

SIÇANLARDA SİMVASTATİN UYGULAMASI İLE OLUŞAN ANKSİYOJENİK- BENZERİ DAVRANIŞTA NİTRİK OKSİTİN ETKİSİ

Effect of Nitric Oxide on Anxiogenic-like Behavior Induced by Simvastatin Administration in Rats

Mehmet ALKANAT¹, Hafize ÖZDEMİR², Şükrücan Hasan BAYTAN³

¹Giresun Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Fizyoloji A.D., GİRESUN, TÜRKİYE

²Giresun Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hemşirelik Bölümü, İç Hast. Hemşireliği A.D., GİRESUN, TÜRKİYE

³Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Fizyoloji A.D., TRABZON, TÜRKİYE

ÖZ

ABSTRACT

Amaç: 3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzim A redüktaz enzimini inhibe ederek kolesterol sentezini engelleyen statinler tüm dünyada hiperlipidemilerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Statin ailesinin önemli bir üyesi olan simvastatinin, çeşitli çalışmalarda nitrik oksit miktarını arttırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, simvastatin kullanımına bağlı olarak değişen anksiyete seviyesine, nitrik oksit düzeyinin etki edip etmediği araştırıldı.

Gereç ve Yöntemler: Sprague-Dawley cinsi sıçanlardan, her grupta 8 denek olmak üzere, 7 grupta deneklerin anksiyete düzeyinin gözlenmesi için yükseltilmiş artı labirent ve açık alan testi uygulandı. Çözücü grubuna fosfat tamponlu çözelti uygulanırken, yalnızca simvastatin alan gruba 20 ve 40 mg/kg dozda simvastatin uygulandı. Diğer iki gruptaki deneklere 20 mg/kg simvastatine ek olarak 10 mg/kg L-NAME, diğer gruba ise 50mg/kg L-NAME uygulandı. Kalan son iki gruba 40 mg/kg simvastatin ile 10 ve 50 mg/kg L-NAME dozları uygulandı. Çözücü ve ilaç uygulamasının 1, 4, 7, 10, 15, 21 ve 28. günlerinde tüm gruplar test edildi. Yükseltilmiş artı labirent kapalı kolda kalma süresi ve açık alan testi marjın zamanları ölçüldü. Sıçanlara uygulanan çeşitli simvastatin ve L-NAME dozlarının, yükseltilmiş artı labirent ve açık alan testine etkisi, iki yönlü varyans analizi kullanılarak değerlendirildi.

Bulgular: Yükseltilmiş artı labirent testinde sadece simvastatin 40 mg/kg grubunun çözücü grubuna göre kapalı kol kalma süresinin anlamlı olarak arttırdığını gösterdi ($p<0.05$). Ayrıca açık alan testinde simvastatin 20 ve 40 mg/kg grubu çözücü grubuna göre marjın süresini anlamlı olarak arttırdı ($p<0.05$). 10 ve 50 mg/kg L-NAME dozları simvastatinin yarattığı etkiyi ortadan kaldırdı. Bulgularda gözlenen kapalı kolda kalma zamanının ve marjın süresinin artışı anksiyojenik benzeri davranış olarak değerlendirilmiştir.

Sonuç: Bulgular simvastatin uygulaması ile oluşan anksiyojenik-benzeri davranışın L-NAME etkisiyle engellendiğini, dolayısıyla simvastatin uygulamasıyla oluşan anksiyojenik-benzeri davranışın nitrik oksit mekanizmasıyla düzenlendiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Statinler, simvastatin, nitrik oksit, anksiyete, yükseltilmiş artı labirent, açık alan.

Objective: Statins which inhibit cholesterol synthesis by inhibiting 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase enzymes are used widely for treatment of hyperlipidemia. In this study, altered anxiety levels by simvastatin use have been investigated to assess whether these effects are caused by changed nitric oxide levels.

Material and Methods: Seven groups of animals each consisting of 8 Sprague Dawley rats were tested by elevated plus maze and open field methods, to observe anxiety levels. The vehicle group was administered phosphate buffered saline alone while two of simvastatin groups were administered 20 or 40 mg/kg simvastatin and vehicle. Another two groups of animals were both administered 20 mg/kg simvastatin with vehicle. When one of these groups was additionally administered 10 mg/kg L-NAME, the other group was given 50 mg/kg L-NAME along with simvastatin. Remaining two groups were both given 10 and 50 mg/kg L-NAME doses along with 40 mg/kg simvastatin. All groups were tested in the 1st, 4th, 7th, 10th, 15th, 21st and 28th days of vehicle or drug administration. The research was analyzed using two way analyzes of variances.

Results: In the elevated plus maze test, simvastatin alone showed that the 40 mg / kg group significantly increased the closed arm time compared to the solvent group ($p<0.05$). Moreover, in the open field test, simvastatin 20 and 40 mg / kg groups significantly increased the margin duration compared to the solvent group ($p<0.05$). Doses of 10 and 50 mg/kg L-NAME abolished the effect created by simvastatin. The increase in closed arm time and margin time observed in the findings was evaluated as anxiogenic-like behavior.

Conclusion: The findings show that the anxiogenic-like behavior caused by the administration of simvastatin is prevented by the effect of L-NAME, thus the anxiogenic-like behavior caused by the administration of simvastatin is regulated by the nitric oxide mechanism.

Keywords: Statins, simvastatin, anxiety, nitric oxide, elevated plus maze, open field



Yazışma Adresi / Correspondence:

Giresun Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Fizyoloji A.D., GİRESUN, TÜRKİYE

Tel / Phone: 454 3101600-3055

Geliş Tarihi / Received: 29.11.2019

ORCID NO: ¹0000-0001-8079-3749, ²0000-0002-7714-9925

Dr. Mehmet ALKANAT

E-posta / E-mail: mehmet.alkanat@gmail.com

Kabul Tarihi / Accepted: 25.08.2020

³0000-0002-8530-8930

GİRİŞ

Statinler, Endo ve arkadaşları tarafından tanımlanmış kolesterol sentezinde görev alan 3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzim A redüktaz (HMG-CoA) enzim inhibitörü ajanlardır (1). Bu ilaçlar hiperlipidemili hastalıklarda kolesterol düzeyini düşürerek serebrovasküler ve koroner kalp hastalıklarının riskini azaltmayı amaçlar. Mekanizma; kolesterol sentezinde mevalonat yoluna etki ederek kolesterol üretiminin baskılanmasıdır. Mevalonat oluşumunun kısıtlanması çeşitli fizyolojik fonksiyonları olan farnesil olan proteinlerin, geranil geranil pirofosfat ve koenzim Q gibi metabolitlerin yapımının engellenmesi ve statinlerin pleitropik etkilerinin görülmesine neden olur (2).

Statinler çeşitli çalışmalarda inflamasyonu azaltıcı, dolaşımı düzenleyici, çeşitli kanser vakalarında yararlı etkilerinin yanında, başta rabdomiyoliz ve karaciğer hasarı ile birlikte merkezi sinir sistemi (MSS) üzerine yan etkileri gösterilmiştir (3). Sinir sistemine etkileri genellikle üretim biçimlerine göre değişen hidrofilik ve lipofilik özellik taşıyıp taşımadığına bağlıdır. Anti inflamatuvar özellikleri nitrik oksit (NO) seviyesini, tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interlökin-6 gibi ajanlar üzerinden gösterdiği ifade edilmiştir (4-7). Statinler hücre zarının biyofiziksel amfifilik özelliğinin değişmesine neden olur. Morata ve arkadaşları statinlerin hücre zarında lipid bilayer tabakanın elastisitesini değiştirdiği, nano partikül düzeyde biriktiğini ve bu etkilerin hücre zarı geçirgenliğini ve fosfolipid kalınlığının değişimine neden olduğunu ifade etmiştir (8). Bununla birlikte nerdeyse dörtte biri kolesterolden oluşan (9) MSS fonksiyonlarının kolesterol sentezini değiştiren bu ilaçlardan etkilenmiyor olması pek mümkün görünmemektedir. Keza, Vecka ve arkadaşlarının sıçanlar üzerine yaptığı çalışmada hipolipidemik ilaçların beyin lipid kompozisyonunu değiştirdiği gösterilmiştir (10). Thelen ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptığı bir diğer çalışmada ise simvastatinin yüksek dozda

MSS'de biriktiği, akut olarak kullanıldığında ise ABC-A1'in (ATP-binding cassette protein A1) upreglasyonuna neden olduğu ve beyin kolesterol düzeyini değiştirdiği rapor edilmiştir (11).

Çeşitli çalışmalarda simvastatinin endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS)'a etki ederek NO düzeyini arttırdığı gösterilmiştir (4,7). Laufs ve arkadaşları simvastatin uygulamasının endotel hücrelerinde eNOS'u artırıp, NO üretimine neden olduğunu bildirmişlerdir (5). Simvastatin uygulamasıyla artan eNOS düzeyi transkripsiyon faktörlerinden protein kinaz B ekspresyonundaki artışı ile gerçekleşmektedir (12). Gao ve arkadaşları, simvastatinin MSS'den nNOS mRNA ekspresyonunun artırarak NO üretimini artırdığını rapor etmiştir. Simvastatin bu ekspresyona NOS-mRNA stabilitesini arttırarak etki etmektedir (7).

L omega -nitro-L-arginin-metil ester (L-NAME) yaygın olarak kullanılan seçici olmayan NOS inhibitörüdür. Çalışmalarda NO'nun etkilerini test/redükte etmek için kullanılır. Bu çalışmada da kan beyin bariyerini aşmış MSS'de biriktiği bilinen simvastatinin NO üretimini etkileyerek deneklerde anksiyete benzeri davranış değişimine neden olup olmadığı L-NAME kullanılarak test edilip araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma için yerel etik kuruldan gerekli izinler alındı (Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı, 14.04.2009- 2009/6-2). Çalışmada 56 adet 5 – 6 aylık, 250 – 350 g ağırlığında Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Denekler çalışma başlangıcından iki ay önce; ışığı, sıcaklığı ve nemi yapay olarak kontrol edilen elevasyon ünitesine alındı. Çalışma süresince 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ışık periyodu sağlandı. Ortam sıcaklığı 22±2

$^{\circ}\text{C}$ ve nem oranı $\%60\pm 10$ olarak korundu. Sıçanlara ad-libitum beslenme uygulandı.

Aşağıda listelendiği gibi, denekler rastlantısal tablo yardımı ile 7 gruba ayrıldı. İstatistiksel değerlendirme yapılabilmesi için her grupta 8 adet sıçan kullanıldı.

Çalışma grupları;

Grup I: Çözücü (fosfat tamponlu tuz çözeltisi (FTTÇ) + Serum fizyolojik (SF))

Grup II: Simvastatin 20 mg/kg + SF

Grup III: Simvastatin 40 mg/kg + SF

Grup IV: Simvastatin 20 mg/kg + L-NAME 10 mg/kg

Grup V: Simvastatin 40 mg/kg + L-NAME 10 mg/kg

Grup VI: Simvastatin 20 mg/kg + L-NAME 50 mg/kg

Grup VII: Simvastatin 40 mg/kg + L-NAME 50 mg/kg

Çözücü grubuna (grup I) 0.5 ml FTTÇ oral yoldan, SF 0.5 ml hacminde intraperitoneal (İP), ilaç gruplarına 0.5 ml FTTÇ içinde simvastatin 20 ve 40 mg/kg süspansiyon hale getirilerek oral yoldan uygulandı. Yalnızca simvastatin alan II ve III. gruplara, belirtilen dozlarda oral, SF ise 0.5 ml hacminde İP olarak uygulandı. Simvastatin+L-NAME alan gruplara (Grup IV-VII) belirtilen dozlarda simvastatin oral yoldan, L-NAME ise 10 ve 50 mg/kg dozlarında İP olarak uygulandı. Seçilen L-NAME dozları simvastatin ile NO etkileşimini konu alan diğer bir çalışmadan kaynak almıştır (13). Tüm çözücü ilaç ve uygulamaları 28 gün boyunca sabah 08.00 ile 10.00 saatleri arasında gerçekleştirildi. İP uygulamalar ise her deneğin oral uygulamasından 4 saat sonra gerçekleştirildi.

Yükseltilmiş artı labirent testi:

Yükseltilmiş artı labirent (YAL) testi kemirgenlerde anksiyete düzeyinin ölçümünde en sık kullanılan modellerden biridir. Yöntemde; kapalı kol bölgelerinde ve açık kol bölgelerinde deneğin kaydettiği zaman, keşfedici davranışa karşın savunmaya dayalı davranış biçiminin anlaşılması sağlanır. Kapalı kolda kalma

süresi deneğin anksiyete düzeyinin göstergesi olarak kabul edilir.

Testte denekler platform başlangıç noktasına konular ve 5 dakika süresince gözlenir. Bu çalışmada deneklerin platform üzerindeki hareketleri, bilgisayarlı görüntü işleme tabanlı analizler yapılabilmesi için video kaydı alınmıştır. Kaydedilen verilerin analizi için bilgisayar mühendisliği ile ortak geliştirilen bir program kullanıldı (14). Bu çalışmada elde edilen veriler Schrader ve arkadaşlarının uyguladığı tekrarlanan ölçümler ile test edildi (15). Testler çalışma başlangıcının 1, 4, 7, 10, 15 ve 28. günlerinde gerçekleştirilmiştir.

Açık Alan Testi

Bu yöntem ile deneğin lokomotor hareketleri ve çeşitli davranış parametreleri ölçülebilir. Fare ve sıçanların merkezden uzakta, platform duvarına yakın kısımlarda vakit geçirme isteği "tigmotaksi" olarak isimlendirilir ve anksiyete benzeri davranış olarak değerlendirilir (16). Bu çalışmada bilgisayar ile kayıtların alınabildiği bir açık alan (AA) sistemi kullanılmıştır (Coulbourn Instruments, Whitehall, PA. ABD). AA testinde deneklerin toplam hareket sayısı, katedilen mesafe, stereotipik hareket sayısı, vertikal hareket sayısı platformun marjin veya merkez bölgede geçirdiği süreler kaydedilmiştir. Tigmotaksi etkisini gösteren marjin zamanı anksiyojenik benzeri davranış olarak değerlendirilmiş ve ölçülmüştür (17).

İstatistiksel Değerlendirme

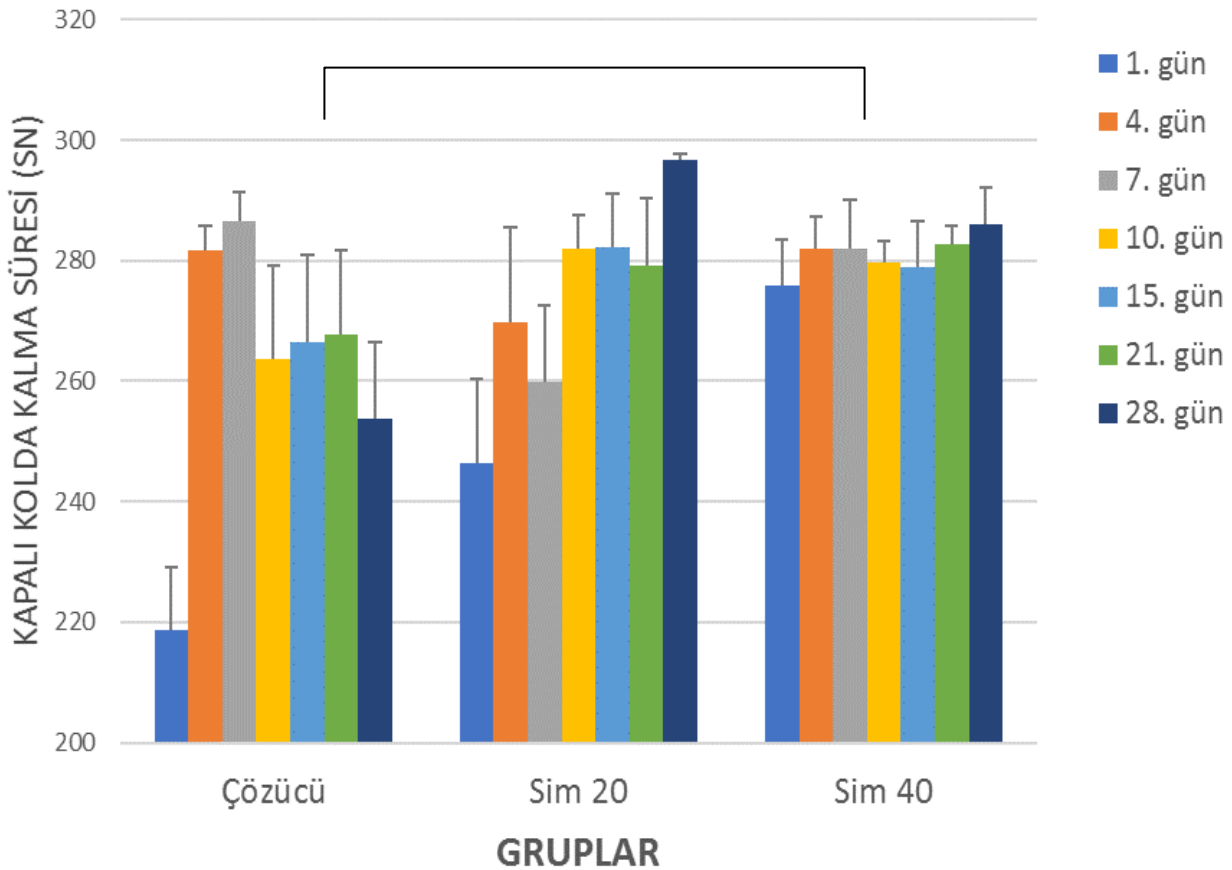
Deneklere uygulanan çeşitli simvastatin ve L-NAME dozlarının, YAL ve AA testine etkisi, iki yönlü varyans analizi (MANOVA) ile değerlendirildi. Öncelikle çözücü ve yalnızca simvastatin uygulanan gruplar arasında istatistiksel değerlendirme yapıldı. Daha sonra simvastatin dozları sabit tutularak; simvastatin+çözücü ve simvastatin + L-NAME'in farklı dozlarının YAL ve AA testine etkileri istatistiksel olarak değerlendirildi.

Post-hoc testlerinde varyansların homojen olup olmadığı Levene testi ile değerlendirildi, sonrasında Post-Hoc Tamhane testi uygulandı. İlaç ve çözücü gruplarına uygulanan istatistiksel değerlendirmenin güvenilirliği, gözlenen güç testi ile değerlendirildi. Yapılan istatistiksel analizlerde anlamlılık değeri $p<0.05$ olarak kabul edildi. Tüm testlerde veriler ortalama \pm SH (standart hata) olarak ifade edildi. Tüm istatistiksel analizler SPSS programının 22.01 sürümü kullanılarak gerçekleştirildi (Lead Technologies Inc., Chicago, IL., ABD).

BULGULAR

Yükseltilmiş Artı Labirent Bulguları

Yükseltilmiş artı labirent testi kapalı kolda kalma süreleri, çözücü, simvastatin 20, simvastatin 40 mg/kg grupları iki yönlü varyans analizi ile karşılaştırıldığında (Şekil 1) gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu görüldü ($F=5,664$, $p=0,004$). Post-hoc bulguları: Ç-Sim20 grupları arasında ortalama fark (OF): $-11,09$, $p=0,272$; Ç - Sim40 grupları arasında OF: $-17,64$, $p=0,006$; Sim20-Sim40 grupları arasında OF: $-6,54$, $p=0,469$ olarak bulundu.



Şekil 1: Çözücü, Simvastatin 20 ve Simvastatin 40 mg/kg Gruplarının Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Kapalı Kolda Kalma Süreleri.

SN: saniye, Ç: çözücü, Sim20: simvastatin 20 mg/kg, Sim40: simvastatin 40 mg/kg

* Çözücü – Simvastatin 40, $p<0.01$

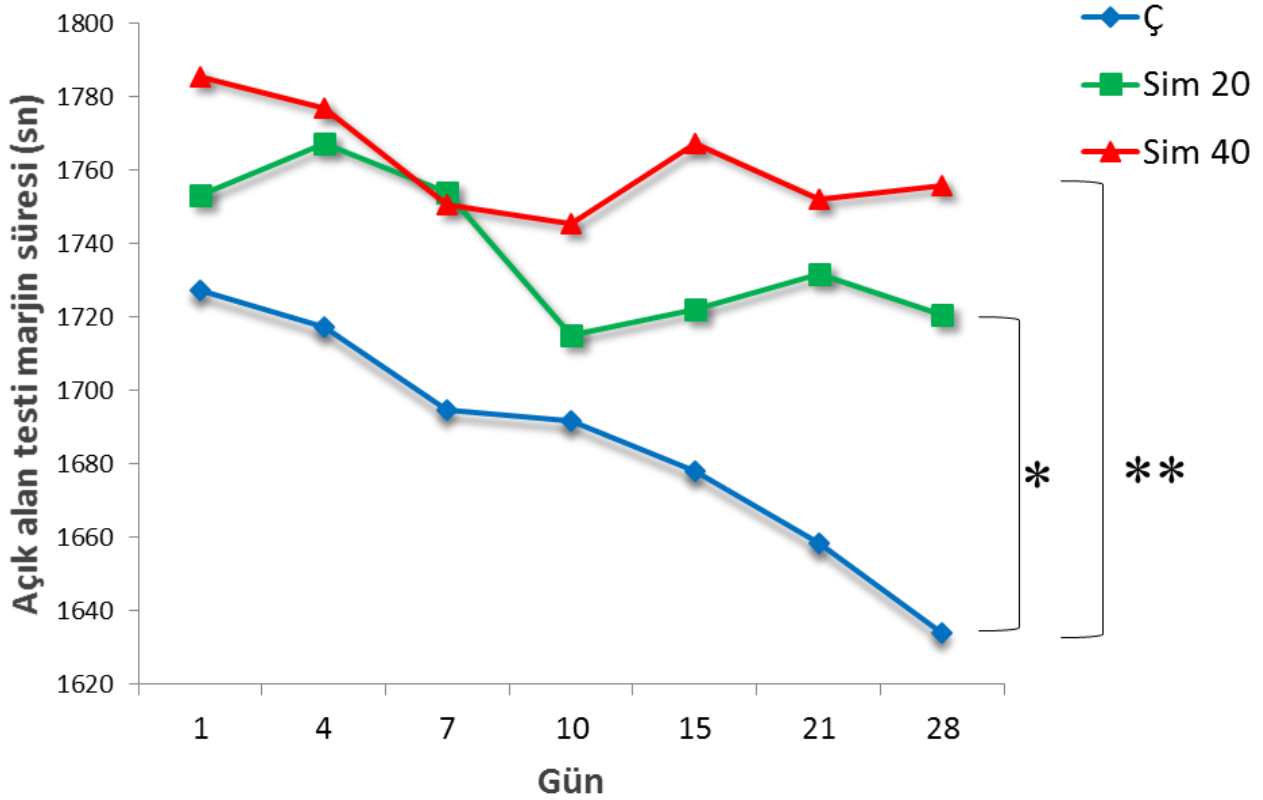
Yükseltilmiş artı labirent testi kapalı kolda kalma süreleri, simvastatin 20, simvastatin 20+L-NAME 10 ve simvastatin 20+L-NAME 50 mg/kg grupları karşılaştırıldığında, gruplar arasında fark görülmedi ($F=0,773$, $p=0,463$). Benzer şekilde YAL testi kapalı kolda kalma süreleri, Simvastatin 40, simvastatin 40+L-NAME 10 ve simvastatin 40+L-NAME 50 mg/kg grupları karşılaştırıldığında, gruplar arasında fark yoktu ($F=0,423$; $p=0,656$). Yine çözücü grupları L-NAME alan gruplarla karşılaştırıldığında fark gözlenmedi ($p>0,05$). Çözücü grubunda azalan kapalı kolda kalma süresi habituasyon olarak değerlendirildi (15). Çözücü ile 40 mg/kg simvastatin + L-NAME alan gruplardakine çok benzer değerler elde ederken,

yalnızca simvastatin 40 mg/kg alan grup denekleri kapalı kolda kalmayı sürdürdü.

Açık Alan Testi Bulguları

Çözücü, simvastatin 20 ve simvastatin 40 mg/kg grupları AA marjin sürelerinin değerlendirilmesi:

Açık alan marjin süreleri, çözücü, simvastatin 20, simvastatin 40mg/kg grupları iki yönlü varyans analizi ile karşılaştırıldığında (Şekil 2), gruplar arasında farkın anlamlı olduğu görüldü ($F:14,997$; $p<0,001$). Gruplar arası istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, çözücü ile simvastatin 20 arasında $OF:-57,15$; $p=0,007$. Çözücü-Simvastatin40 mg/kg grupları arasında $OF:-83,18$; $p<0,001$. Simvastatin 20-Simvastatin 40 grupları arasında $OF: -26,02$, $p=0,063$ olarak bulundu.



Şekil 2: Çözücü, Simvastatin 20 ve Simvastatin 40 mg/kg gruplarının Açık Alan Testi Marjin Süreleri

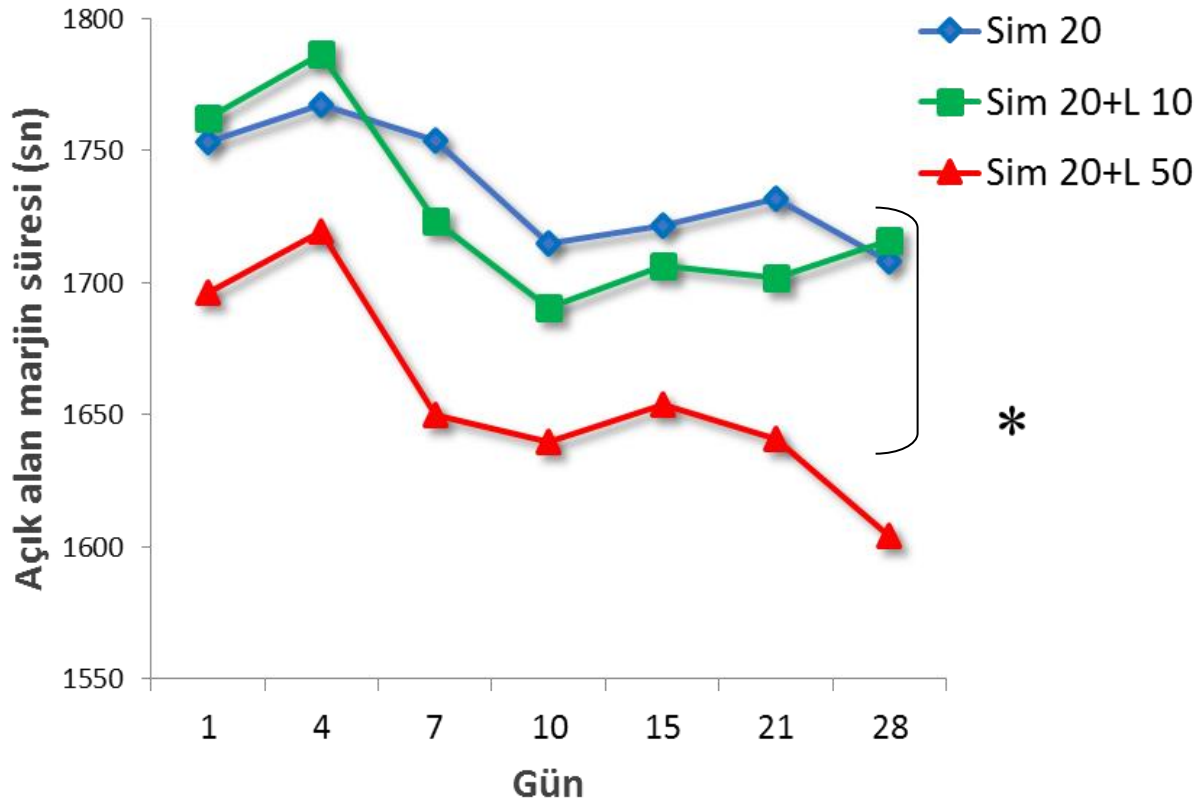
sn: Saniye, Sim20: simvastatin 20 mg/kg, Sim40: simvastatin 40 mg/kg.

*: (Çözücü) – (Simvastatin 20), $p<0,01$, **: (Çözücü)-(Simvastatin 40), $p<0,01$

Simvastatin 20, simvastatin 20 + L-NAME 10 ve simvastatin 20 + L-NAME 50 mg/kg grupları AA marjın sürelerinin değerlendirmesi:

Açık alan testi marjın süreleri, (simvastatin 20), (simvastatin 20 + L-NAME 10) ve (simvastatin 20 + L-NAME 50) mg/kg grupları karşılaştırıldığında (Şekil 3), gruplar arasında istatistiksel olarak fark vardı

($F:9,928$; $p<0.001$). Açık alan marjın süreleri değerlendirildiğinde, (simvastatin 20) ile (simvastatin 20+L-NAME 50) arasında $OF:88,22$; $p<0,001$. (simvastatin 20 + L-NAME 10) ile (simvastatin 20 + L-NAME 50) mg/kg grupları arasında $OF:79,14$; $p=0.005$. (Simvastatin 20) ile (simvastatin 20 + L-NAME 10) grupları arasında ise herhangi bir fark gözlenmedi ($p>0,05$).



Şekil 3: Simvastatin 20 mg/kg Gruplarının Açık Alan Testi Marjın Süreleri

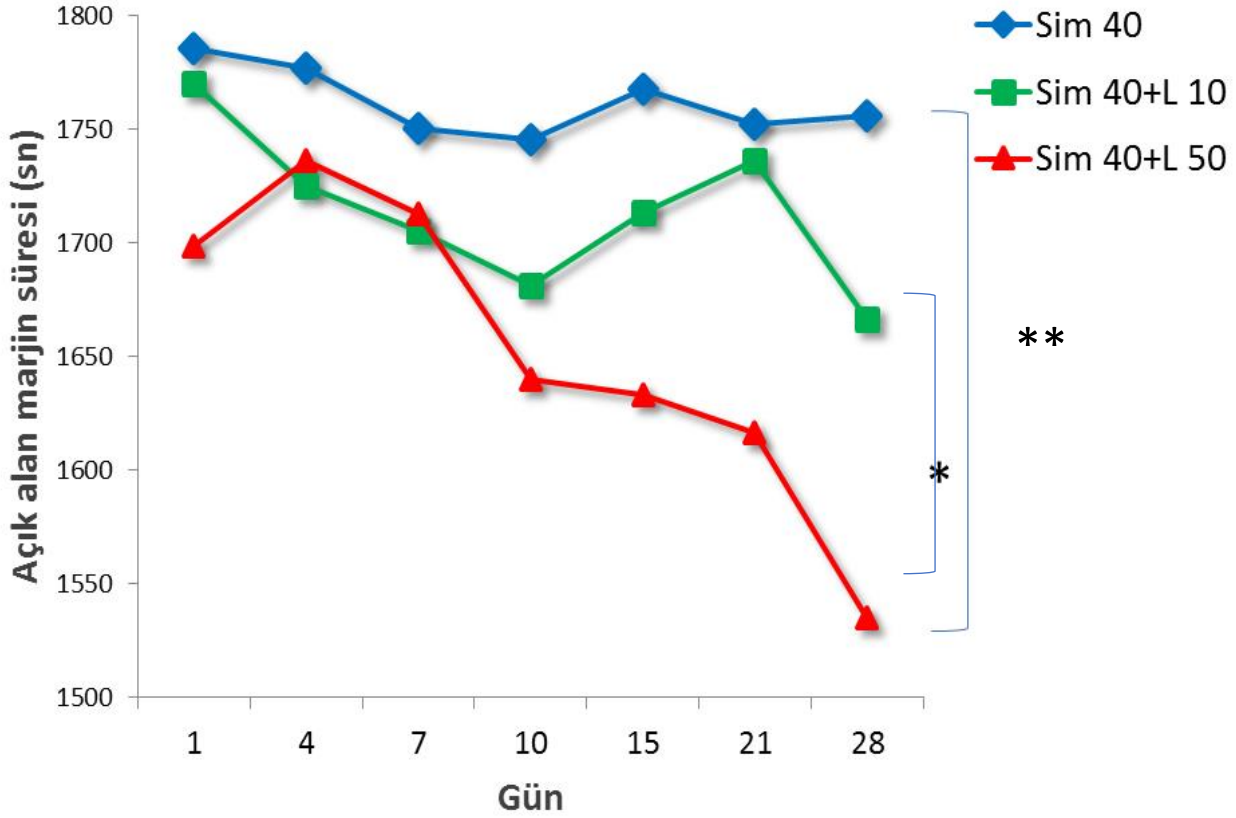
sn: saniye, Sim20: simvastatin 20 mg, Sim20 + L10: simvastatin 20 +L-NAME 10 mg, Sim20 + L50: simvastatin 20 +L-NAME 50 mg.

* (simvastatin 20) – (simvastatin 20+L-NAME 50) $p<0,001$

Simvastatin 40, simvastatin 40 + L-NAME 10 ve simvastatin 40 + L-NAME 50 mg/kg grupları AA marjın sürelerinin değerlendirmesi:

AA testi marjın süreleri, (simvastatin 40), (simvastatin 40 + L-NAME 10) ve (simvastatin 40 + L-NAME 50 mg/kg) grupları karşılaştırıldığında (Şekil 4), gruplar arasında istatistiksel olarak fark görüldü ($F = 14,457$,

$p<0.001$). Gruplar kendi aralarında değerlendirildiğinde ise: Post-hoc bulguları: (Simvastatin 40) – (simvastatin 40 + L-NAME 10) grupları arasında $OF: 47,95$, $p=0,002$. (Sim40) – (Sim40 + L50) grupları arasında $OF:113,24$, $p<0,001$. (simvastatin 40 + L-NAME10) – (simvastatin 40 + L-NAME50) grupları arasında $OF: 65,28$; $p=0,041$ olarak bulundu.



Şekil 1: Simvastatin 40 mg/kg Gruplarının Açık Alan Testi Marjin Süreleri

sn: Saniye, Sim 40: simvastatin 40 mg, Sim 40 + L 10: simvastatin 40 +L-NAME 10 mg, Sim 40 + L 50: simvastatin 40 +L-NAME 50 mg

*: (Simvastatin 40) – (Simvastatin 40 + L-NAME 10) p<0.05

** (simvastatin 40 + L-NAME10) – (simvastatin 40 + L-NAME50) p<0.05

Açık alan testinde ambulatuvar hareket, stereotipik hareket ve lokomotor hareket değerleri arasında bir fark bulunamadı (p>0,05). Farkın olmayışı gruplar arasında somatik bir etkilenim olmadığını gösterdi.

TARTIŞMA

Simvastatin ve fluvastatinin çeşitli dozları üzerinde yaptığımız ve uzaysal hafızanın ve günlük aktivitenin etkilendiğini gördüğümüz çalışmalarda deneklerin anksiyete benzeri davranış olarak kabul edilebilecek davranış değişimini gördük (18,19). Yukarıda bahsedildiği üzere statin grubu ilaçların pleiotropik etkileri arasında NO üretimini değiştirdiği ifade edilmiştir (4–7,12,20). Bu çalışmada ise simvastatinin

siçanlarda anksiyete seviyesine etkisinin NO aracılığıyla gerçekleşip gerçekleşmediğini test ettik. Çalışma bulguları çözücü, simvastatin 20 ve 40 mg/kg grupları arasında değerlendirildiğinde; simvastatin 20 ve simvastatin 40 mg/kg gruplarının AA testi marjin süresini çözücü grubuna göre arttırdığını gösterdi. Aynı zamanda simvastatin 40 mg/kg grubu, çözücü grubuna göre YAL testinde deneklerin kapalı kolda kalma süresini de arttırdı. Elde edilen bulgular simvastatinin deneklerde savunma davranışını arttırdığının göstergesiydi. Diğer bir ifadeyle artan savunma davranışı her iki test için anksiyojenik-benzeri davranış olarak kabul edilir (21). Bu etki, olasılıkla simvastatinin savunma davranışı gelişiminde görev alan nörotransmitter seviyelerini değiştirdiğini

göstermektedir. Bununla birlikte simvastatin uygulamasının MSS'de NO, asetilkolin, glutamat ve dopamin gibi nörotransmitter sistemlerine etkili olduğu rapor edilmiştir (4,7,20,22,23).

Çeşitli çalışmalarda simvastatinin eNOS, iNOS ve nNOS'a etki ederek NO düzeyini arttırdığı gösterilmiştir (4-7). NO, nöromodülatör etkilerini Gama aminobütirik asit (GABA), glutamat ve kolinesteraz mekanizmalarına etki ederek oluşur (24). NOS'un, savunma davranışı ile ilgili amigdal çekirdekler, dorsolateral periaquaduktal (dIPAG) gri cevher, stria terminalisin yatak nükleusu, lateral septal nükleus, hipotalamik paraventriküler nükleus ve hipokampusda yoğun olarak bulunduğu gösterilmiştir (25-27). Bu beyin bölgelerinden PAG'ın elektriksel veya kimyasal olarak uyarılması, savunma cevabına benzer davranışların ortaya çıkmasına neden olur (27). Ayrıca dIPAG'a NOS inhibitörleri enjeksiyonu anksiyolitik-benzeri etki oluştururken (28), NO-donörlerinden L-arjinin enjeksiyonu, NO düzeyini artırarak deneklerde savunma reaksiyonlarından; kaçma ve YAL platformundan atlama gibi anksiyojenik-benzeri davranış cevapları oluşturduğu bildirilmiştir (27).

Stres ve anksiyete ile ilgili hipotalamus, amigdala ve hipokampus ve bağlantılarında NOS enzimleri yoğun olarak bulunmaktadır (29). Kronik strese maruz bırakılan nNOS (-/-) gen yoksunu farelerin, aşırı NO üretilen farelerle karşılaştırılması sonucunda, nNOS (-/-) gen yoksunu fareler kronik stres modelinde antidepresan etkiler göstermişlerdir (30). Tavşanlarda rostral ventrolateral medullada NOS inhibisyonu fizyolojik strese baskılayıcı cevabı zayıflatmıştır (31). Volke ve arkadaşları NOS inhibitörlerinden L-NAME, L-NOARG, 7-Nitro indazol (7-NI) sistemik uygulanması sonrası YAL testi sonrasında farelerde anksiyolitik-benzeri davranışları gözlenmemiştir. Volke ve arkadaşları çalışmalarında siklik guanozin monofosfat (cGMP) inhibitörleri kullanarak etkiyi baskılamış ve NO'nun bu etkisini cGMP kaskadı

üzerinden gerçekleştirdiğini bildirmiştir (32). Slupski ve arkadaşları diazepam ve simvastatini çeşitli dozlarda deneklere uygulamış, diazepam ile kombine edilen simvastatin gruplarında diazepam'ın yarattığı anksiyolitik etki ortadan kalkmıştır (33). Yakın zamanda 32 çalışmayı inceleyen meta-analiz; 888 simvastatin tedavisi almış hastanın geri dönüşleri arasında, ilacın kendilerini daha "hasta" hissettirdiğidir (34).

Bulgularda ifade edildiği gibi 20 ve 40 mg/kg dozlarında simvastatin uygulaması anksiyojenik-benzeri davranışa neden olması; bu davranışın ise NO sistemi ile gerçekleşip gerçekleşmediği, NOS inhibitörü L-NAME ile test edildi. Bu amaçla simvastatin uygulamalarından sonra 10 ve 50 mg/kg dozlarında L-NAME uygulandı. Açık alan testlerinde 20 mg/kg simvastatin dozunda gözlenen anksiyojenik benzer davranış 50 mg/kg L-NAME dozu ile ortadan kaldırıldı. Simvastatin 40 mg/kg dozunda gözlenen anksiyojenik benzeri davranış ise L-NAME 10 ve 50 mg/kg dozları ile ortadan kaldırdı. Bulgulara göre elde ettiğimiz sonuçlar; simvastatin uygulaması ile gelişen anksiyojenik-benzeri davranışın NO mekanizmasını kullandığını gösterdi.

Literatürde simvastatin-anksiyete ilişkisini bir mekanizma ile açıklamaya çalışan tek çalışma Wang ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiş, 1,10 mg/kg simvastatin uygulanan sıçanlarda anksiyolitik-benzeri davranışta glutamat-N-metil D-aspartat (NMDA) nörotransmisyonu üzerinden bu etkinin gerçekleşebileceği tartışılmış fakat metabotropik reseptör etkileniminden bahsedilmemiştir (35).

Glutamat, hipokampus, amigdal çekirdeklerde hafıza ve duygulanım hafızasının modülasyonunda görev aldığı gibi monoaminler hatta metabotropik presinaptik reseptörleri vasıtası ile GABA'nın düzeyinin düzenlenmesinde de görev alır (36,37). NMDA reseptörleri başlıca eksitator nörotransmisyonundan sorumlu iken, metabotropik mGlu II reseptörünün uyarılması anksiyolitik etkinlik yaratır. Çeşitli

çalışmalarda mGlu2/3 reseptör agonisti LY354740 uygulaması anksiyolitik etkinlikle sonuçlandığı gösterilmiştir (36–38). mGlu II tipi reseptörlerin %80’ni amidaloid kompleks presinaptik yerleşimli olup, bu bölgedeki nörotransmisyonu düzenlediği açıktır (36,39). mGlu III tipi reseptör blokajının yalnızca klasik YAL testlerinden elde edilen sonuçlardan ziyade affektif ağrı davranışı ve pavlovian korkusu olarak ifade edilen sürekli öğrenilmiş ve daha komplike çaresizlik testlerinde olumlu yanıtlar ortaya çıkardığı görülmüştür (36). Glutaminerjik sistem aktivitesi anlaşıldığı üzere yalnızca anksiyetenin artması/azalmasından ziyade diğer davranışsal kalıpların temelinin oluşmasında modülatör rol oynamaktadır. Zira glutaminerjik sistem NO ile yakından ilişkili mekanizmaya sahiptir (39). Bilindiği gibi NMDA reseptörlerinin glutamat ile uyarılması post sinaptik membranda hücre içine Ca^{++} girişine yol açar. Ca^{++} ’un NOS içeren nöronlara girişi Ca/kalmodulin aracılığıyla enzimin aktiflenmesini ve NO üretiminin gerçekleştirilmesine neden olur (40). Korku ve anksiyete düzeyinin korunmasında görev alan amigdalanın en önemli eksitator çıkışının glutaminerjik nöronlar olduğu bilinmektedir. Fakat burada görev alan glutamat reseptörleri yoğunlukla metabotropik glutamat reseptörleridir (38-40)

Bilindiği gibi anksiyete seviyesinin düzenlenmesinde NO, ACh, glutamat, dopamin ve noradrenalin gibi nörotransmitterler etkilidir. Bu çalışmada simvastatinin yüksek dozlarda NO sistemini kullanarak anksiyojenik-benzeri etkiye neden olduğu gösterildi. Literatürdeki çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, bu etkiye NO-glutamat ilişkisinin aracılık ettiği bununla birlikte bu etkinimin metabotropik reseptörler üzerinden gerçekleştiğini düşündürdü. Aynı zamanda açık alan testinde gruplar arasında ambulatuvar hareket ve stereotipik farkının olmayışı etkinin somatize olmadığını açık göstergesiydi.

Simvastatin gibi kan beyin bariyerini aşmış MSS’de bu denli karmaşık etki gösterebilen bir ilaç, vakalarda

gösterildiği gibi santral etkinliklere neden olabilir. İlerleyen çalışmalarda davranış değişimlerinin gözlenmesine ek olarak duyulanım durumunun kontrolünde görev alan nörotransmitter seviyeleri ve MSS’de reseptör dağılımlarının ölçülmesi amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar tüm dünyada yaygın olarak kullanılan statin grubu ilaçların kullanımının düzenlenmesi, yan etkilerinin değerlendirilmesine katkı sağlayacaktır. Ayrıca duyulanım işlevinin statinler veya diğer farmakolojik ajanlarca değiştirilmesi, bu işlevin fizyolojik veya fizyopatolojik mekanizmalarına farklı bir bakış açısı kazandırılarak incelenmesini sağlayacaktır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

Etik Kurul Onamı: Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurul Başkanlığı, 14.04.2009- 2009/6-2.

KAYNAKLAR

1. Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by Penicillium citrinium. The Journal of antibiotics. 1976;29(12):1346-8.
2. Fracassi A, Marangoni M, Rosso P, Pallottini V, Fioramonti M, Siteni S et al. Statins and the brain: more than lipid lowering agents? Current Neuropharmacology. 2019;17(1):59-83.
3. Goldman JA, Fishman AB, Lee JE, Johnson RJ. The role of cholesterol-lowering agents in drug-induced rhabdomyolysis and polymyositis. Arthritis and rheumatism. 1989;32(3):358-9.
4. McGirt MJ, Lynch JR, Parra A, Sheng H, Pearlstein RD, Laskowitz DT et al. Simvastatin increases endothelial nitric oxide synthase and ameliorates cerebral vasospasm resulting from subarachnoid hemorrhage. Stroke. 2002;33(12):2950-6.

5. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation*. 1998;97(12):1129-35.
6. Nakata S, Tsutsui M, Shimokawa H, Yamashita T, Tanimoto A, Tasaki H et al. Statin treatment upregulates vascular neuronal nitric oxide synthase through Akt/NF-kappaB pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2007;27(1):92-8.
7. Gao L, Wang W, Zucker IH. Simvastatin inhibits central sympathetic outflow in heart failure by a nitric-oxide synthase mechanism. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2008;326(1):278-85.
8. Redondo-Morata L, Lea Sanford R, Andersen OS, Scheuring S. Effect of statins on the nanomechanical properties of supported lipid bilayers. *Biophysical Journal*. 2016;111(2):363-72.
9. Pfrieger FW. Role of cholesterol in synapse formation and function. *Biochimica et biophysica acta*. 2003;1610(2):271-80.
10. Vecka M, Tvrzicka E, Stankova B, Novak F, Novakova O, Zak A. Hypolipidemic drugs can change the composition of rat brain lipids. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2004;204(4):299-308.
11. Thelen KM, Rentsch KM, Gutteck U, Heverin M, Olin M, Andersson U et al. Brain cholesterol synthesis in mice is affected by high dose of simvastatin but not of pravastatin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2006;316(3):1146-52.
12. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nature Medicine*. 2000;6(9):1004-10.
13. Kesim M, Kadioglu M, Okuyan M, Muci E, Erkoseoglu I, Kalyoncu NI et al. The evaluation of analgesic effects of simvastatin, pravastatin and atorvastatin in hot plate test. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2012;16(6):789-96.
14. Sahin M, Ekinci M, Gedikli E, Baytan S. "Elevated Plus Maze on Based Computer Vision," *2007 IEEE 15th Signal Processing and Communications Applications*, Eskisehir, Türkiye. 2007. pp.1-4.
15. Schrader AJ, Taylor RM, Lowery-Gionta EG, Moore NLT. Repeated elevated plus maze trials as a measure for tracking within-subjects behavioral performance in rats (*Rattus norvegicus*). *PloS one*. 2018;13(11):e0207804.
16. Binder E, Droste SK, Ohl F, Reul JM. Regular voluntary exercise reduces anxiety-related behaviour and impulsiveness in mice. *Behavioural brain research*. 2004;155(2):197-206.
17. Baier CJ, Gallegos CE, Raisman-Vozari R, Minetti A. Behavioral impairments following repeated intranasal glyphosate-based herbicide administration in mice. *Neurotoxicology and teratology*. 2017;64:63-72. Doi:10.1016/j.ntt.2017.10.004 .
18. Baytan SH, Alkanat M, Okuyan M, Ekinci M, Gedikli E, Ozeren M et al. Simvastatin impairs spatial memory in rats at a specific dose level. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2008;214(4):341-9.
19. Baytan SH, Alkanat M, Ozeren M, Ekinci M, Akgun A. Fluvastatin alters psychomotor performance and daily activity but not the spatial memory in rats. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2006;209(4):311-20.
20. Wang Q, Tang XN, Wang L, Yenari MA, Ying W, Goh BC et al. Effects of high dose of simvastatin on levels of dopamine and its reuptake in prefrontal

- cortex and striatum among SD rats. *Neuroscience letters*. 2006;408(3):189-93.
21. Campos AC, Fogaca MV, Aguiar DC, Guimaraes FS. Animal models of anxiety disorders and stress. *Revista Brasileira de Psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)*. 2013;35 Suppl 2:S101-11.
22. Cibickova L, Hyspler R, Micuda S, Cibicek N, Zivna H, Jun D et al. The influence of simvastatin, atorvastatin and high-cholesterol diet on acetylcholinesterase activity, amyloid beta and cholesterol synthesis in rat brain. *Steroids*. 2009;74(1):13-9.
23. Wang Q, Wang PH, McLachlan C, Wong PT. Simvastatin reverses the downregulation of dopamine D1 and D2 receptor expression in the prefrontal cortex of 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonian rats. *Brain research*. 2005;1045(1-2):229-33.
24. Kuriyama K, Ohkuma S. Role of nitric oxide in central synaptic transmission: effects on neurotransmitter release. *Japanese Journal of Pharmacology*. 1995;69(1):1-8.
25. Guimaraes FS, Beijamini V, Moreira FA, Aguiar DC, de Lucca AC. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2005;29(8):1313-22.
26. Vincent SR, Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*. 1992;46(4):755-84.
27. de Oliveira RW, Del Bel EA, Guimaraes FS. Behavioral and c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. *Brain Research Bulletin*. 2000;51(6):457-64.
28. Onstott D, Mayer B, Beitz AJ. Nitric oxide synthase immunoreactive neurons anatomically define a longitudinal dorsolateral column within the midbrain periaqueductal gray of the rat: analysis using laser confocal microscopy. *Brain Research*. 1993;610(2):317-24.
29. Gulati K, Rai N, Ray A. Nitric oxide and anxiety. *Vitamins and hormones*. 2017;103:169-92. Doi:10.1016/bs.vh.2016.09.001
30. Echeverry MB, Guimaraes FS, Del Bel EA. Acute and delayed restraint stress-induced changes in nitric oxide producing neurons in limbic regions. *Neuroscience*. 2004;125(4):981-93.
31. Pshennikova MG, Bondarenko NA, Shimkovich MV. Nitric oxide as a factor of genetically determined resistance to stress damages and adaptive protection. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2001;132(5):1048-50.
32. Volke V, Wegener G, Vasar E. Augmentation of the NO-cGMP cascade induces anxiogenic-like effect in mice. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*. 2003;54(4):653-60.
33. Slupski W, Trocha M, Rutkowska M. Pharmacodynamic and pharmacokinetic interactions between simvastatin and diazepam in rats. *Pharmacological Reports*. 2017;69(5):943-52.
34. Ju A, Hanson CS, Banks E, Korda R, Craig JC, Usherwood T et al. Patient beliefs and attitudes to taking statins: systematic review of qualitative studies. *Br J Gen Pract*. 2018;68(671):e408-e419. Doi:10.3399/bjgp18X696365.
35. Wang Q, Zengin A, Deng C, Li Y, Newell KA, Yang GY et al. High dose of simvastatin induces hyperlocomotive and anxiolytic-like activities: The association with the up-regulation of NMDA receptor binding in the rat brain. *Experimental Neurology*. 2009;216(1):132-8.
36. Swanson CJ, Bures M, Johnson MP, Linden AM, Monn JA, Schoepp DD. Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. *Nature reviews Drug Discovery*. 2005;4(2):131-44.

37. Ferris P, Seward E, Dawson GR. Interactions between LY354740, a group II metabotropic agonist and the GABA(A)-benzodiazepine receptor complex in the rat elevated plus-maze. *Journal of Psychopharmacology* (Oxford, England). 2001;15(2):76-82.
38. Monn JA, Valli MJ, Massey SM, Wright RA, Salhoff CR, Johnson BG et al. Design, synthesis, and pharmacological characterization of (+)-2-aminobicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylic acid (LY354740): a potent, selective, and orally active group 2 metabotropic glutamate receptor agonist possessing anticonvulsant and anxiolytic properties. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1997;40(4):528-37.
39. Ferraguti F. Metabotropic glutamate receptors as targets for novel anxiolytics. *Curr Opin Pharmacol*. 2018;38:37-42. Doi:10.1016/j.coph.2018.02.004.
40. Cortese B, Phan KL. The role of glutamate in anxiety and related disorders. *CNS spectrums*. 2005;10:820-30.