

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA ŠILC

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA ŠILC

**SISTEMATIČNI PREGLED IZSLEDKOV RAZISKAV O ANTIOKSIDATIVNIH
LASTNOSTIH FLUVASTATINA**

**SYSTEMATIC REVIEW OF RESULTS OF STUDIES EVALUATING
ANTIOXIDATIVE PROPERTIES OF FLUVASTATIN**

BACHELOR STUDY PROGRAMME COSMETOLOGY

Ljubljana, 2018

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Darka Černetu, mag. farm., spec. med. biokem.

Najlepše se zahvaljujem svojemu mentorju, prof. dr. Darku Černetu, mag. farm. za strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge, predvsem pa za njegovo dostopnost, odzivnost in čas, ki si ga je vzel.

Zahvalila bi se tudi svoji družini za vso pomoč in podporo v času študija, najbolj pa za to, da mi vedno stoji ob strani.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Darka Černetu, mag. farm., spec. med. biokem.

Tina Šilc

VSEBINA

KAZALO SLIK	II
KAZALO PREGLEDNIC	II
POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
UVOD.....	1
STATINI.....	1
PLEIOTROPNI UČINKI STATINOV	2
FLUVASTATIN (FV)	3
REAKTIVNE SPOJINE IN ANTIOKSIDANTI	4
OKSIDATIVNI STRES IN ATEROSKLEROZA	6
NAMEN DELA	7
METODE DELA	8
Določitev iskalnega profila	8
Izbor raziskav	8
Izbor podatkov	9
REZULTATI	10
Analiza raziskav glede na leto publikacije	10
Analiza raziskav glede na državo, v kateri je bila raziskava izvedena	11
Pregled raziskav	11
RAZPRAVA.....	22
Analiza raziskav glede na leto publikacije	22
Pregled raziskav	22
SKLEP	26
LITERATURA	27

KAZALO SLIK

Slika 1: Sintezna pot holesterola in izoprenoidov ter vloga statinov, ki zavirajo HMG-CoA reduktazo. Seznam kratic: PP: pirofosfat; GGPP: geranilgeranil pirofosfat; ROCK: angl. <i>rho associate protein kinase</i> ; NAD(P)H: nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, eNOS: endotelijska sintaza dušikovega oksida, t-PA: angl. <i>tissue-type plasminogen activator</i> , ET-1: endotelin 1, PAI-1: inhibitor aktivatorja plazminogena 1. Prirejeno po (11).....	2
Slika 2: Kemijske strukture fluvastatina in njegovih glavnih metabolitov.	4
Slika 3: Preglednica reaktivnih zvrsti. Prirejeno po (17).	5
Slika 4: Oksidativne poškodbe srčno-žilnega sistema zaradi oksidativnega stresa vodijo v razvoj ateroskleroze. Prirejeno po (17).....	6
Slika 5: Proces izbora raziskav.....	9
Slika 6: Število raziskav glede na leto publikacije.	10
Slika 7: Število raziskav po državah.....	11
Slika 8: Kemijske strukture FV-Me, FV-K-Me in FV-R-Me.....	12

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Rezultati raziskav vrednotenja antioksidativnih lastnosti fluvastatina.	13
---	----

POVZETEK

Ozadje: Fluvastatin je zaviralec 3-hidroksi-3-metilglutaril-koencim A (HMG-CoA) reduktaze. Ima številne ugodne učinke na žilno steno, ki so neodvisni od zniževanja holesterola LDL in jih imenujemo pleiotropni učinki. Med pleiotropne učinke sodi tudi zaviranje intracelularnega (pa tudi vaskularnega) oksidacijskega stresa.

Namen: Pregledati literaturo in izdelati sistematični pregled raziskav ter tako ugotoviti, ali literatura dokazuje, da ima fluvastatin antioksidativne lastnosti.

Metode: Z uporabo vnaprej določenega iskalnega profila smo v podatkovni bazi PubMed poiskali raziskave, objavljene do konca aprila 2018. Iskalni profil, ki smo ga določili, je bil sledeč: fluvastatin[Text Word] AND (antioxidant[Text Word] OR antioxidative[Text Word]). Vključili smo raziskave, ki so vrednotile antioksidativne lastnosti fluvastatina. S pregledom literature v relevantnih raziskavah smo pridobili dodatno raziskavo, ki smo jo vključili v sistematični pregled.

Rezultati: V sistematičnem pregledu smo obravnavali 8 raziskav, ki so ustrezale vključitvenim in izključitvenim kriterijem. Glede na objavljeno literaturo smo prišli do zaključka, da imajo fluvastatin in njegovi metaboliti antioksidativne lastnosti, ki izhajajo neposredno iz njihove strukture in niso povezane z osnovnim delovanjem fluvastatina kot zaviralca HMG-CoA reduktaze.

Ključne besede: fluvastatin, zaviralec 3-hidroksi-3-metilglutaril-koencim A (HMG-CoA) reduktaze, antioksidativne lastnosti, statini, odstranjevalec radikalov

ABSTRACT

Background: Fluvastatin is a 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG-CoA) reductase inhibitor. The inhibition of HMG-CoA reductase may produce pleiotropic effects that are independent of LDL-cholesterol lowering. Pleiotropic effects of statins include antioxidant properties among others protective effects.

Aim: To review the literature relating to the antioxidative properties of fluvastatin.

Methods: Using pre-defined search profile in the database PubMed we retrieved all studies on the subject published by the end of April 2018. The search profile used was: fluvastatin[Text Word] AND (antioxidant[Text Word] OR antioxidative[Text Word]). The inclusion criteria included all studies about antioxidative properties of fluvastatin. We manually searched relevant studies to retrieve one additional study.

Results: 8 studies fulfilled all inclusion and exclusion criteria. Majority of studies confirmed antioxidative activity of fluvastatin. On the basis of the results, it was concluded that the antioxidative activity of fluvastatin and its metabolites is independent from the inhibition of HMG-CoA reductase.

Key words: fluvastatin, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitor, antioxidative properties, statins, radical scavenger

SEZNAM OKRAJŠAV

DBDP	angl. di- <i>tert</i> -butyl diperoxyoxalate
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
FV	fluvastatin
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metilglutaril-koencim A
holesterol HDL	holesterol v lipoproteinu visoke gostote
holesterol LDL	holesterol v lipoproteinu majhne gostote
IC ₅₀	koncentracija zaviralca, ki doseže 50 % zavrtje aktivnosti encima
LDL	lipoproteini majhne gostote
PMA	angl. <i>phorbol myristate acetate</i>
PMN	polimorfonuklearni levkociti
PV	pravastatin
RNS	reaktivne dušikove spojine (angl. <i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	reaktivne kisikove spojine (angl. <i>reactive oxygen species</i>)
SV	simvastatin
TEMPO	(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il)oksil

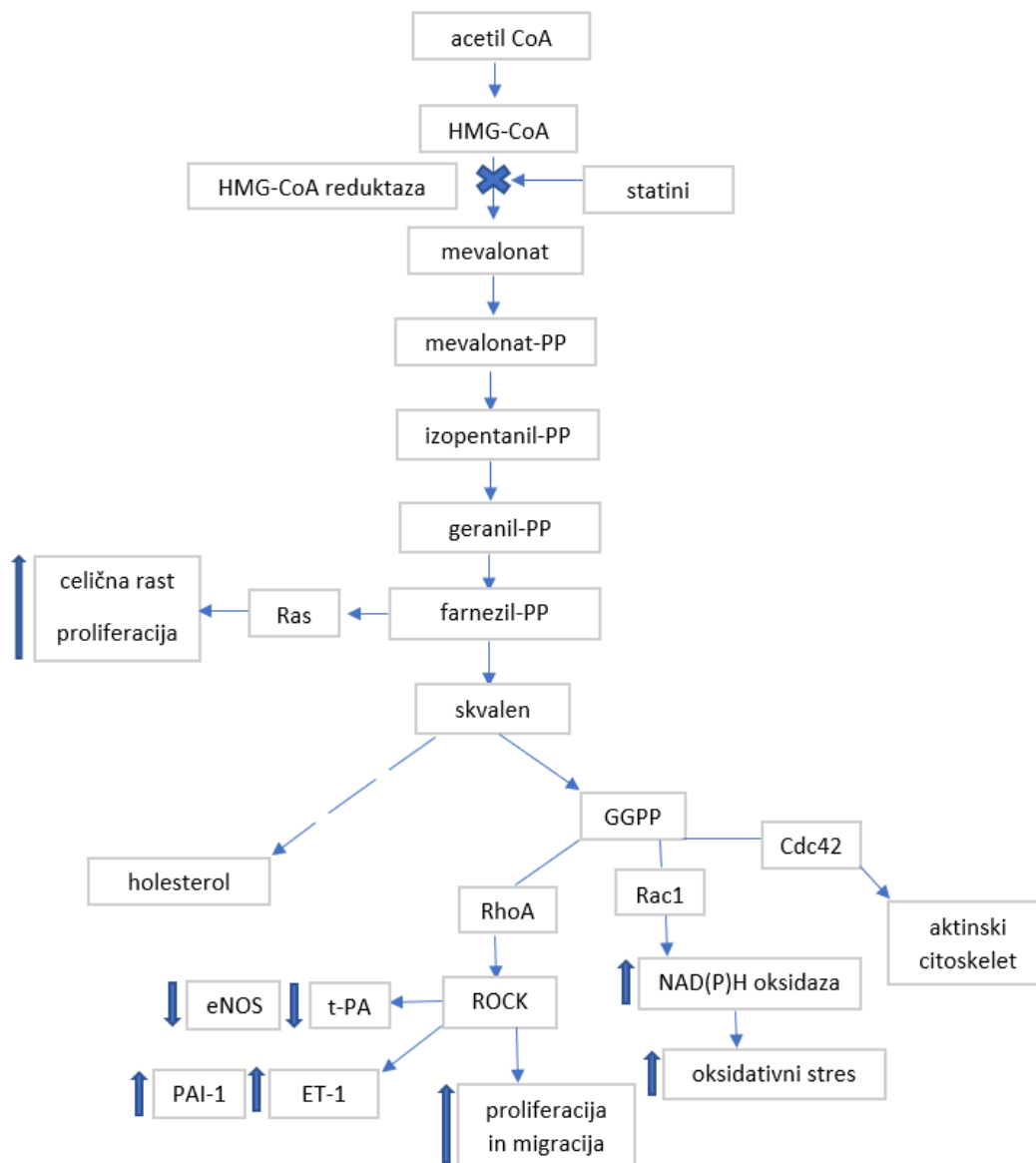
UVOD

STATINI

Zaradi srčno-žilnih bolezni vsako leto umre več kot 17,3 milijona ljudi, kar predstavlja 31 % vseh smrti in jih uvršča pod vodilni vzrok umrljivosti na svetu (1). Glede na izsledke temeljnih raziskav, holesterol v lipoproteinu majhne gostote (holesterol LDL) ni le pomemben dejavnik tveganja za razvoj ateroskleroze, temveč njen neposredni vzrok (2). Statini oziroma zaviralci 3-hidroksi-3-metilglutaril-koencim A (HMG-CoA) reduktaze, so najučinkovitejša zdravila za zniževanje serumskih vrednosti holesterola LDL in posledično predstavljajo prvo izbiro pri preprečevanju srčno-žilnih bolezni (3, 4). Statini se predpisujejo posameznikom, ki imajo visoko tveganje za razvoj srčno-žilnih bolezni (primarna preventiva) ter posameznikom po srčno-žilnem dogodku (sekundarna preventiva) (5). Večina izvedenih raziskav je statine razglasila za varna in sprejemljiva zdravila, ki imajo dobro razmerje med koristjo in tveganjem (6, 7).

Gre za kemijsko in farmakološko heterogeno skupino spojin. Prvo spojino iz te skupine zdravil je odkril Endo s sodelavci leta 1976, ko je ugotovil, da glivni metaboliti (predvsem ML-236B), izolirani iz kulture *Penicillium citrinum*, ovirajo sintezo holesterola z zaviranjem encima HMG-CoA reduktaze (8). Vsi statini imajo enak mehanizem delovanja, vendar pa se med sabo razlikujejo v obsegu zaviranja HMG-CoA, kar vodi do različnih ravni oziroma različne učinkovitosti zmanjšanja holesterola LDL (9). V Sloveniji v klinični praksi uporabljamo šest statinov: pravastatin (PV), rosuvastatin, simvastatin (SV), atorvastatin, lovastatin in fluvastatin (FV) (10).

Statini so kompetitivni zaviralci HMG-CoA reduktaze, ki je glavni encim v sintezni poti holesterola in je odgovoren za pretvorbo HMG-CoA v mevalonat. Mevalonat je prekursor ne samo za sintezo holesterola, temveč tudi za mnoge druge nesteroidne izoprenoidne intermediate, zaradi česar bi lahko zaviranje HMG-CoA reduktaze pomenilo ne samo zniževanje endogene sinteze holesterola LDL, temveč tudi dodatne, tako imenovane zaščitne pleiotropne učinke statinov, kar je prikazano na Sliki 1 (3, 4). Statini povzročijo tudi zvišanje plazemskih vrednosti holesterola v lipoproteinu visoke gostote (holesterol HDL), ki ga pogovorno imenujemo »dobri« holesterol (9).



Slika 1: Sintezna pot holesterola in izoprenoidov ter vloga statinov, ki zavirajo HMG-CoA reduktazo. Seznam kratic: PP: pirofosfat; GGPP: geraniilgeraniil pirofosfat; ROCK: angl. *rho associate protein kinase*; NAD(P)H: nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, eNOS: endotelijska sintaza dušikovega oksida, t-PA: angl. *tissue-type plasminogen activator*, ET-1: endotelin 1, PAI-1: inhibitor aktivatorja plazminogena 1. Prirejeno po (11).

PLEIOTROPNI UČINKI STATINOV

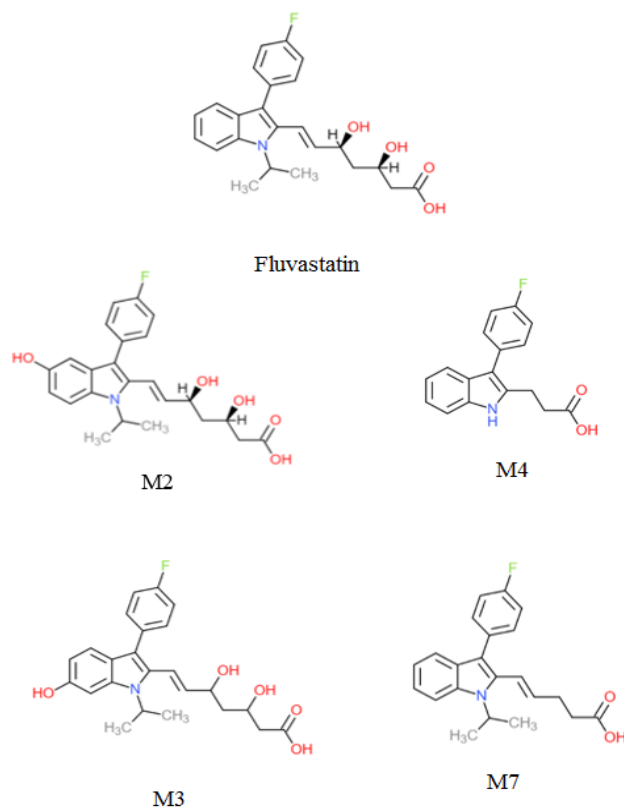
Statini imajo številne ugodne učinke na žilno steno: izboljšujejo endotelijsko funkcijo, zavirajo vnetje, oksidativni stres in proliferacijo gladkih mišičnih celic, stabilizirajo aterosklerotični plak, preprečujejo remodelacijo miokarda in zavirajo aktivacijo trombocitov. Danes vemo, da je veliko teh ugodnih učinkov neodvisnih od zniževanja

holesterola LDL in te učinke imenujemo pleiotropni učinki statinov (11). Kot pleiotropne učinke zdravil lahko definiramo vse učinke zdravila, ki so ali pa niso povezani z glavnim delovanjem zdravila. Lahko so neželeni in prepoznani kot neželeni stranski učinki, nevtralni učinki ali pa koristni učinki in povečujejo želen učinek zdravila (9). Statinska pleiotropija je rezultat s statinom povzročenih sprememb v poteh znotrajceličnega signaliziranja. Preko zaviranja Rho/ROCK signalne poti in Rac signalne poti ter spodbujanja PI3K/Akt signalne poti in PPAR γ signalne poti. Med pleiotropnimi učinki statinov je torej tudi zaviranje intracelularnega (pa tudi vaskularnega) oksidacijskega stresa (11).

FLUVASTATIN (FV)

FV spada v prvo generacijo statinov, dovoljenje za promet pa je zdravilo dobilo leta 1994. Je prvi popolnoma sintezni zaviralec HMG-CoA reduktaze (5, 12). FV je racemat dveh eritroenantiomerov (3RS, 5SR), od katerih ima 3R,5S-enantiomer 30-krat močnejši zaviralni učinek na HMG-CoA reduktazo kot drugi enantiomer (13). Absorpcija FV je hitra in skoraj popolna (98 %). Deluje in presnavlja se predvsem v jetrih. Podvržen je predsistemski presnovi, zato je njegova biološka uporabnost nizka (24 %). FV ima kratek razpolovni čas v plazmi: približno pol ure (14, 12). Prednost FV pred ostalimi statini je ta, da se ne presnavlja preko citokroma P450 3A, zato ni pričakovati interakcij z ostalimi zdravili in hrano, ki uravnavajo funkcijo citokroma P450 3A4 (5).

Na Sliki 2 so predstavljene kemijske formule FV in njegovih glavnih metabolitov (M2, M3, M4 in M7). Nespremenjen FV in M4 sta dve glavni komponenti v plazmi. Tekom presnovne poti prav tako nastaneta tudi hidroksilna derivata FV (M2 in M3) in deoksi derivat FV (M7) (15).



Slika 2: Kemijske strukture fluvastatina in njegovih glavnih metabolitov.

REAKTIVNE SPOJINE IN ANTIOKSIDANTI

V telesu poleg nadzorovanih biokemičnih reakcij spontano potekajo tudi nenadzorovane kemične reakcije. Gre za reakcije, kjer so udeležene reaktivne zvrsti, ki povzročajo oksidacije sestavin membrane celic (lipidov), proteinov in nukleinskih kislin (DNA in RNA), kar vodi do številnih patoloških stanj. Značilno zanje je, da potekajo zelo hitro in brez encimske pomoči, produkt pa nastane le tam, ko se pojavi in kjer se pojavi primarni radikal. Kljub temu da radikale in z njimi povezane reaktivne kisikove spojine (ROS) ter reaktivne dušikove spojine (RNS) obravnavamo kot negativen dejavnik v razvoju ateroskleroze in drugih srčno-žilnih bolezni, pa je treba poudariti tudi, da imajo reaktivne zvrsti poleg svoje tipično negativne vloge v telesu pri normalnih razmerah tudi pozitivno vlogo, na primer: sodelujejo pri obrambi pred patogenimi organizmi in pri redoks signaliziranju (16, 17). Predstavniki ROS in RNS so predstavljeni na Sliki 3.

	Reaktivne kisikove zvrsti (ROS)		Reaktivne dušikove zvrsti (RNS)	
radikali	superoksidni	$O_2^{\bullet-}$	dušikov oksid	NO^{\bullet}
	hidroksilni	HO^{\bullet}	dušikov dioksid	NO_2^{\bullet}
	hidroperoksidni	HOO^{\bullet}		
	peroksidni	ROO^{\bullet}		
	alkoksidni	RO^{\bullet}		
neradikali	singletni kisik (1O_2)	$O=O$	dušikovi oksidi	N_2O_3, N_2O_4
	ozon	O_3	dušikova(III) kislina	HNO_2
	vodikov peroksid	H_2O_2	nitrozilni kation	NO^+
	hidroperoksidi	$ROOH$	nitronijev anion	NO_2^-
	hipoklorna kislina	$HOCl$	alkilperoksinitrit	$ROONO$
	peroksinitrit	$ONOO^-$	peroksinitrit	$ONOO^-$

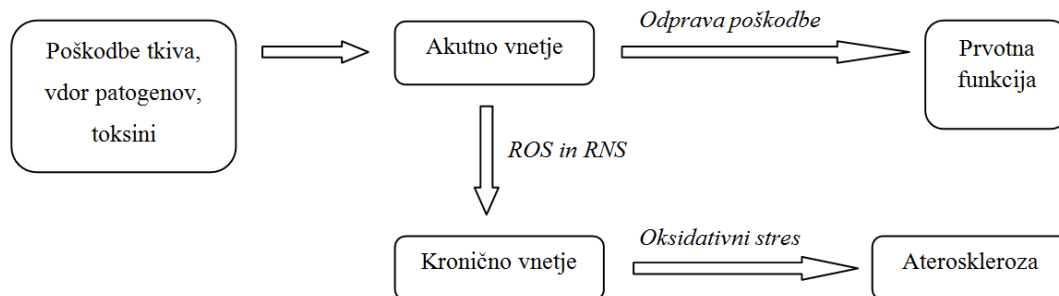
Slika 3: Preglednica reaktivnih zvrsti. Prirejeno po (17).

Po definiciji je radikal vsaka spojina, ki ima na zunanji orbitali elektron, ki ni v paru. Zaradi obstoja nesparjenega elektrona so radikali paramagnetne snovi, ki težijo k stanju, kjer so vsi elektroni v parih, zato običajno zelo hitro reagirajo s snovmi v svoji okolici. V telesu stalno nastajajo v izredno nizkih koncentracijah, vendar pa zaradi seštevanja in pomnoževanja njihovih učinkov s starostjo privedejo do številnih makroskopskih posledic. Vzroke za nastanek radikalov v telesu delimo na zunanje (na primer elektromagnetna sevanja s primerno energijo, vidna svetloba in kajenje) ter notranje (na primer uhajanje elektronov iz dihalne verige v mitohondrijih, encimske reakcije, radikalske reakcije v procesih vnetja oziroma v primerih aktivacije imunskega sistema) (17).

Reaktivne zvrsti so torej vmesni produkti, ki nastajajo med normalnim presnovnim procesom v telesu. Ker ima povečan nastanek reaktivnih zvrsti in njihova nekontrolirana regulacija škodljive posledice, so v telesu prisotni *antioksidanti*, ki reaktivne zvrsti nevtralizirajo (16). Antioksidanti so spojine, ki v celičnih pogojih upočasnijo, preprečujejo oziroma ovirajo oksidacijo ali odstranijo možnost oksidativne poškodbe tarčne molekule tako, da na različne načine vstopajo v radikalske reakcije, ali v redoks reakcije kot reducenti. V prvi vrsti so reducenti, to pomeni, da v reakcijah z radikali ali oksidanti nudijo vodikov atom ali elektron, pri čemer nastane bolj stabilen radikal, ki je manj reaktiven (17). Neravnovesje med antioksidanti in reaktivnimi zvrstmi privede do oksidativnega stresa, ki je prepoznan kot eden izmed pomembnih vzrokov pri mnogih boleznih, med drugim tudi pri Alzheimerjevi bolezni, srčno-žilnih boleznih in raku (16).

OKSIDATIVNI STRES IN ATEROSKLEROZA

Za srčno-žilne bolezni in aterosklerozo je značilen kronični vnetni proces, ki prizadene stene arterij in je nerazdružljivo povezan z oksidativnim stresom, kar prikazuje Slika 4. Za nastanek ateroskleroze sta poleg ostalih reaktivnih zvrsti verjetno ključna dva radikala, in sicer NO ter $\text{O}_2^{\bullet-}$, ki sta med sabo povezana preko ONOO^- , ki je eden najmočnejših oksidantov. Za razliko od $\text{O}_2^{\bullet-}$, NO pripisujemo predvsem dobro vlogo, saj z zaviranjem aktivacije levkocitov in agregacije trombocitov ter z vazodilatacijo omejuje vnetje na začetku vnetnega procesa. Vendar pa kasneje NO (ki ga tvori inducibilna sintaza NO) prispeva k prehodu od akutnega v kronično vnetje in k vzdrževanju vnetne reakcije. Najmočnejši vir $\text{O}_2^{\bullet-}$ v endoteliju arterije je NADPH oksidaza, ki se nahaja tudi v nevtrofilcih, monocitih in makrofagih. $\text{O}_2^{\bullet-}$ sicer nastaja tudi pri delovanju drugih encimov, kot je ksantin oksidaza in pri nenadzorovanih enoelektronskih oksidacijah. Dejavniki, ki aktivirajo NADPH oksidazo (npr. angiotenzin II), dvignejo raven ROS in posledično povzročijo tudi povečano nastajanje ONOO^- . Zaradi opisanega je smiselno vprašanje o uporabi antioksidantov, ki bi lahko imeli učinek, v kolikor bi bili prisotni v začetnem obdobju, ko zaradi večjih količin $\text{O}_2^{\bullet-}$ nastane toliko ONOO^- , da ga razpoložljivi antioksidanti ne zmorejo onesposobiti in se začne oksidacija LDL (17).



Slika 4: Oksidativne poškodbe srčno-žilnega sistema zaradi oksidativnega stresa vodijo v razvoj ateroskleroze. Prirejeno po (17).

NAMEN DELA

Fluvastatin spada v skupino statinov. Gre za zdravila, ki se uporabljajo za zniževanje serumskega holesterola LDL. Delujejo tako, da kompetitivno zavirajo HMG-CoA reduktazo, ki je glavni encim v sintezni poti holesterola in je odgovoren za pretvorbo HMG-CoA v mevalonat. Poleg primarnega delovanja imajo statini številne zaščitne pleiotropne učinke na žilno steno, ki so neodvisni od zniževanja holesterola LDL. Med pleiotropne učinke FV spada tudi antioksidativno delovanje: zaviranje intracelularnega (pa tudi vaskularnega) oksidacijskega stresa.

Namen diplomske naloge bo pregledati literaturo in izdelati sistematični pregled raziskav ter tako ugotoviti, ali literatura dokazuje, da ima FV antioksidativne lastnosti.

Ocenili bomo tudi, kako se z leti spreminja število raziskav na tem področju ter v katerih državah so bile raziskave najpogosteje izvedene.

METODE DELA

Sistematični pregled raziskav temelji na pregledu izvirnih znanstvenih prispevkov, ki so bili objavljeni v elektronski zbirki podatkov PubMed. Obdobje pregleda literature je potekalo od marca 2018 do konca aprila 2018. Določili smo iskalni profil in raziskave izbrali glede na vnaprej določene vključitvene in izključitvene kriterije.

Določitev iskalnega profila

Za iskanje raziskav smo najprej določili iskalni profil, ki smo ga zastavili tako, da smo zajeli vse raziskave, ki obravnavajo antioksidativne lastnosti fluvastatina.

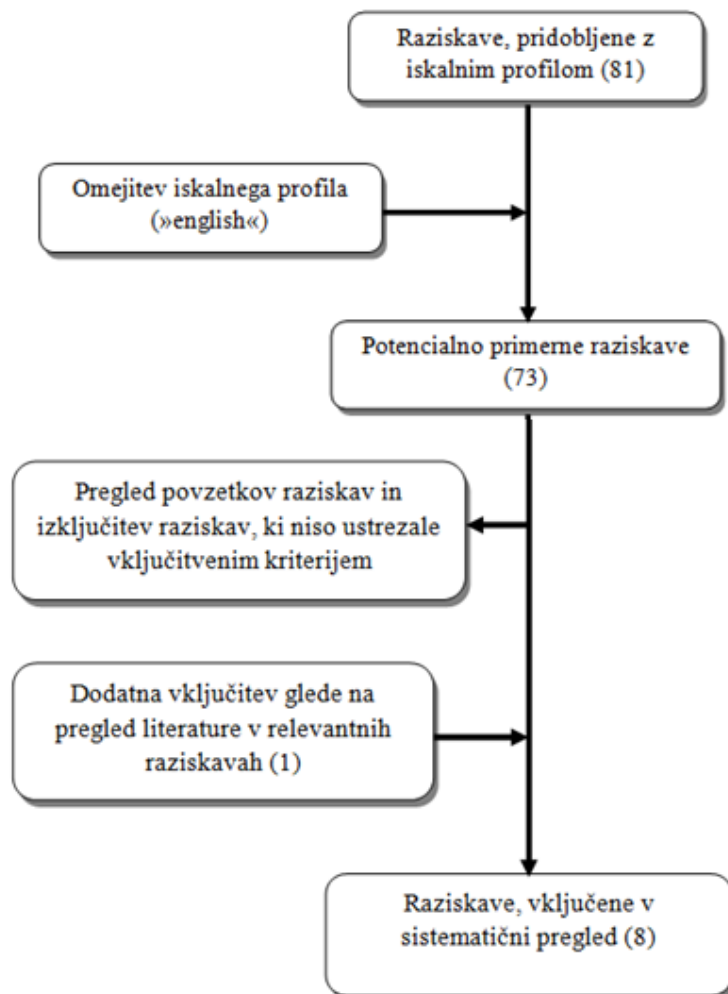
Iskalni profil, ki smo ga določili, je bil sledeč: fluvastatin[Text Word] AND (antioxidant[Text Word] OR antioxidative[Text Word])

Rezultate smo želeli interpretirati iz raziskav v angleškem jeziku, zato smo uporabili sito »english«.

Izbor raziskav

V elektronski bazi podatkov smo našli 81 zapisov. Raziskave smo pregledali glede na naslov in povzetke ter v sistematični pregled vključili tiste, ki so ustrezale vključitvenim kriterijem in so bile objavljene do konca aprila 2018. Dodatno eno raziskavo smo pridobili s pregledom literature v relevantnih raziskavah. Iz sistematičnega pregleda smo izključili raziskave, ki niso ustrezale vključitvenim kriterijem ter raziskave, ki niso bile v angleškem jeziku. Proces izbora raziskav je potekal po stopnjah, ki so prikazane na Sliki 5.

Vključitveni kriteriji: v sistematični pregled raziskav smo vključili raziskave, kjer so proučevali antioksidativne lastnosti FV. Vključili smo tudi raziskave, ki so proučevale mehanizem delovanja FV predvsem pri neposrednih reakcijah FV z reaktivnimi zvrstmi. Odločili smo se, da raziskave omejimo na tiste, kjer so proučevali delovanje FV kot odstranjevalca radikalov in sposobnost FV, da zavre nastanek reaktivnih zvrsti.



Slika 5: Proces izbora raziskav.

Izbor podatkov

Najprej smo za vsako raziskavo, ki je ustrezala vključitvenim kriterijem, izpisali *leto publikacije* in *državo*, v kateri je bila posamezna raziskava izvedena. Nato smo v članku poiskali sledeče informacije: *prvi avtor*, *namen*, *model*, s katerim so proučevali antioksidativne lastnosti FV, *komentar* in *zaključek*. Pri vsaki raziskavi smo zaradi večje preglednosti zapisali tudi, katere so bile proučevane *reaktivne zvrsti*, *proučevani odmerki* in označili tiste odmerke, pri katerih so dobili statistično značilen rezultat. Prav tako smo zapisali *primerjavo*, v kolikor so delovanje FV primerjali s katero drugo spojino.

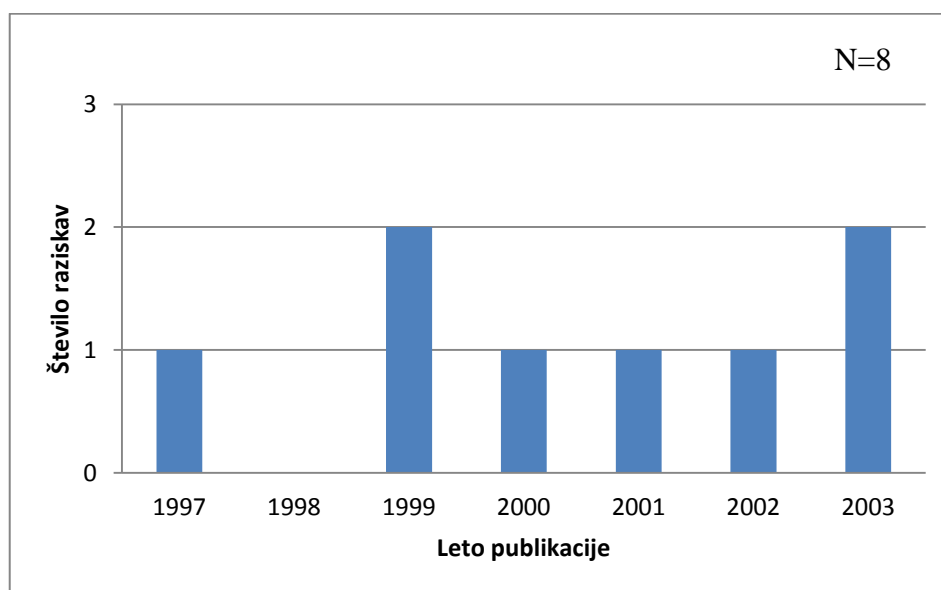
REZULTATI

Z uporabljenim iskalnim profilom smo v podatkovni bazi PubMed dobili 81 člankov, ki so bili objavljeni do konca aprila 2018. Z uporabo sita »english« smo izločili 8 raziskav, ki niso bile v angleškem jeziku. Preostalih 73 zadetkov smo obravnavali kot potencialno primerne raziskave. Po pregledu in selekciji raziskav glede na vključitvene in izključitvene kriterije smo ohranili 7 raziskav. Eno raziskavo smo vključili dodatno glede na pregled literature v relevantnih raziskavah.

Raziskave smo najprej analizirali glede na leto publikacije in državo, v kateri je bila raziskava izvedena. Nato smo v nadaljevanju predstavili rezultate raziskav, ki smo jih dobili po pregledu celotnih člankov. Zaradi večje preglednosti smo le-te predstavili v preglednici. Raziskavo (18), kjer so natančneje proučevali mehanizem antioksidativnega delovanja FV, smo predstavili posebej.

Analiza raziskav glede na leto publikacije

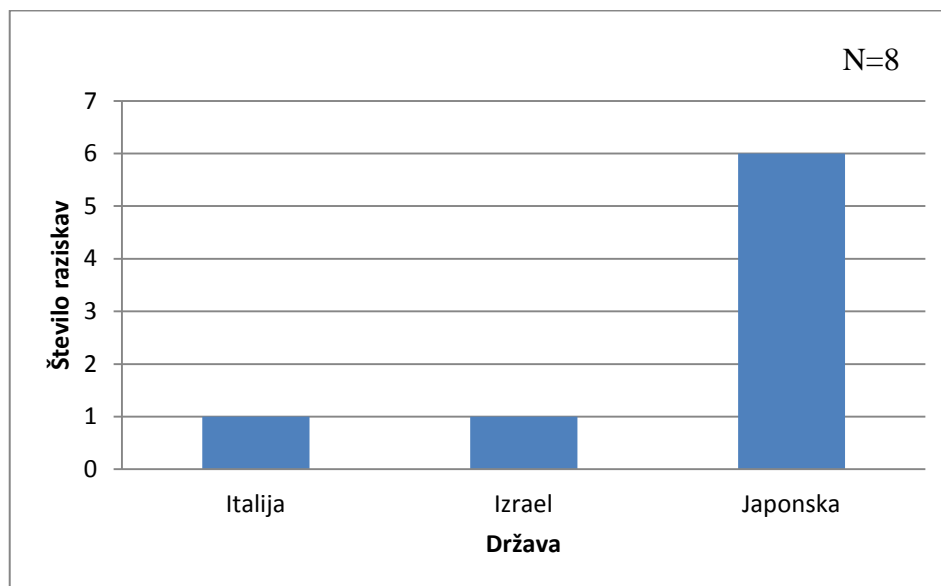
Slika 6 prikazuje analizo raziskav glede na leto publikacije. Vključene raziskave so bile objavljene v obdobju od leta 1997 do leta 2003. Vidimo, da je največje število in zgoščenost publikacij na prelomu iz 20. v 21. stoletje. Leta 1999 in leta 2003 sta bili objavljeni po dve vključeni raziskavi. Preostala leta (razen 1998) je bila objavljena po ena raziskava.



Slika 6: Število raziskav glede na leto publikacije.

Analiza raziskav glede na državo, v kateri je bila raziskava izvedena

Slika 7 prikazuje analizo raziskav glede na državo, v kateri je bila raziskava izvedena. Največ vključenih raziskav, in sicer 6, je bilo izvedenih na Japonskem, po ena raziskava pa v Italiji in Izraelu.



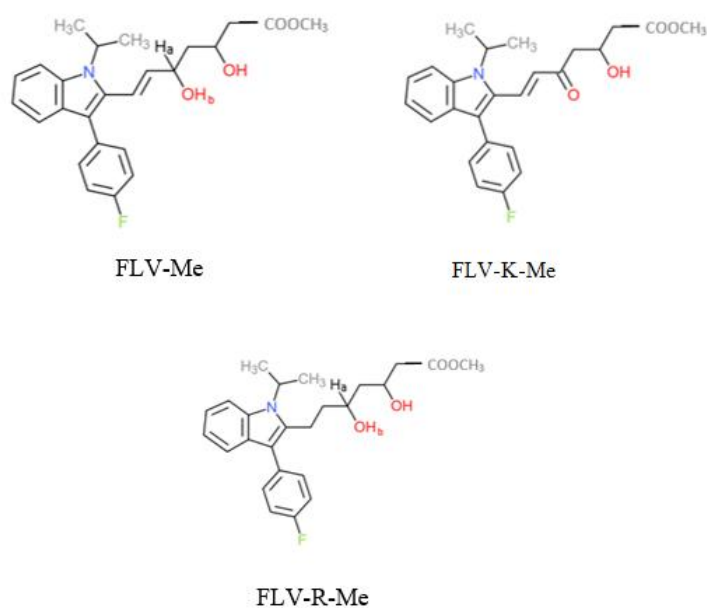
Slika 7: Število raziskav po državah.

Pregled raziskav

Raziskava Nakamure in sod. (18) je najboljše zajemala področje naše teme in je posledično širše opisana.

Namen raziskave je bilo pojasniti mehanizem antioksidativnega delovanja FV, predvsem določiti aktivno mesto. Izvedli so odvzem vodikovega atoma iz metilnega estra FV (FV-Me) z uporabo *terc*-butoksilnih radikalov, katerih nastanek je povzročila termoliza DBDP (angl. di-*tert*-butyl diperoxyoxalate). Za uporabo FV-Me in ne FV so se odločili, ker je FV dobro topen v benzenu, *terc*-butoksilni radikali pa lahko učinkovito nastajajo s termolizo DBDP v ogljikovodikih, kot je (uporabljeni) benzen. Da ima FV-Me aktiven vodik, so potrdili z uporabo elektronske spinske resonance (ESR) in dodatkom PBN (angl. *phenyl-N-tert-butyl nitron*), kjer so hkrati potrdili tudi, da ima FV-Me visoko sposobnost odstranjevanja radikalov. Nadalje so proučevali aktivno mesto FV-Me. Prej opisano reakcijo FV-Me z DBDP v benzenu so izvedli v prisotnosti TEMPO ((2,2,6,6-

tetrametilpiperidin-1-il)oksil). TEMPO je zelo stabilen nitroksidni radikal, ki lahko reagira s širokim naborom vmesnih radikalov (intermediatov). S pomočjo kolonske kromatografije so izolirali nastali produkt: FLV-K-Me. Da bi določili, ali ima konjugirana dvojna vez ob indolnem obroču pomembno vlogo pri antioksidativni aktivnosti FV-Me, so izvedli primerjalno reakcijo med FV-Me in FV-R-Me s *tert*-butoksilnim radikalom (natančneje termolizo DBDP in dodatkom TEMPO). Na podlagi rezultatov so zaključili, da konjugirana dvojna vez ob indolnem obroču igra pomembno vlogo v antioksidativni aktivnosti FV-Me. Del molekule: $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}=\text{CH}$ -indolni obroč, je skupen tako FV-Me kot FV, zato je najverjetneje mehanizem antioksidativnega delovanja FV enak kot mehanizem antioksidativnega delovanja FV-Me. Na podlagi rezultatov so zaključili, da je aktivno mesto za antioksidativno delovanje FV alilni ogljik konjugiran z indolnim obročem. Kemijska struktura FV-Me in nastalih produktov je prikazana na Sliki 8.



Slika 8: Kemijske strukture FV-Me, FV-K-Me in FV-R-Me.

Preglednica I: Rezultati raziskav vrednotenja antioksidativnih lastnosti fluvastatina.

Prvi avtor, leto publikacije in država	Namen	Proučevane reaktivne zvrsti	Model, s katerim so proučevali antioksidativne lastnosti	Proučevani odmerki in odmerek, ki je povzročil statistično značilen rezultat	Primerjava	Komentar
						Zaključek
Hussein O, 1997, Izrael (19)	Proučevanje sposobnosti FV kot odstranjevalca radikalov.	DPPH•	DPPH test ($\lambda = 517$ nm): inkubacija FV z DPPH (1 mM) v etanolni raztopini 5 min pri 37 °C.	FV: 1-10 $\mu\text{g/ml}$	Vitamin E (50 μM), ki je pri enakih pogojih povzročil 90 % zmanjšanje optične gostote.	Pri uporabi FV s koncentracijo 100 $\mu\text{g/ml}$ je bil zaznan padec absorbance za 35 %. Gre za uporabo visoke, nefarmakološke koncentracije.
	Analizirati, ali je zaviralni učinek FV na oksidacijo LDL povezan s sposobnostjo FV, da kelira kovinske ione.	Bakrovi ioni	Inkubacija LDL (100 μg proteinov/ml) z naraščajočo koncentracijo CuSO_4 (1-40 μM) v prisotnosti FV in odsotnosti FV (kontrola) 4 h pri 37 °C. Nato meritev oksidacije LDL s TBARS (angl. <i>thiobarbituric acid reactive substances</i>) metodo.	FV: 1 $\mu\text{g/ml}$	-	Pri dodatku 1 μM CuSO_4 je FV znižal oksidacijo LDL za 50 %. Oksidacija je ostala zavrtta tudi z naraščanjem koncentracije CuSO_4 do 40 μM .
						FV ni deloval kot odstranjevalec DPPH•.
						FV ni deloval kot kelator bakrovih ionov.

<p><i>In vivo</i>: Proučevali so tudi učinek FV (40 mg/dan, 24 tednov) na dovzetnost plazemskega LDL za oksidacijo pri 10 bolnikih s hiperholesterolemijo. Rezultati: znižanje celokupnega holesterola za 30 %, holesterola LDL za 34 %, in trigliceridov za 22 %. Učinek v znižanju celokupnega holesterola in holesterola LDL je bil dosežen že po štirih tednih zdravljenja.</p> <p><i>Ex vivo</i>: Nadalje so plazmo bolnikov inkubirali z AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidrokloridom) (4 h, 37 °C), ki je povzročil nastanek radikalov in posledično lipidno peroksidacijo, ki je bila znižana za 70 % po 12 tednih zdravljenja s FV in za 77 % po 14 tednih zdravljenja s FV. LDL (100 µg proteinov/ml) so inkubirali v prisotnosti CuSO₄ (10 µM) pri 37 °C. Ugotovili so, da zdravljenje s FV podaljša čas, ki je potreben za oksidacijo LDL za 1,2-krat po 12 tednih zdravljenja in 2,5-krat po 14 tednih zdravljenja s FV. Ugotovili so tudi, da se FV specifično veže predvsem na fosfolipide na površini LDL, kar spremeni naboj lipoproteinov.</p>						
Suzumura K, 1999, Japonska (20)	Sposobnost FV in njegovih metabolitov (M2, M3, M4, M7) kot odstranjevalcev O ₂ ^{•-} .	O ₂ ^{•-}	<p>NADH/PMS/NBT sistem: reakcijski zmesi NADH (160 µM), NBT (40 µM) in PMS (8 µM) v PBS (pH = 7,4) so dodane testirane spojine, pripravljene v dimetilsulfoksidu (DMSO). Kontrolni vzorec ni vseboval testnih spojin. Indikatorska reakcija je redukcija NBT, ki se zazna v spremembi absorbance ($\lambda = 560$ nm) v 2 min.</p>	<p>FV: 0,3; <u>1</u>; <u>3</u>; <u>10</u> (µM)</p> <p>Odmerek za metabolite ni podan (glej: komentar).</p>	<p>Vodotopen derivat α-tokoferola (trolox): njegova sposobnost odstranjevanja O₂^{•-} je podobna sposobnosti FV.</p>	<p>Vsi testirani metaboliti so pokazali sposobnost odstranjevanja O₂^{•-}. Samo učinek M4 je nekoliko šibkejši od učinka FV. M2 in M3 sta pokazala trikrat močnejšo aktivnost kot FV.</p>
			<p>PMN/CLA sistem: PMN (polimorfonuklearne levkocite) so izolirali iz periferne krvi zdravih prostovoljcev in jih do uporabe hranili v HBSS pri 0 °C. Reakcijske zmesi so vsebovale 10⁶ PMN/ml, 1 µM CLA, 100 µM DTPA v</p>	<p>FV: 1, <u>3</u>, <u>10</u> µM M2: <u>10</u> µM M3: <u>10</u> µM</p>	-	<p>FV in vsi proučevani metaboliti izkazujejo sposobnost odstranjevanja O₂^{•-}. Aktivnost FV je primerljiva z referenčnim antioksidantom.</p> <p>Kot razlog za primerljivo učinkovitost FV z M2 in M3 navajajo možnost, da FV neposredno zavre delovanje encimov, kot je protein kinaza C, ki ima osrednjo vlogo pri nastanku O₂^{•-} s PMN.</p>

			končnem volumnu 2 ml HBSS. Reakcijske zmesi so predhodno inkubirali (37 °C, 5 min) v prisotnosti in odsotnosti testiranih spojin. Nastajanje O ₂ ⁻ je sprožil dodatek 10 nM PMA. Količino O ₂ ⁻ , ki jih testirane spojine niso odstranile, so določili z največjo intenziteto svetlobe (v primerjavi s kontrolo).			FV je pokazal statistično značilen učinek, ki je odvisen od odmerka. Učinek FV je primerljiv z učinkom M2 in M3.
Suzumura K, 1999, Japonska (21)	Sposobnost FV in njegovih metabolitov (M2, M3, M4, M7) kot odstranjevalcev HO [•] .	HO [•]	Metiloranž-cinkov oksid sistem: raztopina metiloranža in suspenzija cinkovega oksida zmešani v natrijevem boratnem pufri (5 mM, pH: 9,2) do končne koncentracije 40 μM raztopine. Vsaka testirana spojina je bila pripravljena v DMF in dodana zgoraj opisani raztopini. Pomešane raztopine so bile postavljene 20 cm od 100 W izvora svetlobe za 2 h. Slepo kontrolo so pripravili po enakem postopku in shranili v temi za 2 h. Vse alikvotne so centrifugirali (1500 × g, 5 min), da so odstranili suspendiran cinkov oksid. Merili so padec absorbance (metiloranža) pri 456 nm v primerjavi s kontrolo, ki predstavlja količino HO [•] , ki jih testirane spojine niso odstranile.	FV: 3, 10, 30 μM. Odmerek za metabolite ni podan (glej: rezultati).	PV in SV: pri najvišji koncentraciji. (30 μM) nista imela učinka na količino HO [•] . DMTU, α-tokoferol: njuna sposobnost odstranitve HO [•] je primerljiva s sposobnostjo FV.	Raziskovalci so predlagali, da je fluorofenilni indolni del FV pomemben za njegovo antioksidativno aktivnost ter da fenolna hidroksilna skupina poveča jakost antioksidativnega delovanja. FV je pokazal statistično značilen učinek, odvisen od odmerka. Vsi testirani metaboliti (razen M7) so pokazali močno sposobnost odstranjevanja HO [•] . M2 in M3 sta pokazala trikrat močnejši učinek kot FV. Učinek FV je primerljiv z referenčnimi antioksidanti.

Nakashima A, 2001, Japonska (22)	Proučevali so zaviralni učinek FV ((+)-FV, (-)-FV) in njegovih metabolitov (M2, M3, M4, M5, M7) na nastanek $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$, OCL^- , LOO^\cdot .	$^1\text{O}_2$	Vsaka testirana spojina je bila raztopljena v DMSO ali dimetilformamidu (DMF) (končna koncentracija vsake spojine je bila: 5, 10 in 20 μM). To raztopino so nato z ustreznim pufrom inkubirali 10 min pri 37 °C. Za testiranje različnih ROS so pripravili in uporabili različne pufre. Nato so izvedli kemiluminiscenčne meritve (pri 25 °C, 1 min).	<u>IC₅₀</u> (μM): (+)-FV, (-)-FV: med 10 in 20 M2, M3, M4: okrog 5 M5: okrog 10	PV, SV, probukol in α -tokoferol: nič ali malo zaviralnega učinka na nastanek $^1\text{O}_2$.	Zaviralni učinek M2 je statistično značilno različen v primerjavi s (+)-FV, (-)-FV (pri 5, 10 in 20 μM). Zaviralni učinek (+)-FV je primerljiv z zaviralnim učinkom (-)-FV. M2 je imel najmočnejšo sposobnost odstranjevanja $^1\text{O}_2$. Učinek M2 je primerljiv z učinkom M3 in M4. Opažen je tudi zaviralni učinek (+)-FV, (-)-FV in M5. Ostale testirane spojine so imele nič ali malo zaviralnega učinka na nastanek $^1\text{O}_2$.
		$\text{O}_2^{\cdot-}$		<u>IC₅₀</u> (μM): M2, M3: pod 5	PV, SV, probukol in α -tokoferol: malo ali nič zaviralnega učinka na nastanek $\text{O}_2^{\cdot-}$.	Zaviralni učinek M3 je statistično značilno različen v primerjavi s (+)-FV (pri 5, 10 in 20 μM). M3 je imel največjo sposobnost odstranjevanja $\text{O}_2^{\cdot-}$. Učinek M3 je primerljiv z učinkom M2. Ostale testirane spojine so imele nič ali malo zaviralnega učinka na nastanek $\text{O}_2^{\cdot-}$.
		HO^\cdot		<u>IC₅₀</u> (μM): M2: okrog 10 M3: pod 5 M4: okrog 20	α -tokoferol: učinek je primerljiv z M4 (<u>IC₅₀</u> : okrog 20 μM)	Zaviralni učinek M2 in M3 je statistično značilno različen v primerjavi s (+)-FV (pri 5, 10 in 20 μM).

					PV, SV, probukol: malo ali nič zaviralnega učinka na nastanek HO [•] .	M3 je imel največjo sposobnost odstranjevanja HO [•] . M2 je imel drugo največjo sposobnost odstranjevanja HO [•] . Zaviralni učinek M4 je primerljiv z zaviralnim učinkom α -tokoferola. Ostale spojine so imele nič ali malo zaviralnega učinka na nastanek HO [•] .
		OCL ⁻		<u>IC₅₀</u> (μ M): M2, M3: pod 5	PV, SV, probukol in α -tokoferol: malo ali nič zaviralnega učinka na nastanek OCL ⁻ .	Zaviralni učinek M3 je statistično značilno različen v primerjavi s (+)-FV (pri 5, 10 in 20 μ M).
		LOO [•]		-	α -tokoferol: najvišja sposobnost lovljenja LOO [•] (<u>IC₅₀</u> : 10-20 μ M)	Zaviralni učinek α -tokoferola je statistično značilno različen v primerjavi s (+)-FV (pri 10 in 20 μ M).

					PV, SV, probukol: malo ali nič zaviralnega učinka na nastanek LOO [•] .	Vse testirane spojine (razen α - tokoferola) so imele malo ali nič zaviralnega učinka na nastanek LOO [•] .
Kugi M, 2002, Japonska (23)	Proučevali so učinek FV na nastanek O ₂ ^{•-} , ki jih je aktiviral angiotenzin II <i>in vitro</i> .	O ₂ ^{•-}	<p>Priprava celične kulture: Humane endotelijske celice aorte (hASMC), zbrane iz aorte 19-letnega kavkazijca. Celice so gojili v SG-2 mediju ter jih tripsinizirali in ponovno nasadili enkrat na teden. Med 7. in 8. pasažo so jih nasadili v 75 cm² gojitveno posodo in, ko so dosegle konfluentnost, uporabili za eksperimente. Pogoji hranjenja: 5 % CO₂, 37 °C.</p>	<p>FV: <u>50 nM</u> (zavre nastanek O₂^{•-} za 30 %) <u>100 nM</u> (zavre nastanek O₂^{•-}. Za 52 %) <u>1 μM</u> (popolnoma zavre nastanek O₂^{•-})</p>	<p>SV: 50 – 100 nM (ne zavre nastanka O₂^{•-})</p> <p>Vodotopen derivat α- tokoferola (trolox) 100 nM: učinek 100 nM FV je primerljiv z učinkom troloxa.</p>	Prednost: nizki odmerki (klinične koncentracije).
			<p>Meritev O₂^{•-} v intaktnih celicah: celice, gojene v gojišču z 10 % FBS in 100 nM angiotenzina II, so inkubirali 24 h. FV, SV (so predhodno aktivirali) in trolox so dodali celicam za 2h. Celicam so dodali lucigenin in nastanek O₂^{•-} izmerili s pomočjo fotonske emisije (15 min, vsakih 12 s). Kontrola: celice, gojene v gojišču z dodatkom 10% FBS (inkubacija 24 h).</p>			FV je v odvisnosti od odmerka znižal nastanek O ₂ ^{•-} , ki jih je aktiviral angiotenzin II. Učinek FV je primerljiv z učinkom troloxa, ki je pri podobnih koncentracijah pokazal v odvisnosti od odmerka zaviralno delovanje na nastanek O ₂ ^{•-} . SV pri podobnih odmerkih ni pokazal zaviralnega delovanja na nastanek O ₂ ^{•-} .

<p>Franzoni F, 2003, Italija (24)</p>	<p>Ovrednotiti sposobnost lovljenja HO[•] in LOO[•] štirih statinov (atorvastatin, SV, PV in FV) napram sečni kislini in troloxu.</p>	<p>HO[•] in ROO[•]</p>	<p>Izvedli so TOSC test, ki temelji na reakciji med umetno proizvedenimi radikali (HO[•] in ROO[•]) s KMBA (angl. <i>α-keto-γ-methiolbutyric acid</i>), ki se popolnoma oksidira do etilena. V prisotnosti antioksidanta pride do zmanjšanja nastanka radikalov in posledično nižjega nastanka etilena, kar je posledica tekmovanja med antioksidantom in KMBA. Zatem so izvedli meritev nastanka etilena s plinsko kromatografijo.</p>	<p>5 - 40 μg: statistično značilna antioksidativna učinkovitost vseh testiranih statinov napram HO[•] in ROO[•].</p>	<p>Vsi testirani statini (5 - 40 μg) imajo sposobnost odstranjevanja tako HO[•] kot tudi LOO[•]. Trolox: statistično značilna sposobnost odstranjevanja ROO[•]. Sečna kislina: nižja sposobnost odstranjevanja HO[•] kot atorvastatin in SV.</p>	<p>Učinkovitost SV napram HO[•] je najvišja in je 270 % višja kot učinkovitost sečne kisline.</p> <hr/> <p>FV ima med testiranimi statini najvišjo sposobnost odstranjevanja ROO[•], ki pa je 50 % nižja od sposobnosti referenčnega antioksidanta (trolox). FV ima najnižjo sposobnost odstranjevanja HO[•] med testiranimi statini.</p>
---------------------------------------	---	--	---	--	--	--

Bandoh T, 2003, Japonska (25)	Ovrednotiti direkten učinek FV na oksidazno aktivnost NADPH v nevtrofilcih.	Od PMA odvisen nastanek ROS	Nevtrofilci iz Wistar podgan (m, starost: 6 tednov). Inkubirali (37 °C) so jih v KRP v prisotnosti FV ali PV. Po 5 min inkubacije so dodali PMA in 20 - 30 min merili kemiluminiscenčno intenziteto. Po 30 min inkubacije so z barvilom tripansko modro preverili viabilnost celic. Reakcijski zmesi so dodali mevalonat (100 µM), raztopljen v etanolu. Tako mevalonat kot etanol nista vplivala na nastanek ROS.	FV: Brez mevalonata: <u>1 - 10 µM</u> Z mevalonom: 10 µM	PV (1-10 µM): ni statistično značilnega zmanjšanja nastanka ROS.	Učinek FV na zmanjšanje nastanka ROS je izničen z dodatkom mevalonata.
						FV je v odvisnosti od odmerka znižal od PMA-odvisen nastanek ROS.
	Določiti neposredni učinek FV na odstranjevanje ROS.	HO [•]	ESR (elektronska spinska resonanca). Reakcijska zmes je vsebovala: H ₂ O ₂ , FeSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ × 6H ₂ O, DMPO in FV ali PV.	FV: 1 – <u>10 µM</u>	PV (1 - 10 µM): ni statistično značilnega učinka odstranjevanja HO [•] .	Ni dodatka mevalonata.
						FV je statistično značilno znižal količino HO [•] .
		O ₂ ^{•-}	O ₂ ^{•-} proizvedeni s ksantin-ksantin oksidaznim sistemom. Neposredno sposobnost FV, da lovi radikale, so izmerili s citokrom C metodo.	<u>FV: 10 µM</u>	PV (10 µM): ni statistično značilnega učinka na količino O ₂ ^{•-} . Superoksid	Ni dodatka mevalonata.

					dismutaza (SOD), ki je učinkovito znižala naraščajočo absorbanco.	FV je statistično značilno znižal količino O ₂ ^{•-} .
Določiti učinek FV na porabo kisika v nevtrofilcih.	-	Meritev s kisikovo elektrodo. Testiranja so izvedli pri 37 °C s 4 × 10 ⁶ celicami/ml. Reakcijo je sprožil dodatek 10 nM PMA v 2 ml plinsko celico.	FV: Brez mevalonata: 1 - 10 μM Z mevalonom (100 μM): 10 μM	PV (1 - 10 μM): ni statistično značilnega zmanjšanja porabe kisika.	Učinek FV je izničen z dodatkom mevalonata.	
					FV je statistično značilno znižal porabo kisika v nevtrofilcih.	
Potrditi, ali so <i>in vitro</i> učinki prisotni tudi <i>in vivo</i> .	Od PMA odvisen nastanek ROS	Wistar podgane (m, starost 6 tednov). Pogoji: 24 ± 2 °C, 55 ± 10 % (relativna vlažnost), 12-urni cikel dan/noč. Vsaj en teden so prejemale hrano in vodo ad libitum, nato so en teden prejemale FV in PV (5 mg/kg, enkrat na dan, peroralno). Mevalonat so dodajali hkrati s FV (40 mg/kg, peroralno). Kontrolna skupina je prejemala destilirano vodo.	FV: Brez mevalonata: 5 mg/kg. Z mevalonom (40 mg/kg): 5 mg/kg	PV (5 mg/kg): ni statistično značilnega učinka.	Učinek FV je izničen s kombiniranim odmerkom FV z mevalonom.	
					Raziskovalci menijo, da k antioksidativnemu učinku FV spada poleg sposobnosti FV kot odstranjevalca radikalov tudi zaviranje nastanka ROS z zaviranjem NADPH oksidazne aktivnosti.	
					FV je znižal od PMA odvisen nastanek ROS.	

RAZPRAVA

Analiza raziskav glede na leto publikacije

Za pleiotropne učinke zdravil, med katere spada tudi antioksidativno delovanje FV, je značilno, da jih ponavadi odkrijejo v predkliničnih in kliničnih fazah razvoja zdravil, najpogosteje pa šele takrat, ko je zdravilo že nekaj časa na tržišču in v klinični uporabi in slednje velja tudi za statine (9). To bi lahko pojasnilo največje število in zgoščenost publikacij na prelomu iz 20. v 21. stoletje, saj je FV dobil dovoljenje za promet leta 1994.

Pregled raziskav

V diplomskem delu smo obravnavali osem raziskav, pri katerih so vrednotili antioksidativne lastnosti FV. Na splošno opazimo, da je antioksidativni učinek odvisen tako od vrste antioksidanta kot tudi vrste oksidanta, s katerim antioksidant reagira. Glede na izsledke raziskav sklepamo, da na antioksidativno delovanje FV vpliva tudi odmerka uporabljenega FV. V raziskavah (20, 21, 22, 23, 25) namreč opazimo od odmerka odvisno antioksidativno delovanje FV. Poleg odmerka pa bi lahko na delovanje FV vplivale tudi druge spremenljivke, kot je čas inkubacije FV v reakcijski zmesi, ki je pri nekaterih raziskavah (19, 20) tudi le 5 min. Primer razlike v antioksidativnem delovanju FV glede na drugačni uporabljeni metodi (20) je opisan v nadaljevanju.

V skoraj vseh raziskavah je FV deloval kot odstranjevalec radikalov (*tert*-butoksilnih radikalov, ki so nastali s termolizo DBDP, $O_2^{\cdot-}$, ki so nastali z NADH/PMS/NBT in PMN/CLA sistemom, HO^{\cdot} , ki so nastali v sistemu metiloranž-cinkov oksid idr.). Zanimivo pa so Hussein O. in sod. (19) v nasprotju z rezultati ostalih raziskav prišli do zaključka, da FV ne deluje kot odstranjevalec radikalov DPPH \cdot . Vzrok za to so pripisali nizkemu odmerku FV (1-10 μ g/ml). S povečanjem odmerka (100 μ g/ml) so namreč zaznali 35 % padec v absorbanci pri 517 nm. Ugotovili so tudi, da FV ne deluje kot kelator bakrovih ionov. Nasprotno pa so Kugi in sod. (23) zaznali znižanje v količini $O_2^{\cdot-}$ (katerih nastanek je povzročil angiotenzin II) že pri kliničnih koncentracijah FV (od 50 nM do 1 μ M).

V treh raziskavah (20, 21, 22) so vrednotili antioksidativne lastnosti tako FV kot njegovih metabolitov. V večini izmed izvedenih *in vitro* poskusov sta metabolita M2 in M3 pokazala največji antioksidativni učinek v primerjavi z drugimi testiranimi spojinami. Leta je bil tudi trikrat večji od antioksidativnega učinka FV. Raziskovalci sklepajo, da je visoka antioksidativna učinkovitost M2 in M3 posledica njune strukture, natančneje,

fenolne hidroksilne skupine, ki se nahaja na 5. oziroma 6. mestu indolnega obroča. Gre torej za odvzem vodikovega atoma spojini, pri čemer je v reakciji nastali radikal praviloma manj reaktiven in zato stabilnejši (17). Tako menijo (21), da je fenolna hidroksilna skupina odgovorna za povečanje jakosti antioksidativnega delovanja teh dveh metabolitov. Hkrati je za antioksidativno aktivnost pomemben tudi fluorofenilni indolni del FV, kar sklepajo glede na rezultate, kjer imajo vsi testirani metaboliti, ki so delovali kot odstranjevalci radikalov, v svoji strukturi fluorofenilni indolni del. Poleg tega so tudi Nakamura T in sod. (18) proučevali mehanizem delovanja FV in sklenili, da je aktivno mesto za antioksidativno delovanje FV alilni ogljik konjugiran z indolnim obročem.

Pri dveh ločenih raziskavah, ki ju je opravil Suzumura K. s sod. (20, 21), kjer so vrednotili sposobnost FV in njegovih metabolitov kot odstranjevalcev $O_2^{\cdot-}$ in HO^{\cdot} , opazimo razliko v odstranjevanju teh radikalov pri metabolitih M4 in M7. Če pojasnimo: pri obravnavi HO^{\cdot} se je M4 izkazal enako močan odstranjevalec kot FV, medtem ko je M7 pokazal najnižjo moč odstranjevanja HO^{\cdot} med testiranimi metaboliti. Po drugi strani pa je bil M7 močnejši odstranjevalec $O_2^{\cdot-}$ kot M4. Čeprav natančen mehanizem za to razliko ni znan, raziskovalci ugotavljajo, da vsaka delna struktura fluvastatina različno prispeva k njegovi sposobnosti odstranjevanja radikalov, glede na to, za katere radikale gre. To potrjuje tudi naša domnevo, da je učinek FV odvisen od vrste radikala, s katerim le-ta reagira. Pri eni izmed teh dveh raziskav (21), je pri uporabi sistema PMN/CLA za vrednotenje antioksidativnih lastnosti FV pokazal statistično značilen učinek odstranjevanja $O_2^{\cdot-}$, ki je bil primerljiv z učinkom M2 in M3, kar se ne sklada z rezultati drugih raziskav (spomnimo, M2 in M3 imata tudi trikrat močnejšo aktivnost kot FV). Vzrok za to bi lahko pripisali uporabljeni metodi oziroma sistemu, s katerim so proučevali antioksidativno delovanje FV. Možno je, da k podobnemu rezultatu prispeva zmožnost FV, da neposredno zavre delovanje encimov, kot je protein kinaza C, ki ima osrednjo vlogo pri nastanku $O_2^{\cdot-}$ s PMN. Sicer pa je uporaba sistema PMN/CLA prednost pred uporabo drugih sistemov, kot so npr. NADH/PMS/NBT, ker gre za biološki sistem proizvodnje $O_2^{\cdot-}$ in ima večjo fiziološko pomembnost kot ostali kemijski sistemi proizvodnje radikalov.

Antioksidativne lastnosti FV so primerjali tudi z antioksidativnimi lastnostmi drugih statinov in sicer v kar petih vključenih raziskavah (21, 22, 23, 24, 25). Najpogosteje so FV primerjali s PV in SV, ki nista pokazala primerljivih rezultatov s FV. V večini primerov, kjer je FV pokazal statistično značilno antioksidativno delovanje, PV in SV pri podobnih

odmerkih nista delovala antioksidativno (21, 22, 23, 25). Iz tega lahko sklepamo, da se delovanje FV razlikuje od ostalih statinov, kar naj bi najverjetneje pomenilo, da vzrok za zaviralno delovanje FV ni zaviranje HMG-CoA reduktaze. Po drugi strani so Bandoh in sod. (25) ugotovili, da je učinek FV izničen z dodatkom mevalonata, kar nakazuje na to, da zaviralni učinek FV na nastanek reaktivnih zvrsti (natančneje od PMA odvisnih ROS (25)) temelji na zaviranju HMG-CoA reduktaze. Zanimivo tukaj v poštev pride omeniti mnenje Suzumura in sod. (20), ki so v raziskavi glede na rezultate menili, da je statistično značilno delovanje FV (in metabolitov) skoraj v celoti neodvisno od njihovega osnovnega delovanja, saj so bile testirane spojine predhodno inkubirane s PMN za samo nekaj minut.

Skladno z ugotovitvami, iz rezultatov raziskav (20, 23, 25) in pri njihovi primerjavi opazimo tudi, da FV deluje kot odstranjevalec $O_2^{\cdot-}$. Gre za radikale, ki so pomembni v procesu nastanka ateroskleroze. Prav tako so sposobnost odstranjevanja $O_2^{\cdot-}$ pokazali tudi metaboliti FV, izmed katerih sta M2 in M3 pokazala najmočnejšo antioksidativno aktivnost (20, 22).

V dveh izmed obravnavanih študij je bilo zajeto tudi *in vivo* proučevanje antioksidativnega delovanja FV na ljudeh (19) in podganah (25). Rezultati obeh raziskav govorijo v prid antioksidativnemu delovanju FV. Kot pomanjkljivost raziskave (19) je treba poudariti nizko število sodelujočih (samo 10), zaradi česar rezultati *in vivo* niso zanesljivi. So pa Hussein in sod. (19) pri *ex vivo* proučevanju dovzetnosti LDL za oksidacijo pred zdravljenjem bolnikov s FV in po njem ugotovili, da je LDL pri bolnikih po zdravljenju s FV bolj odporen pred oksidacijo. In sicer za kar 2,5-krat po 14 tednih zdravljenja. Bandoh in sod. (25) so potrdili *in vitro* antioksidativno delovanje FV tudi *in vivo* na podganah. Pri tej raziskavi je FV znižal od PMA odvisen nastanek ROS, ki pa je bil izničen z dodatkom mevalonata.

Kot pomanjkljivost raziskav izstopajo predvsem visoki odmerki FV. Bandoh in sod. (25) so v *in vivo* raziskavi na podganah uporabili odmerek kar 5 mg/kg, medtem ko je priporočeni začetni odmerek FV za odraslo osebo od 20 do 80 mg na dan (12). Če analiziramo koncentracije, pri katerih je FV deloval antioksidativno, ugotovimo sledeče: najnižja koncentracija, ki so jo v raziskavah uporabili in pri kateri je FV že deloval antioksidativno, je 50 nM (23); koncentracija, pri kateri lahko sklepamo, da ima FV antioksidativne lastnosti, pa je 10 μ M.

Pri primerjavi izsledkov raziskav smo ugotovili, da so raziskovalci prišli do podobnih dognanj. Skoraj vsi rezultati so govorili v prid antioksidativni učinkovitosti FV. Glede na objavljeno literaturo smo prišli do zaključka, da imajo FV in njegovi metaboliti antioksidativne lastnosti, ki izhajajo neposredno iz njihove strukture in niso povezane z osnovnim delovanjem FV kot zaviralca HMG-CoA reduktaze. Zaključujemo, da imajo FV in njegovi metaboliti potencial obvarovati celice pred oksidativnimi spremembami, ki jih povzročijo reaktivne zvrsti. Ob tem se zavedamo, da bi morali za podrobnejše in bolj celovito razumevanje antioksidativnega delovanja FV v sistematični pregled raziskav vključiti tudi večji nabor drugih raziskav, ki proučujejo antioksidativno delovanje FV *in vivo*.

S sistematičnim pregledom raziskav smo dobili pregled nad do sedaj izvedenimi raziskavami na tem področju in ugotovili, da ugotovitve iz obravnavane literature dokazujejo, da ima FV antioksidativne lastnosti. V naši raziskovalni nalogi so le pri eni raziskavi (19) ovrgli delovanje FV kot odstranjevalca radikalov.

Predlagamo, da bi bilo v nadaljnjih raziskavah smiselno preverjati antioksidativno delovanje FV pri subterapevtskih odmerkih in pogojih *in vitro*, ki so čim bolj podobni razmeram v telesu. Primerna bi bila uporaba celičnih modelov, kot so humane primarne endotelijske celice koronark in aorte ter angiotenzina II kot posrednega generatorja radikalov. Zanimalo bi nas lahko tudi merjenje oksidacijskega stresa v celici.

SKLEP

Cilj diplomske naloge je bilo ugotoviti, ali literatura dokazuje, da ima fluvastatin antioksidativne lastnosti. Zato smo z ustreznim iskalnim profilom v podatkovni bazi PubMed poiskali raziskave, ki so ustrezale vključitvenim kriterijem in prišli do sklepa, da:

- je antioksidativno delovanje FV dokazano v številnih *in vitro* raziskavah (tudi v vključenih *ex vivo* in *in vivo* raziskavah);
- je antioksidativno delovanje FV neodvisno od njegove vloge kot zaviralca HMG-CoA reduktaze;
- imajo FV in njegovi metaboliti antioksidativne lastnosti, ki izhajajo neposredno iz njihove strukture;
- antioksidativno delujejo tudi metaboliti FV, predvsem M2 in M3, ki imata tudi trikrat večji antioksidativni učinek kot FV;
- je fenolna hidroksilna skupina odgovorna za povečanje jakosti antioksidativnega delovanja M2 in M3;
- je aktivno mesto za antioksidativno delovanje FV alilni ogljik konjugiran z indolnim obročem;
- je FV sposoben odstraniti radikale in zavreti nastanek reaktivnih zvrsti;
- je antioksidativno delovanje FV odvisno od odmerka ter
- da se antioksidativno delovanje FV razlikuje od antioksidativnega delovanja ostalih statinov.

S sistematičnim pregledom raziskav smo dobili pregled nad objavljenimi raziskavami na temo antioksidativnih lastnosti FV in dokazali, da ugotovitve iz obravnavane literature dokazujejo, da ima FV antioksidativne lastnosti, zaradi katerih lahko obvaruje celice pred oksidativnimi spremembami, ki jih povzročijo reaktivne zvrsti.

V luči pregledanih izsledkov raziskav predlagamo, da bi bilo v nadaljnjih raziskavah smiselno podrobneje raziskati antioksidativne lastnosti FV pri subterapevtskih odmerkih na humanih primarnih endotelijskih celicah koronark in aorte (celični model) z dejavniki, ki tudi v telesu povzročijo nastanek reaktivnih zvrsti (kot je na primer angiotenzin II).

LITERATURA

1. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE et al.: Heart Disease and Stroke Statistics. *Circulation* 2017; 135: e146-e603.
2. Badimon L, Vilahur G: LDL-cholesterol versus HDL-cholesterol in the atherosclerotic plaque: inflammatory resolution versus thrombotic chaos. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1254: 18–32.
3. Stancu C, Sima A: Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med* 2001; 5: 378-87.
4. Jasińska M, Owczarek J, Orszulak-Michalak D: Statins: a new insight into their mechanisms of action and consequent pleiotropic effects. *Pharmacol Rep* 2007; 59: 483-99.
5. Kapur KN, Musunuru K: Clinical efficacy and safety of statins in managing cardiovascular risk. *Vasc Health Risk Manag* 2008; 4: 341-53.
6. Maji D, Shaikh S, Solanki D, Gaurav K: Safety of statins. *Indian J Endocrinol Metab* 2013; 17: 636-46.
7. Kashani A, Phillips CO, Foody JM, Wang Y, Mangalmurti S, Ko DT, Krumholz HM: Risks associated with statin therapy: a systematic overview of randomized clinical trials. *Circulation* 2006; 114: 2788-97.
8. Endo A, Kuroda M, Tanzawa K: Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A Reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, Having hypocholesterolemic activity. *FEBS Letters* 1976; 72: 323-6.
9. Pella D, Rybar R, Mechirova V: Pleiotropic Effects of Statins. *Acta Cardiol Sin* 2005; 21: 190-8.
10. Jošt M: Optimizacija zdravljenja z nekaterimi zdravili v sklopu metaboličnega sindroma. *farm vestn* 2016; 67: 159-66.
11. Oesterle A, Laufs U, Liao JK: Pleiotropic Effects of Statins on the Cardiovascular System. *Circ Res* 2017; 120: 229-43.
12. Povzetek glavnih značilnosti zdravila. Dostopno na spletnem naslovu: [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/9571BE8406FED5F1C1257ACA0004C9EF/\\$File/s-011686.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/9571BE8406FED5F1C1257ACA0004C9EF/$File/s-011686.pdf)
13. Corsini A, Mazzotti M, Raiteri M, Soma MR, Gabbiani G, Fumagalli R, Paoletti R: Relationship between mevalonate pathway and arterial myocyte proliferation: in vitro studies with inhibitors of HMG-CoA reductase. *Atherosclerosis* 1993; 101: 117-25.

14. Jokubaitis LA: Development and pharmacology of fluvastatin. *Br J Clin Pract Suppl* 1996; 77A: 11-5.
15. Dain JG, Fu E, Gorski J, Nicoletti J, Scallen TJ: Biotransformation of fluvastatin sodium in humans. *Drug Metabolism and Disposition* 1993; 21: 567-72.
16. Sarangarajan R, Meera S, Rukkumani R, Sankar P, Anuradha G: Antioxidants: Friend or foe? *Asian Pac J Trop Biomed* 2017; 10: 1111-6.
17. Pečar S, Mravljak J: Šumi življenja ali radikali in druge reaktivne snovi v telesu, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2015: 11-228.
18. Nakamura T, Nishi H, Kokusunya Y, Hirota K, Miura Y: Mechanism of Antioxidative Activity of Fluvastatin-Determination of the Active Position. *Chem Pharm Bull* 2000; 48: 235-7.
19. Hussein O, Schlezinger S, Rosenblat M, Keidar S, Aviram M: Reduced susceptibility of low density lipoprotein (LDL) to lipid peroxidation after fluvastatin therapy is associated with the hypocholesterolemic effect of the drug and its binding to the LDL. *Atherosclerosis* 1997; 128: 11-8.
20. Suzumura K, Yasuhara M, Narita H: Superoxide Anion Scavenging Properties of Fluvastatin and Its Metabolites. *Chem Pharm Bull* 1999; 47: 1477-80.
21. Suzumura K, Yasuhara M, Tanaka K, Odawara A, Narita H, Suzuki T: An *in Vitro* Study of the Hydroxyl Radical Scavenging Property of Fluvastatin, an HMG-CoA Reductase Inhibitor. *Chem Pharm Bull* 1999; 47: 1010-2.
22. Nakashima A, Ohtawa M, Iwasaki K, Wada M, Kuroda N, Nakashima K: Inhibitory effects of fluvastatin and its metabolites on the formation of several reactive oxygen species. *Life Sci* 2001; 69: 1381-9.
23. Kugi M, Matsunaga A, Ono J, Arakawa K, Sasaki J: Antioxidative Effects of Fluvastatin on Superoxide Anion Activated by Angiotensin II in Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Cardiovasc Drug Ther* 2002; 16: 203-7.
24. Franzoni F, Quiñones-Galvan A, Regoli F, Ferrannini E, Galetta F: A comparative study of the *in vitro* antioxidant activity of statins. *Int J Cardiol* 2003; 90: 317-21.
25. Bandoh T, Sato EF, Mitani H, Nakashima A, Hoshi K, Inoue M: Antioxidative Potential of Fluvastatin via the Inhibition of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) Oxidase Activity. *Biol Pharm Bull* 2003; 26: 818-22.