin ise IL -6 mRNA ekspresyon düzeyini artırarak proinflamasyona giden sürecin önünü açtığı gözlemlenmiştir. Atorvastatinin neden olduğu oksidatif stresin ve rosuvastatinin neden olduğu inflamasyonun baskılanmasında CAPE kombinasyonunun işlevsel olduğu tespit edilmiştir. Bu bakımdan tedavide atorvastatin ve rosuvastatinin CAPE ile kombinasyonunun statinlerin neden olduğu kas hasarı üzerine hasta yararına olumlu sonuçlarının olabileceği gösterilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Atorvastatin, Rosuvastatin Kalsiyum, Miyopati, Kafeik Asid Fenetil Ester.

ABSTRACT

OBJECTIVE: Due to the fact that statins cause myopathy in some patients, the patient's compliance with the treatment decreases, and the treatment is interrupted or drug is changed. In this study, oxidative stress and inflammation, two conditions in which statins can cause myopathy, were studied and the protective role of Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) was tested experimentally.

MATERIAL AND METHODS: Rhabdomyosarcoma (RD) cell lines were used in the study. Cells were divided into 6 groups as control, atorvastatin, rosuvastatin, CAPE, atorvastatin+CAPE and rosuvastatin+CAPE. Total Antioxidant Capacity (TAC), Total Oxidative Capacity (TOC), and Oxidative Stress Index (OSI) analyses were made spectrophotometrically; Interleukin 6 (IL-6) levels were demonstrated both at the protein level by ELISA and at the level of mRNA expression by real time PCR.

RESULTS: OSI, which was 1739 in the control group, increased to 3814 with atorvastatin application and decreased to 2109 with the combination of atorvastatin and CAPE. There was no change in OSI levels in Rosuvastatin and Rosuvastatin and CAPE combination compared to the control group. While IL-6 mRNA expression levels were found to be similar to the control group in the atorvastatin group, an increase of 2.369 times was observed in the Rosuvastatin group compared to the control group. As a result of the combination of rosuvastatin with CAPE, it was determined that IL-6 mRNA expression levels were reduced to the level of the control group.

CONCLUSIONS: In this study, it was observed that atorvastatin triggered oxidative stress in RD cell lines, while rosuvastatin increased the expression level of IL-6 mRNA and paved the way for the process leading to proinflammation. The combination of CAPE was found to be functional in suppressing oxidative stress caused by atorvastatin and inflammation caused by rosuvastatin. In this regard, it has been shown that the combination of atorvastatin and rosuvastatin with CAPE may have positive results for the benefit of the patient on muscle damage caused by statins.

KEYWORDS: Atorvastatin, Rosuvastatin Calcium, Myopathy, Caffeic Acid Phenethyl Ester.

Geliş Tarihi / Received: 24.08.2022

Kabul Tarihi / Accepted: 28.11.2022

Yazışma Adresi / Correspondence: Öğr. Gör. Dr. Serkan ŞEN

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı

E-mail: serkansen07@gmail.com

Orcid No (Sırasıyla): 0000-0002-2884-4753, 0000-0002-6799-6522

GİRİŞ

Sterol biyosentez yolağındaki kilit adımlardan biri olan Hidroksimetilglutaril-CoA (HMG-CoA) redüktaz enziminin inhibitörleri olan statinler, mantar kökenli moleküllerdir. Statinler, güçlü kolesterol düşürücü ilaçlardır ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesine olağanüstü katkılar sağlamıştır. Statin kullanımı nedeniyle kas ağrısı, miyotoksisite ve rhabdomyoliz geliştiği önceki çalışmalarda sıklıkla rapor edilmiştir (1 - 4).

Statinler günümüzde dislipidemiye bağlı kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için en etkili oral ajanlar olarak bilinmektedir. Atorvastatin ve rosuvastatin aktif β -hidroksi asit formunda reçete edilmektedir. Statinlerin farmakolojik tepkisi, HMG-CoA redüktazı inhibe edecekleri hepatosite ulaşma yeteneklerine bağlıdır (5). HMG-CoA redüktazın inhibisyonu sadece kolesterol sentezini değil, aynı zamanda ubikinon, steroidler, safra asitleri, D vitamini ve ayrıca geranilgeranil pirofosfat ve farnesil pirofosfat sentezini de azaltmaktadır (6).

Propolisin önemli bir fenolik aktif bileşeni olan kafeik asid fenetil ester (CAPE), antimikrobiyal, antitümöral, antioksidan, antiinflamatuar ve benzeri gibi geniş bir farmakolojik aktiviteye sahiptir (7). ROS'u temizleme ve immünomodülatör yetenekleri nedeniyle, CAPE'nin kardiyomiyosit apoptozunun zayıflaması ve miyokardiyal enfarktüs boyutunun azaltılması dâhil olmak üzere hem in vitro hem de in vivo çalışmalarda kalp kası koruyucu etkinlikte olduğu bildirilmiştir (8, 9). Bu çalışmada atorvastatin ve rosuvastatin uygulanan Rhabdomyosarkom (RD) hücre hattında bu statinlerle CAPE kombinasyonunun inflamasyon ve oksidatif stress üzerine etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Türkiye Şap Enstitüsü hücre kültürü kataloğundan elde edilen insan rabdomiyosarkom hücre hatları olan RD hücre hatları kullanıldı. Hücreler %10 (v/v) oranında ısı ile inaktif edilmiş fetal bovibe serumu (FBS) ve 5 mM glutamin, 100 U/ml penisilin, 1 mM sodyum piruvat içeren DMEM besiyerinde 37°C, %5 CO₂ ve %95 hava içeren bir atmosferde inkübe edildi.

MTT Hücre Viabilite Testi

Hücre canlılığı ölçümü için metabolik olarak aktif hücreler tarafından redüksiyona uğratarak formazon kristallerini oluşturan MTT ayracının(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)kullanıldığı MTT testi yapıldı (10).96 kuyucuklu well platelere her bir kuyucuğa 1x10⁴ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler flask tabanına yapışıp %70'ini kapladığında IC50 doz belirleme çalışması için ajanların uygulamasına geçildi. Atorvastatin (was purchased from Adooq Bioscience, Cat No: A11800), Rosuvastatin (was purchased from Adooq Bioscience, Cat No: A10810) ve CAPE(was purchased from Selleckchem, Cat. No: S7414)'nin 24 saat süreyle 8 tekrar olacak şekilde 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M, 100 μ M, 500 μ M ve 1000 μ M konsantrasyonlarında 8 farklı dozu uygulandı. Tüm ajanlar DMSO'da çözüldü ve kontrol grubu hücrelerine ise %0.05 lik DMSO uygulandı. Uygulama sonunda ajan bulunan mediumlar taze ve FBS'siz mediumla ile değiştirildi. 100 μ l medium hacmine 10 μ l MTT solüsyonu (5mg/ml) eklenerek 4 saat 37°C, %5 CO₂ ve %95 hava ortamında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyucuklar boşaltıldı, oluşan formazon kristalleri 100 μ l DMSO ile çözünerek 570 nm dalga boyunda Optik Dansite (O.D.) değerleri ELISA readerda (Epoch, Biotek, USA) okundu. Konsantrasyon ve O.D. değerleri GraphPad Prism version 8.0.1 (GraphPad Software, Inc., CA, USA) programına girilip konsantrasyonların logaritmalarının normalize edilmiş O.D. değerlerine göre grafiğe geçirilip IC₅₀ dozları hesaplandı.

Deney Grupları

Çalışmada kontrol, atorvastatin, rosuvastatin, CAPE, atorvastatin+CAPE ve rosuvastatin+CAPE olmak üzere 6 deney grubu kullanıldı. Her bir gruba bahsedilen ajanlar tek, tek ve CAPE ile kombine edilmiş halde 24 saat süreyle IC₅₀ dozlarında maruz bırakıldı.

Hücre Lizatlarının Hazırlanması ve Total Protein Ölçümü

2,2x10⁶ hücre olacak şekilde 100mm'lik petri kaplarına (VWR, PA, USA) hücrelerin ekimi yapıldı. Petri kabı tabanını %70 kaplayan hücre hatlarına belirlenen IC₅₀ dozlarında 24

saat boyunca Atorvastatin, Rosuvastatin ve CAPE uygulaması yapıldı. Inkübasyon sonunda medium atıldı ve hücrelerden buz üzerinde lizis buffer (%1 TritonX 100, 50mM HEPES Buffer, 100mM Na₂HPO₄.2H₂O, %8 protease inhibitor cocktail) uygulaması ile lizatlar elde edildi. İlgili lizatlardan BCA metodu (TaKaRa, Shiga, Japan) ile total protein ölçümü yapıldı.

IL-6 Düzeylerinin Belirlenmesi

Lizatlardan IL-6 seviyeleri ölçümü ELISA kiti (eBioscience, Vienna, Austria) vasıtasıyla gerçekleştirildi. Her grup için ölçülen IL-6 değeri o grubun total protein seviyelerine bölünerek gruplar arasındaki IL-6 seviyeleri kıyaslandı.

TAC, TOC ve OSI Düzeylerinin Belirlenmesi

TOC ve TAC ölçümleri Erel'in geliştirdiği metodlara göre (10, 11) yapıldı. Her iki ölçüm sonucunda tespit edilen değerler total protein değerlerine bölündü. TAC ve TOC ölçümleri yapıldıktan sonra, oksidan ve antioksidan dengeye ilişkin daha net yorum yapılabilmesine olanak veren oksidatif stres indeksi (OSI) aşağıdaki formüle göre hesaplandı (11, 12).

$$OSI = [(TOC, \mu\text{mol/L}) / (TAC, (\text{mmol Trolox Equiv/L}) \times 100)]$$

Real Time QPCR

mRNA transkripsiyon düzeyi analizlerinde kullanılacak RNA'lar spin kolon yöntemi ile çalışan hazır ticari kit kullanılarak yapıldı (EURx Gene-Matrix, Gdansk, Poland, Catalog No: E3598). İzole edilen RNA'ların miktar tayini ve saflık derecesi Epoch Take3 plate sistemi kullanılarak analiz edildi. PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmak üzere her bir örneğe ait RNA'dan 1µg alınarak önce reverz transkriptaz (RT) ile komplementari DNA (cDNA) sentezi yapıldı. Daha sonra her bir örneğe ait cDNA'dan 1µl alınarak üzerine SYBR green master miks ve bir çift primer (oligonükleotid) konuldu. House keeping gen olarak beta aktin (Forward: 5'- GCT-CTTTCCAGCCTTCCTT-3' / Reverse: 5'-CTTCTGCATCCTGTCAGCAA-3') kullanıldı. Beta aktin PCR protokolünde PCR miksi hot start için 95 °C 2 dk 1 döngü tutulduktan sonra 35 döngü 95

°C 30 sn/62 °C, 30 sn/72 °C 45 sn termal profili uygulandı. IL-6 geni için Forward: 5'-TGGTCTTT-TGGAGTTTGAGGTA-3' / Reverse: 5'-AGGTTTCT-GACCAGAAGAAGGA-3' primer olarak kullanıldı. IL-6 PCR protokolünde PCR miksi hot start için 95 °C 10 dk 1 döngü tutulduktan sonra 40 döngü 95 °C 15 sn/60°C 60 sn/72 °C 30 sn termal profili uygulandı. Elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşiği (Ct) değerlerinden hareketle, hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri 2^{-ΔΔCt} metodu (13) ile REST2009 programı kullanılarak hesaplandı ve istatistiği yapıldı.

Etik Kurul

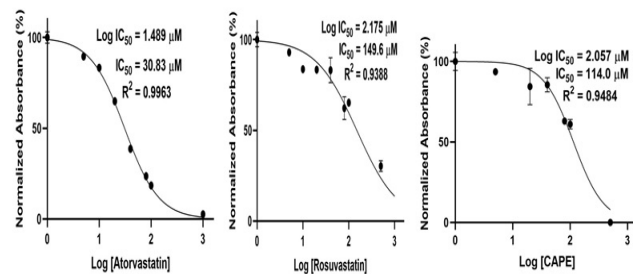
Bu çalışmada tamamen ticari olarak elde edilen hücre hatları üzerinde laboratuvar deneyleri yapılmıştır, bu nedenle etik onayı gerektirmemektedir.

İstatistiksel Analiz

Çalışma kapsamında elde edilen veriler GraphPad Prism version 8.0.1 (GraphPad Software, Inc., CA, USA) programı kullanılarak analiz edildi. Verilerin Kolmogorov-Smirnov testi ile normal dağılım gösterip göstermedikleri analiz edildi. Veriler normal dağılım gösterdiği için üç ya da daha fazla grubun kıyası maksadıyla parametrik testlerden One Way ANOVA testi kullanıldı. Değişkenler arasındaki ilişkilerin incelenmesi için Dunnett's korelasyon analizleri yapıldı. P<0,05 istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

BULGULAR

Atorvastatin IC₅₀ dozu 30,83 µM, Rosuvastatin IC₅₀ dozu 149,6 µM ve CAPE IC₅₀ dozu 114 µM olarak tespit edildi (**Şekil 1**).



Şekil 1: Atorvastatin, Rosuvastatin ve CAPE'in IC₅₀ dozları.

Atorvastatin uygulanan grupta total oksidan kapasite 0,02796 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./mg protein olarak bulunurken total antioksidan kapasite 0,000748 mmol Trolox Equiv./mg protein olarak tespit edilip, oksitativ stress indeksi 3814 olarak hesaplandı (**Tablo 1, Tablo 2 ve Şekil 2**).

Tablo1: Gruplar arasındaki OSI ve IL-6 düzeylerinin istatistiksel karşılaştırılması.

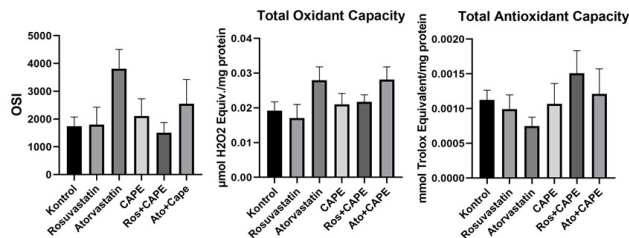
| Parametreler | Grupların birbirlerine kıyası | Ortalama Fark | %95,00 güven aralığı | Düzeltilmiş p değeri |
|----------------------------------|-------------------------------|---------------|------------------------|----------------------|
| OSI (pg/ μg protein) | Kontrol vs. Rosuvastatin | -57,65 | -789,4 to 674,1 | 0,9997 |
| | Kontrol vs. Atorvastatin | -2075 | -2647 to -1502 | <0,0001 |
| | Kontrol vs. CAPE | -369,6 | -892,9 to 153,7 | 0,2549 |
| | Kontrol vs. Ros+CAPE | 237,6 | -39,69 to 514,9 | 0,1082 |
| | Kontrol vs. Ato+CAPE | -811,5 | -1561 to -62,04 | 0,0302 |
| | Rosuvastatin vs. Atorvastatin | -2017 | -2692 to -1341 | <0,0001 |
| | Rosuvastatin vs. CAPE | -312 | -1143 to 519,5 | 0,7899 |
| | Rosuvastatin vs. Ros+CAPE | 295,3 | -447,2 to 1038 | 0,7503 |
| | Rosuvastatin vs. Ato+CAPE | -753,9 | -1652 to 144,0 | 0,1186 |
| | Atorvastatin vs. CAPE | 1705 | 945,7 to 2464 | <0,0001 |
| | Atorvastatin vs. Ros+CAPE | 2312 | 1618 to 3007 | <0,0001 |
| | Atorvastatin vs. Ato+CAPE | 1263 | 544,0 to 1982 | 0,0007 |
| | CAPE vs. Ros+CAPE | 607,2 | 1,893 to 1213 | 0,0492 |
| | CAPE vs. Ato+CAPE | -441,9 | -1109 to 225,6 | 0,3146 |
| | Ros+CAPE vs. Ato+CAPE | -1049 | -1855 to -243,3 | 0,0096 |
| IL-6 (pg/ μg protein) | Kontrol vs. Rosuvastatin | 0,01126 | 0,002710 to 0,01980 | 0,0234 |
| | Kontrol vs. Atorvastatin | 0,01767 | 0,002436 to 0,03290 | 0,0333 |
| | Kontrol vs. CAPE | 0,02054 | 0,01382 to 0,02726 | 0,0020 |
| | Kontrol vs. Ros + CAPE | 0,008989 | -0,001718 to 0,01970 | 0,0794 |
| | Kontrol vs. Ato+CAPE | 0,01851 | 0,01280 to 0,02423 | 0,0018 |
| | Rosuvastatin vs. Atorvastatin | 0,006413 | -0,001404 to 0,01423 | 0,0842 |
| | Rosuvastatin vs. CAPE | 0,009283 | 0,006161 to 0,01241 | 0,0022 |
| | Rosuvastatin vs. Ros + CAPE | -0,002267 | -0,006409 to 0,001874 | 0,2200 |
| | Rosuvastatin vs. Ato+CAPE | 0,007255 | 0,003455 to 0,01106 | 0,0080 |
| | Atorvastatin vs. CAPE | 0,002870 | -0,007765 to 0,01351 | 0,6755 |
| | Atorvastatin vs. Ros + CAPE | -0,008680 | -0,01660 to 0,0007590 | 0,0390 |
| | Atorvastatin vs. Ato+CAPE | 0,0008423 | -0,01067 to 0,01235 | 0,9966 |
| | CAPE vs. Ros + CAPE | -0,01155 | -0,01825 to 0,004855 | 0,0108 |
| | CAPE vs. Ato+CAPE | -0,002028 | -0,004534 to 0,0004777 | 0,0872 |
| | Ros + CAPE vs. Ato+CAPE | 0,009523 | 0,003637 to 0,01541 | 0,0130 |

P<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 2: TOC, TAC ve OSI düzeyleri

| | Kontrol | Rosuvastatin | Atorvastatin | CAPE | Ros+CAPE | Ato+CAPE |
|-----|--------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| TOC | Ortalama | 0,01923 ^a | 0,01704 ^a | 0,02796 ^b | 0,02103 ^a | 0,02818 ^a |
| | Standart Sapma | 0,002518 | 0,003939 | 0,003867 | 0,003160 | 0,003643 |
| | Standart ortalama hatası | 0,0006294 | 0,001137 | 0,001034 | 0,0007900 | 0,0005821 |
| TAC | Ortalama | 0,001124 ^a | 0,000993 ^a | 0,000748 ^b | 0,001068 ^a | 0,001211 ^a |
| | Standart Sapma | 0,000142 | 0,000205 | 0,0001288 | 0,0002937 | 0,0003248 |
| | Standart ortalama hatası | 0,0000355 | 0,00005918 | 0,00003442 | 0,00007343 | 0,00009375 |
| OSI | Ortalama | 1739 ^a | 1797 ^a | 3814 ^b | 2109 ^a | 2551 ^a |
| | Standart Sapma | 335,2 | 629,5 | 686,8 | 622,9 | 872,6 |
| | Standart ortalama hatası | 83,80 | 181,7 | 183,6 | 155,7 | 218,2 |

TOC ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./mg protein), TAC (mmol Trolox Equivalent/mg protein), OSI düzeyleri. Farklı üssü üfadedi gruplar arasında istatistiksel farklılık bulunmaktadır. p<0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 2: Gruplar arasındaki TOC, TAC ve OSI düzeyleri.

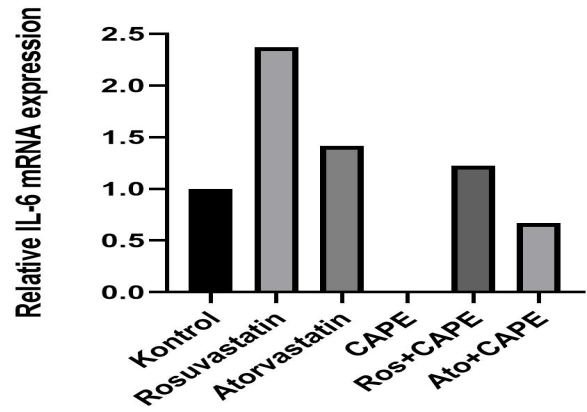
Atorvastatinle beraber CAPE uygulanan grupta total oksidan kapasite 0,02818 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./mg protein olarak tespit edilmişken antioksidan kapasite 0,001211 mmol Trolox Equiv./mg protein olarak bulunmuş olup oksidatif stress indeksi 2551 olarak hesaplandı (Tablo 1, Tablo 2 ve Şekil 2). Rosuvastatin uygulanan grupta total oksidan kapasite 0,01704 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./mg protein olarak bulunurken total antioksidan kapasite 0,000993 mmol Trolox Equiv./mg protein olarak tespit edilip, oksitativ stress indeksi 1797 olarak hesaplandı (Tablo 2).

Rosuvastatinle beraber CAPE uygulanan grupta total oksidan kapasite 0,02172 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./mg protein olarak tespit edilmişken antioksidan kapasite 0,00151 mmol Trolox Equiv./mg protein olarak bulunmuş olup oksidatif stress indeksi 1502 olarak hesaplandı (Tablo 2). IL-6 mRNA ekspresyon düzeyleri Rosuvastatin grubunda kontrol grubuna nazaran 2,369 kat (p=0,012), Atorvastatin grubunda 1,415 kat (p=0,531) ve Ros+CAPE grubunda 1,223 kat (p=0,565) uyarıyordu. CAPE ve Ato+CAPE gruplarında ise IL-6 mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna nazaran sırasıyla 0,005 kat (p=0,001) ve 0,669 kat (p=0,734) baskılandı (**Tablo 3, Şekil 3**).

Tablo 3: IL-6 mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla nispi artışlarının karşılaştırılması.

| Gruplar | Ekspresyon | Standart Hata | P Değeri |
|--------------|------------|---------------|----------|
| Rosuvastatin | 2,369 | 1,624 - 3,939 | 0,012 |
| Atorvastatin | 1,415 | 0,586 - 2,661 | 0,531 |
| CAPE | 0,005 | 0,002 - 0,013 | 0,001 |
| Ros+CAPE | 1,223 | 0,614 - 2,258 | 0,565 |
| Ato+CAPE | 0,669 | 0,026 - 6,718 | 0,734 |

P<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 3: Hücresel izolatlarından elde edilen IL-6 protein miktarları.

TARTIŞMA

CAPE uygulamasıyla hem hücre izolatlarından elde edilen IL-6 seviyelerini (p=0,002) hem de IL-6 mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna nazaran düştü (p=0,001). Bu bakımdan literatür verilerinde IL-6 blokörü olarak aktarılan CAPE için bu bilgi doğrulanmış oldu (14,

15). Rosuvastatin uygulaması IL-6 mRNA ekspresyon düzeylerini artırmamasına rağmen aynı etki protein düzeyinde görülmedi. Bu durumun 24 saatlik uygulama süresi ile alakalı olabileceği düşünüldü. Rosuvastatin ile beraber CAPE kombinasyonu hem IL-6 mRNA ekspresyon düzeyini hem de IL-6 protein düzeylerini kontrol grubuna kıyasla benzer değerlere indirdi ($p=0,565$). Bu bakımdan Rosuvastatinin proinflamasyona neden olmasının CAPE tarafından başarı ile baskılandığı gösterildi.

Dünya genelinde en sık reçetelenen kolesterol düşürücü ilaçlar olan statinler (16) nedeni tam bilinmemekle beraber kas hasarına neden olmaktadır (17). Bu çalışmada atorvastatin grubunun TOC düzeyi kontrol grubuna nazaran daha yüksek ($p<0,0001$), TAC ise daha düşük tespit edildi ($p<0,0001$). Bu bakımdan atorvastatinin RD hücrelerinde antioksidan kapasiteyi baskılamak ve oksidan kapasiteyi tetiklemek suretiyle OSI değerini yukarı çektiği ve kontrol grubuna nazaran oksidatif strese neden olduğu gözlemlendi ($p<0,0001$) (Tablo 1, Tablo 2). Atorvastatinin neden olduğu oksidatif stress, CAPE kombinasyonu ile baskılandı ve bu baskılanma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,0007$). Buna rağmen yalnız CAPE uygulanan hücrelerin TAC ($p=0,9292$), TOC ($p=0,0911$) ve OSI ($p=0,2549$) değerleri kontrol grubuyla benzerdi (Tablo 2, Şekil 2).

Bu bulgulara benzer şekilde Bouitbir ve ark. statin kullanan ve myopati semptomlarına rastlanan hastaların deltoid kas biyopsilerinde oksidatif stresin kontrol grubuna nazaran belirgin bir şekilde daha yüksek olduğunu tespit etmiştir (18). Literatür verileri ele alındığında özellikle atorvastatin grubunda elde edilen oksidatif stres bulgularımızla çelişen yayınlara rastlanmış fakat bu yayınlarda deney materyali olarak kas hücresi ya da kas biyopsi numunesi değil hasta serumu kullanılmıştır (19, 20).

Her ne kadar yukarıda sunulduğu şekliyle atorvastatinin kaslarda oksidatif hasara neden olması ile alakalı yayınlar olsa da bunun tersini söyleyen yayınlara da rastlanmıştır. Bu yayınların çoğu hiperkolesterolemili hastaların statin

kullanımına yönelik çalışmalardır. Bilinmektedir ki, hiperkolesterolemi, esas olarak nitrik oksiti yok edebilen ve damar duvarındaki yararlı ve koruyucu etkilerini bozabilen serbest oksijen radikallerinin üretiminden kaynaklanan endotelial disfonksiyon ile ilişkilendirilmektedir. Dolayısıyla başlı başına hiperkolesterolemi oksidatif stres açısından risk faktörüdür (21, 22).

Hali hazırda hiperkolesteroleminin yol açtığı bir oksidatif stresin olduğu in-vivo çalışmalarda Atorvastatinin hiperkolesterolemiyi baskılamak suretiyle oksidatif stresten korunma açısından olumlu katkılarının olduğu bilinmektedir (23). Bu bağlamda bu çalışma kapsamında ele alınan her iki statin için de uygulanan doz, uygulama süresi ve hiperkolesterolemi varlığının OSI değeri açısından önemli olduğu düşünülmüştür.

Rosuvastatin uygulaması sonucunda gerek total oksidan kapasite ($p=0,1749$) gerek total antioksidan kapasite ($p=0,5305$) gerekse de oksidatif stress indeksi ($p=0,9997$) bakımından kontrol grubuna nazaran istatistiki anlamlı olacak bir değişim olmadı (Şekil 2, Tablo 2). Hücre lizatlarında IL-6 seviyelerinin tespitinde; en yüksek oranda CAPE grubunda ($p=0,002$) olmak üzere Atorvastatin ($p=0,033$) ve Rosuvastatin ($p=0,0234$) gruplarında IL-6 seviyelerinin kontrol grubuna nazaran düştüğü gözlemlendi (Tablo 1, Şekil 3).

IL-6 mRNA ekspresyon düzeylerindeki Kontrol grubuna nazaran Rosuvastatinin neden olduğu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p=0,012$) Atorvastatin grubundaki ekspresyon düzeyi istatistiki olarak kontrol grubuna benzer bulundu ($p=0,531$). Rosuvastatinin neden olduğu IL-6 mRNA ekspresyon düzeyi artışı CAPE kombinasyonu ile kontrol grubu seviyesine indirildiği tespit edildi. Bu bakımdan Rosuvastatinin neden olduğu IL-6 mRNA ekspresyon düzeyi artışına CAPE tedavi edici etkide bulundu. Yalnız CAPE uygulanan grupta tüm gruplara nazaran IL-6 mRNA ekspresyon düzeyinde dramatik bir şekilde düşüş gözlemlendi bu düşüş kontrol grubuna nazaran istatistiki olarak anlamlı bulundu ($p=0,001$).

Bu sonuçlar bağlamında CAPE'in IL-6 seviyelerini düşürmesi literatür verileri ile uyumlu bulunmuştur (24, 25). CAPE'nin kardiyomiyosit apoptozunun zayıflaması ve miyokardiyal enfarktüs boyutunun azaltılması dâhil olmak üzere hem in vitro hem de in vivo çalışmalarda kalp kası koruyucu etkinlikte olduğu bildirilmiş olup (8, 9) daha önceki literatür verilerinde CAPE'in statinlerle kombinasyonuna rastlanmadı. Bu çalışmada in vitro olarak atorvastatinin RD hücrelerinde neden olduğu oksidatif strese karşı CAPE'in koruyucu etki gösterdiği tespit edildi. Ayrıca Rosuvastatinin RD hücrelerinde neden olduğu inflamatuvar sürecin CAPE tarafından baskılandığı tespit gösterildi. Bununla birlikte CAPE'in atorvastatin ve rosuvastatinin neden olduğu kas hasarına karşı olumlu etkilerinin hangi mekanizmalarla gerçekleştiğinin açığa kavuşturulması için hayvan deneyleri ve insan çalışmalarına ihtiyaç olacağı düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2021-71117 proje numarası ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Stroes ES, Thompson PD, Corsini A, et al. European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Statin-associated muscle symptoms: impact on statin therapy-European Atherosclerosis Society Consensus Panel Statement on Assessment, Aetiology and Management. *Eur Heart J*. 2015;36(17):1012-22.
2. Nielsen SF, Nordestgaard BG. Statin use before diabetes and risk of microvascular disease: a nation wide nested matched study. *Lancet Diabet Endocrinol*. 2014;2:894-900.
3. Nielsen SF, Nordestgaard BG, Bojesen SE. Statin use and reduced cancer-related mortality. *N Engl J Med*. 2012;367:1792-802.
4. Phillips PS, Haas RH, Bannykh S, et al. Statin-associated myopathy with normal creatine kinase levels. *Ann Intern Med*. 2002;137:581-5.
5. Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2005;19:117-25.
6. Du Souich P, Roederer G, Dufour R. Myotoxicity of statins: Mechanism of action. *Pharmacol Ther*. 2017;175:1-16.
7. Zhang P, Tang Y, Li NG, Zhu Y, Duan JA. Bioactivity and chemical synthesis of caffeic acid phenethyl ester and its derivatives. *Molecules*. 2014;19(10):16458-76.
8. Li D, Wang X, Huang Q, Li S, et al. Cardioprotection of CAPE-oNO 2 against myocardial ischemia/reperfusion induced ROS generation via regulating the SIRT1/eNOS/NF-κB pathway in vivo and in vitro. *Redox Biol*. 2018;15:62-73.
9. Parlakpınar H, Sahna E, Acet A, Mizrak B, Polat A. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on myocardial ischemia-reperfusion-induced apoptotic cell death. *Toxicology*. 2005;209(1):1-14.
10. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol. Methods*. 1983;65:55-63.
11. Erel Ö. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem*. 2004;37(2):112-9.
12. Erel Ö. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 2005;38(12):1103-11.
13. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):45.
14. Akgun B, Ozturk S, Artas G, Erol FS. Effects of Intrathecal Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on IL-6 and TNF-α Levels and Local Inflammatory Responses in Spinal Cord Injuries. *Turk Neurosurg*. 2018;28(4):625-9.
15. Yiğit U, Kırzioğlu FY, Uğuz AC, Nazıroğlu M, Özmen Ö. Is caffeic acid phenethyl ester more protective than doxycycline in experimental periodontitis? *Arch Oral Biol*. 2017;81:61-8.
16. Gazzero P, Proto MC, Gangemi G, et al. Pharmacological actions of statins: a critical appraisal in the management of cancer. *Pharmacol Rev*. 2012;64(1):102-46.
17. Tomaszewski M, Stępień KM, Tomaszewska J, Czuczwar SJ. Statin-induced myopathies. *Pharmacol Rep*. 2011;63(4):859-66.
18. Bouitbir J, Charles AL, Echaniz-Laguna A, et al. Opposite effects of statins on mitochondria of cardiac and skeletal muscles: a 'mitohormesis' mechanism involving reactive oxygen species and PGC-1. *Eur Heart J*. 2012;33(11):1397-407.
19. Kilit C, Koçak FE, Kilit TP. Comparison of the effects of high-dose atorvastatin and high-dose rosuvastatin on oxidative stress in patients with acute myocardial infarction: A pilot study. *Turk Kardiyol Dern Ars*. 2017;45(3): 235-43.
20. Koksall M, Eren MA, Turan MN, Sabuncu T. The effects of atorvastatin and rosuvastatin on oxidative stress in diabetic patients. *Eur J Intern Med*. 2011;22(3):249-53.
21. Yang RL, Shi YH, Hao G, et al. Increasing Oxidative Stress with Progressive Hyperlipidemia in Human: Relation between Malondialdehyde and Atherogenic Index. *J Clin Biochem Nutr*. 2008;43(3):154-8.

22. Klafke JZ, da Silva MA, Panigas TF, et al. Effects of *Camponomesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. *J Ethnopharmacol.* 2010;127(2):299-305.

23. Carnevale R, Pignatelli P, Di Santo S, et al. Atorvastatin inhibits oxidative stress via adiponectin-mediated NADPH oxidase down-regulation in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis.* 2010;213(1):225-34.

24. Tolba MF, Azab SS, Khalifa AE, et al. Caffeic acid phenethyl ester, a promising component of propolis with a plethora of biological activities: a review on its anti-inflammatory, neuroprotective, hepatoprotective, and cardioprotective effects. *IUBMB Life.* 2013;65(8):699-709.

25. Akgun B, Ozturk S, Artas G, et al. Effects of Intrathecal Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on IL-6 and TNF- α Levels and Local Inflammatory Responses in Spinal Cord Injuries. *Turk Neurosurg.* 2018;28(4):625-9.