

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**STATİN GRUBU KOLESTEROL İLAÇLARINDAN
ROSUVASTATİN'İN GENOTOKSİSİTESİ**

DOKTORA TEZİ

Ahmet Ali BERBER

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Hüseyin AKSOY

Haziran 2013

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ


STATİN GRUBU KOLESTEROL İLAÇLARINDAN
ROSUVASTATİN'İN GENOTOKSİSİTESİ

DOKTORA TEZİ

Biyolog Ahmet Ali BERBER


Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ


Bu tez 21.062013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr.
Deniz YÜZBAŞIOĞLU
Jüri Başkanı


Doç. Dr.
Serkan YILMAZ
Üye


Doç. Dr.
Hüseyin AKSOY
Üye


Doç. Dr.
Nazan Deniz YÖN
Üye


Yrd. Doç. Dr.
Mehmet SAGIROĞLU
Üye

TEŞEKKÜR

Yaptığım çalışmalar süresince engin bilgi ve tecrübelerinin yanı sıra her türlü desteği benden bir an olsun esirgemeyen çok değerli danışman Hocam Sakarya Üniversitesi Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Hüseyin AKSOY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca fikir ve görüşleriyle tezime katkıda bulunan, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım tez izleme komitesinde yer alan Ankara Üniversitesi Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Serkan YILMAZ'a ve Sakarya Üniversitesi Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Nazan Deniz YÖN'e, tezim ile alakadar olup desteğini esirgemeyen Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Mustafa ÇELİK'e ve Sakarya Üniversitesi Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet SAĞIROĞLU'na minnettarlığımı bildiririm. Çalışmamda kullandığım kimyasal maddenin izolasyonunda bana yardım eden Sakarya Üniversitesi Organik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Mustafa KÜÇÜKİSLAMOĞLU ve Doç. Dr. Mustafa ZENGİN'e ve çalışmam sırasında katkısını gördüğüm Dr. Sinan ŞEN'e çok teşekkür ederim.

Çalışmamın ve hayatımın her alanında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen saygıdeğer ve sevgili Annem Emine BERBER ve Babam Besim BERBER'e ömür boyu minnettarlık duyacağımı bildirir ve teşekkür ederim.

Her türlü sıkıntıda beni asla yalnız bırakmayan ve benimle birlikte bu süreci yaşayan ömür arkadaşım Nurcan BERBER'e ve zor anlarımın çıkışı olan değerli yavrum Yağız BERBER'e teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Bu çalışma Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu (proje no: 2012-50-02-023) tarafından desteklenmiştir. Maddi katkılarından dolayı Sakarya Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xi
SUMMARY.....	xii

BÖLÜM 1.

GİRİŞ.....	1
1.1. Kolesterol.....	4
1.1.1. Kolesterol sentezi	5
1.1.1.1. Asetattan mevalonat sentezi	6
1.1.1.2. Mevalonatın izoprene çevrilmesi	7
1.1.1.3. Skulaen oluşumu	9
1.1.1.4. Skulaenin 4 halkalı steroid çekirdeğine çevrilmesi.....	10
1.1.2. Kolesterolün taşınması	11
1.1.3. Kolesterolün fonksiyonları	19
1.1.4. Plazma kolesterol konsantrasyonunun düzenlenmesi.....	21
1.1.5. Plazma kolesterol konsantrasyonu ve etkileri	23
1.2. Statinler.....	23
1.2.1. Statinlerin pleotropik etkileri.....	26
1.2.2. Rosuvastatin.....	36

BÖLÜM 2.

MATERYAL VE METOD.....	46
2.1. Materyal.....	46

2.1.1. Rosuvastatin.....	46
2.1.2. Periferel kan.....	48
2.1.3. Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler.....	48
2.1.4. Çalışmalarda kullanılan çözeltiler	52
2.2. Metod.....	54
2.2.1. Kromozom anormallik testi	54
2.2.1.1. Mitotik indeks ve KA incelenmesi	55
2.2.2. Mikronükleus test metodu	58
2.2.2.1. MN frekansı ve nükleer bölünme indeksinin belirlenmesi	59
2.2.3. Komet (kuyruklu yıldız = tek hücre jel elektroforezi) testi	61
2.2.4. İstatistiksel değerlendirme	62
BÖLÜM 3.	
BULGULAR.....	63
3.1. Kromozomal Anormallik	63
3.1.1. 24 saatlik uygulama	63
3.1.2. 48 saatlik uygulama	71
3.2. Mikronükleus	76
3.3. Tek Hücre Jel Elektroforezi (KOMET).....	83
BÖLÜM 4.	
TARTIŞMA.....	90
KAYNAKLAR.....	111
ÖZGEÇMİŞ.....	133

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

%	: Yüzde
<	: Küçüktür
>	: Büyüktür
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
ACAT	: Açıl-KoA-kolesterol açıl transferaz
AHA	: Amerikan Kalp Derneği
ALS	: Alkali labil bölge
ApoA	: Apolipoprotein A
ApoB	: Apolipoprotein B
ApoC	: Apolipoprotein C
ApoD	: Apolipoprotein D
ApoE	: Apolipoprotein E
BN	: İki nükleuslu hücre
CBMN	: Sitokinezi bloklanmış mikronükleus testi
CETP	: Kolesterol ester transferaz proteini
Cyt-B	: Sitokalsin B
dL	: Desilitre
Ds	: Disentrik Kromozom
DSB	: Çift zincir kırığı
F	: Fragment
FPP	: Farnesil pirofosfat
GGPP	: Geranilgeranil pirofosfat
GLP	: İyi laboratuvar uygulamaları
gr	: Gram
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein

HL	: Hepatik lipaz
HMG KoA	: 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A
IDL	: Ara yoğunluklu lipoprotein
KA	: Kromozomal anormallik
KCl	: Potasyum Klorür
Kkb	: Kardeş kromatidlerde birleşme
KKD	: Kardeş kromatid değişimi
KKH	: Koroner kalp hastalıkları
Komet	: Tek hücre jel elektroforezi
Ktd	: Kromatid değişimi
Ktk	: Kromatid kırığı
KVH	: Kardiyovasküler hastalıklar
Kzk	: Kromozom kırığı
LCAT	: Lesitin kolesterolaçil transferaz
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LPL	: Lipoprotein lipaz
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
MMC	: Mitomicin C
MN	: Mikronükleus
MS	: Metabolik sendrom
nm	: Nanometre
NO	: Nitrik oksit
NOAEL	: Herhangi bir etkinin gözlenmediği doz
SSB	: Tek zincir kırığı
VLDL	: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Kolesterolün molekül yapısı ve öncü madde olan asetat	5
Şekil 1.2. Kolesterol sentezinin evreleri	6
Şekil 1.3. Asetil KoA'dan mevalonatın oluşumu	7
Şekil 1.4. Mevalonatın aktif izopren birimlerine çevirilmesi	8
Şekil 1.5. Skualenin oluşumu	9
Şekil 1.6. Skualenden kolesterol sentezi	11
Şekil 1.7. Düşük yoğunluklu lipoprotein yapısı	12
Şekil 1.8. Şilomikronların elektron mikroskobu fotoğrafı	14
Şekil 1.9. Şilomikron ile kolesterol taşınımı	15
Şekil 1.10. VLDL'nin elektron mikroskobu fotoğrafı	16
Şekil 1.11. VLDL metabolizması	16
Şekil 1.12. LDL'nin elektron mikroskobu fotoğrafı	17
Şekil 1.13. LDL nin endositoz yoluyla hücreye alınması	18
Şekil 1.14. HDL metabolizması	19
Şekil 1.15. Kolesterol tarafından türetilen steroid hormonlar	20
Şekil 1.16. İzopentenil pirofosfattan türetilen bileşikler	21
Şekil 1.17. Statinlerin HMG KoA redüktazı inhibe ettiği metabolik yol	25
Şekil 1.18. Rosuvastatinin moleküler formülü	37
Şekil 2.1. Rosuvastatin kalsiyuma ait NMR spektrumu	47
Şekil 2.2. Kromozomal anormallik testi diyagramı	57
Şekil 2.3. Mikronükleus testi diyagramı	60
Şekil 3.1. Rosuvastatin uygulaması ile oluşan kromatid kırığı	64
Şekil 3.2. Rosuvastatin uygulaması ile oluşan kromozom kırığı	64
Şekil 3.3. Rosuvastatin uygulaması ile oluşan fragment	65
Şekil 3.4. Rosuvastatin uygulaması ile oluşan kromatid değişimi	65
Şekil 3.5. Rosuvastatin uygulaması ile oluşan kardeş kromatidlerde birleşme	66
Şekil 3.6. Rosuvastatin uygulaması ile oluşan disentrik kromozom	66

Şekil 3.7. 24 saatlik rosuvastatin uygulamasında dozlara göre anormal hücre yüzdeleri	67
Şekil 3.8. 24 saatlik rosuvastatin uygulamasının insan lenfositlerinde anormal hücre yüzdesinin doza bağlı ilişkisi	68
Şekil 3.9. 24 saatlik rosuvastatin uygulamasında hücre başına düşen anormallik miktarı değerleri	69
Şekil 3.10. 24 saatlik rosuvastatin uygulamasının insan lenfositlerinde hücre başına düşen anormallik değerlerinin doza bağlı ilişkisi.....	69
Şekil 3.11. 24 saatlik rosuvastatin uygulamasında dozlara göre mitotik indeks değerleri.....	70
Şekil 3.12. 24 saatlik rosuvastatin uygulamasının insan lenfositlerinde mitotik indeksin doza bağlı ilişkisi	71
Şekil 3.13. 48 saatlik rosuvastatin uygulamasında dozlara göre anormal hücre yüzdeleri	72
Şekil 3.14. 48 saatlik rosuvastatin uygulamasının insan lenfositlerinde anormal hücre yüzdesinin doza bağlı ilişkisi	73
Şekil 3.15. 48 saatlik rosuvastatin uygulamasında hücre başına düşen anormallik miktarı değerleri	74
Şekil 3.16. 48 saatlik rosuvastatin uygulamasının insan lenfositlerinde hücre başına düşen anormallik değerlerinin doza bağlı ilişkisi.....	74
Şekil 3.17. 48 saatlik rosuvastatin uygulamasında dozlara göre mitotik indeks değerleri.....	75
Şekil 3.18. 48 saatlik rosuvastatin uygulamasının insan lenfositlerinde mitotik indeksin doza bağlı ilişkisi	76
Şekil 3.19. Rosuvastatin uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan 1 mikronükleuslu binükleat hücre	77
Şekil 3.20. Rosuvastatin uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan 2 mikronükleuslu binükleat hücre	78
Şekil 3.21. Rosuvastatin uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan 3 mikronükleuslu binükleat hücre	79
Şekil 3.22. Rosuvastatin uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan 6 mikronükleuslu binükleat hücre	79

Şekil 3.23. Rosuvastatin uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan 14mikronükleslu binükleat hücre	80
Şekil 3.24. Rosuvastatin uygulamasıyla lenfositlerde oluşan apoptotik hücre	80
Şekil 3.25. Rosuvastatin uygulamasıyla insan lenfositlerinde MN frekansı.....	81
Şekil 3.26. Mikronukleus frekansının doza bağlı ilişkisi.....	82
Şekil 3.27. Nükleer bölünme indeksinin doza bağlı ilişkisi.....	82
Şekil 3.28. Rosuvastatinin dozlara göre komet kuyruk uzunluğu değerleri	84
Şekil 3.29. Rosuvastatinin dozlara göre kuyruk momenti değerleri	84
Şekil 3.30. Rosuvastatinin dozlara göre kuyruk yoğunluğu değerleri	85
Şekil 3.31. Rosuvastatin ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde hasarsız DNA komet testi ile görünümü.....	85
Şekil 3.32. Rosuvastatin ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde az hasarlı DNA'nın komet testi ile görünümü	86
Şekil 3.33. Rosuvastatin ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan orta hasarlı DNA'nın komet testi ile görünümü	86
Şekil 3.34. Rosuvastatin ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan çok hasarlı DNA'nın komet testi ile görünümü	87
Şekil 3.35. Kuyruk uzunluğunun doza bağlı ilişkisi	88
Şekil 3.36. Kuyruk momentinin doza bağlı ilişkisi.....	88
Şekil 3.37. Kuyruk yoğunluğunun doza bağlı ilişkisi	89
Şekil 4.1. Sitotoksik ve genotoksik ajanların etkisiyle mikronükleus oluşumu, apoptozis ve nekroz	96

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.1. Lipoproteinlerin bazı özellikleri.....	13
Tablo 1.2. İnsan plazması lipoproteinlerinin Apolipoproteinleri .	14
Tablo 1.3. Statinlerin farmokinetik özellikleri	27
Tablo 3.1. Rosuvastatinin 24 saat uygulaması ile lenfositlerde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları.....	63
Tablo 3.2. Rosuvastatinin 48 saat uygulaması ile insan periferal lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları	72
Tablo 3.3. Rosuvastatin'in insan lenfositlerinde mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi	77
Tablo 3.4. Rosuvastatin ile 1 saat uygulama sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı	83
Tablo 4.1. Komet tekniği kullanılarak incelenebilecek hücre tipleri	97

ÖZET

Anahtar kelimeler: Rosuvastatin, Kromozomal Anormallik, Mikronükleus, Tek Hücre Jel Elektroforozu, Statin, Kolesterol

3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG KoA) redüktaz inhibitörü olan ilaçlardan biri olan rosuvastatin statin grubu üyesidir. Rosuvastatin yüksek kolesterol seviyesine sahip bireylerde kardiyovasküler hastalıklara karşı kullanılan bir ilaçtır. Bu çalışmada rosuvastatinin genotoksik ve sitotoksik değerlendirmesini yapmak için insan periferik lenfositlerinde kromozomal anormallik (KA), mikronükleus (MN) ve tek hücre jel elektroforozu (komet) testleri kullanılmıştır. Rosuvastatinin bu *in vitro* çalışmalar için kullanılan konsantrasyonları 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1 µg/mL'dir ve ayrıca bütün testlerde negatif ve pozitif kontrol (Mitomisin C, H₂O₂) kullanılmıştır. KA frekansları 24 saatlik uygulamada tüm dozlarda 48 saatlik uygulamada ise 0,0625 µg/mL'lik doz hariç diğer tüm dozlarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Rosuvastatin mitotik indeksi (MI) 24 saatlik uygulamada 0,5 ve 1 µg/mL'lik dozlarda, 48 saatlik uygulamada ise 0,25, 0,5 ve 1 µg/mL'lik dozlarda kontrole göre anlamlı düzeyde düşürmüştür. Kontrol ile kıyaslandığında MN frekansının tüm dozlarda istatistiksel olarak arttığı da tespit edilmiştir. Nükleer bölünme indeksi rosuvastatin uygulaması ile düşmüş fakat bu düşüş anlamlı bulunmamıştır. Komet testinde ise rosuvastatin komet kuyruk uzunluğunu ve kuyruk momentini 0,0625, 0,5 ve 1 µg/mL'lik dozlarda kontrole göre anlamlı bir şekilde arttırmıştır. Ayrıca kuyruk yoğunluğu da 0,0625 µg/mL'lik doz hariç tüm dozlarda kontrole göre anlamlı bir şekilde artmıştır. Bu sonuçlar rosuvastatinin *in vitro* insan periferik lenfositlerinde klastojenik bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Rosuvastatinin total genotoksik profilinin çıkartılması için farklı test sistemlerinde çalışmalar yapılması gerekmektedir.

GENOTOXICITY OF ROSUVASTATIN, ONE OF THE CHOLESTEROL DRUG IN STATIN

SUMMARY

Key Words: Rosuvastatin, Chromosomal Aberrations, Micronucleus, Single Cell Gel Electrophoresis, Statin, Cholesterol

Rosuvastatin which is one of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG CoA) reductase inhibitor drugs is a member of the drug class of statins. Rosuvastatin is used by patients have high cholesterol levels to prevent cardiovascular disease. In this study to evaluate genotoxic and sitotoxic potential of rosuvastatin, chromosomal aberrations (CA), micronucleus (MN) and single cell gel electrophoresis (Comet) assays was used in the human peripheral blood lymphocytes. Rosuvastatin was used at concentrations of 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 µg/mL for the *in vitro* assays. In all assays, a negative and a positive control (Mitomycin C, H₂O₂) were also included. CA frequencies were significantly increased in all doses during 24h treatment and significantly increased in all doses except 0.0625 µg/mL during 48h treatment compared with the negative control. Rosuvastatin was decreased mitotic index (MI) at 0.5 and 1 µg/mL concentrations at 24h treatment; 0.25, 0.5 and 1 µg/mL at 48h treatment. A significant raise was observed for induction of MN at all treatments compared with the negative control. Cytokinesis-block proliferation index (CBPI) were not affected by treatments with Rosuvastatin. The comet tail length and tail moment were significantly increased at 0.0625, 0.5 ve 1 µg/mL concentrations compared to controls. However, the comet tail intensity also was significantly increased in all doses (except 0.0625 µg/mL) compared with the negative control. These results show that rosuvastatin is clastogenic in *in vitro* human peripheral lymphocytes. Further studies should be conducted in other test systems to evaluate the full genotoxic potential of rosuvastatin.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Kardiyovasküler (kalp ve damar) hastalıklar, günümüzde gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde mortalite (ölüm) ve morbidite (iş görmezlik) nedenlerinin başta gelen sebeplerindendir. Bunun yanı sıra direk veya dolaylı maliyetlerinden dolayı da sağlık harcamalarında büyük bir rol oynamaktadır. Birçok Avrupa ülkesinde son yıllarda kardiyovasküler hastalıkların (KVH) mortaliteye sebep olma oranları önemli ölçüde azalmışsa da, halen Avrupa'da erken yaşta ölümlerin en önemli nedeni olarak devam etmektedir. KVH ölümlerinin %80'inden fazlasının gelişmekte olan ülkelerde meydana geldiği tahmin edilmektedir (Narla ve ark. 2009, Uyar 2009, Perk ve ark. 2012). KVH gelişmiş ülkelerde azalma eğilimine girmesinde, toplumun davranış değişikliğini hedefleyen koruma programlarının etkisi olmuştur. Araştırmalar, KVH'ların temelinde sağlıksız yaşam tarzı ve sosyal çevrenin olduğunu göstermiştir (Arıkan ve ark. 2009).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) (2012) raporunda kardiyovasküler hastalıkların, dünya genelinde toplam ölüm oranlarının %48'ini oluşturduğu belirtilmiştir. Bu rakamı %21 ile kanser, %12 ile kronik solunum yolları hastalıkları, %3,5 ile de diyabet takip etmektedir. Yine aynı raporda KVH sonucu meydana gelen ölümlerin artacağı ve 2008'de 17 milyon olan rakamın 2030'da 25 milyona çıkacağı tahmininde bulunulmuştur. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2009 yılı verilerine göre Türkiye'de 81205 kişi KVH sebebiyle ölmüştür. Bu sayı kardiyovasküler hastalıkları Türkiye için diğer hastalıklar arasında mortalite oranı en fazla olan hastalık sınıfına sokmuştur. TEKHARF çalışmasında 1990-2008 yılları arasında yapılan takipte 45-74 yaş aralığındaki koroner kalp hastalığı (KKH) sebebiyle meydana gelen ölümlerde erkekler için 1000 kişide 7,64, kadınlarda 3,84 düzeyinde olduğu tespit edilmiştir. Bu sayı Avrupa ülkeleri arasında Türkiye'yi ilk sıralara taşımıştır (Onat ve ark. 2009).

Kardiyovasküler hastalık ve inme için çok fazla (yaklaşık 200) risk faktörü bulunmaktadır. Bunlar içerisinde önemli olanları tütün kullanımı, alkol kullanımı, yüksek kan basıncı (hipertansiyon), yüksek kolesterol, obezite, sağlıksız yeme alışkanlıkları, fiziksel hareketsizlik, psikososyal stres, hiperlipidemi ve diyabettir. Dünya Sağlık Örgütü tüm KVH ölümlerinin dörtte üçünden fazlasının uygun yaşam tarzı değişiklikleri ile önlenebileceğini belirtmektedir (Nissinen ve ark. 2001, WHO 2002, WB 2002).

Çelik ve ark. (2006) insandaki tüm organ sistemlerinin fonksiyonunda önemli rol oynayan kolesterolün, batı dünyasındaki tüm ölümlerin üçte birinden fazlasının nedeni olan koroner kalp hastalığı patogenezindeki önemli unsurlardan biri olduklarını belirtmişlerdir.

Ateroskleroz (damar sertliği) ve kolesterol arasındaki ilişki 19. yüzyılın erken dönemlerine kadar uzanmaktadır. Bu dönemlerde Alman patoloji uzmanı Rudolph Virchow kalp krizi sebebiyle ölen hastaların arter duvarlarında kalınlaşmalar, düzensizlikler ve sarımsı yağ maddelerinin olduğunu belirtmiştir (Faseb 2005). 1910 yılında Nobel ödüllü Alman Kimyager Adolf Windaus'un insan aortundan izole edilen aterosklerotik plakların normal aorta göre 20-26 kat daha fazla kolesterol içeriğine sahip olduğunu göstermesiyle ortaya çıkan ateroskleroz ve kolesterol arasındaki ilişki iyice kuvvetlenmiştir. Ardından Nikolai N. Anichkov tarafından 1913 yılında kolesterolü yüksek olan diyetle beslenen tavşanlarda hiperkolesterolemi olduğu gözlemleyerek bu ilişkiyi iyice kanıtlamıştır. Bu keşif ayrıca kardiyovasküler hastalıkların sebeplerinin anlaşılması için önemli bir adım olmuştur (Konstantinov ve ark. 2006). Epidemiyolojik anlamda kolesterol ve ateroskleroz ilişkisini ortaya çıkaran çalışma ise, tıp tarihinin en büyük epidemiyolojik çalışmalarından biri olan Framingham Kalp Çalışmasıdır. Massachusetts'de küçük bir kasaba olan Framingham halkı arasından seçilen 5000'in üzerinde gönüllü katılımcının yaşam tarzları ve tıbbi özelliklerinin ileriye dönük olarak incelendiği bu çalışmadan elde edilen veriler, diyetin yağ içeriğinin kardiyovasküler hastalık gelişimiyle ilişkili olduğunu göstermiştir. Aynı şekilde, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterolün olumsuz, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterolün ise olumlu etkileri olduğu gözlenmiştir (Kannel ve ark. 1964). Yüz yıla yakın bir süre

içinde elde edilen bu çalışmalar ve diğer epidemiyolojik ve deneysel veriler, bir kolesterol taşıyıcı protein olan (LDL) aterosklerozla olan ilişkisini ortaya koymuştur (Çelik ve ark. 2006).

Diyet ve KKH arasındaki ilişkiye bir diğer örnek de kolesterol açısından düşük bir diyetle beslenen Japonların, Hawai ve San Fransisco'ya göç etmelerinden sonra diyetel alışkanlıklarını değiştirmeleriyle hem kan kolesterol düzeylerinin hem de KKH risklerinin artması gösterilebilir (Reed ve ark. 1986). Bununla birlikte deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda uzun süreli düşük konsantrasyonlu kolesterol diyetinin tavşan, tavuk, maymun gibi hayvanlarda ateroskleroza neden olduğu belirtilmiştir (Stamler ve Shekelle 1988). Kolesterol seviyesi ve ateroskleroz arasındaki etkiyi gösteren başka çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Seven 1981, Keys ve Parlin 1966, Grundy ve ark. 2004, Rubins ve ark. 1999). Düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol ile ateroskleroz arasındaki ilişki açısından önemli dönüm noktalarından biri de 1974 yılında LDL reseptörünün tanımlanmasıdır. Araştırmacılar serum LDL düzeylerinin, LDL reseptörü olarak adlandırdıkları bir hücre membranı proteini tarafından kontrol edildiğini göstermişlerdir (Goldstein ve Brown 1974).

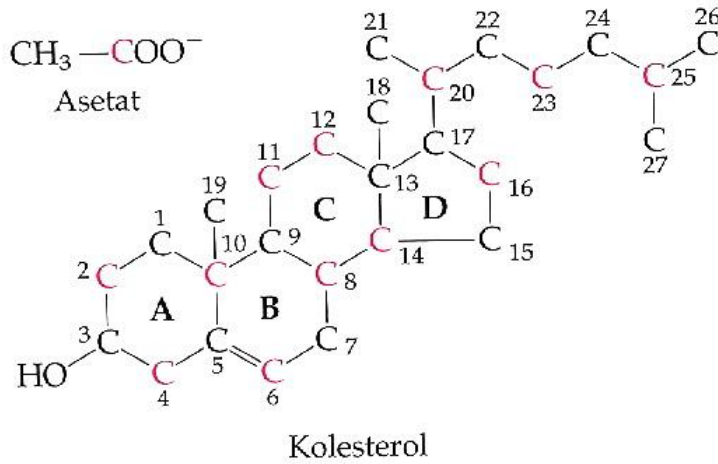
Yukarıdaki verilerden hareketle, Amerikan Kalp Derneği (AHA) 1996 yılında kan kolesterol artışından ve dolayısıyla KKH riskinden korunmak için günlük kolesterol alımının 300 mg'dan az olmasını önermiştir (AHA I. Basamak diyeti). İkincil korunma için ise, AHA ikinci basamak diyetinde günlük kolesterol alımı 200 mg ile sınırlandırmıştır (Krauss ve ark. 1996).

Aterosklerotik hastalıklarla mücadelenin önemli bir unsuru olan kolesterol düşürücü tedaviler günümüz kardiyovasküler tıbbının en önemli uğraşlarından birini oluşturmaktadır (Çelik ve ark. 2006).

1.1. Kolesterol

Kolesterol ilk defa François Poulletier de la Salle tarafından 1769'da safra taşlarında keşfedilmiş ve 1815'de Eugene Chevreul tarafından kolesterin olarak isimlendirilmiştir (Olson 1998). Hayvansal dokularda bulunan en önemli sterol, kolesteroldür ve bütün hayvansal hücrelerde bulunur. Bitkisel dokularda da yer alan steroller (fitosteroller) hücre membranının önemli bir bileşeni olan triterpenler grubunda yer alırlar (Ateş ve Velioğlu 2005). Kolesterol 27 karbonlu bir bileşik olup yapılan işaretleme yöntemleri ile Şekil 1.1'de görülen kolesterol molekülündeki karbon atomlarının öncül madde olan asetattan geldiği anlaşılmıştır. Kolesterol insan dahil birçok hayvanda çok önemli bir moleküldür fakat tüm hücrelerde basit moleküllerden sentez edilebildiği için memeli canlıların diyetinde bu maddeyi içeren gıdalara gereksinimleri yoktur Kolesterol, özellikle hayvansal gıdalarda bulunur ama vücuttaki kolesterolün ancak küçük bir kısmı gıda kaynaklıdır; çoğu vücut tarafından sentezlenir. Vücudun her hücresinde bulunmakla beraber, onun sentezlendiği veya hücre zarlarının daha çok olduğu organ ve dokularda, örneğin karaciğer, omurilik ve beyinde, ayrıca ateromlarda, kolesterolün yoğunluğu daha yüksektir(Nelson ve Cox 2005).

Kolesterol kanda normalden fazla bulunması halinde damarlarda birikerek damar sertleşmesine (ateroskleroz) yol açar. Bazen de safra pigmentleri ile birleşerek safra taşlarının oluşumunda rol oynar. Daha önce de bahsedildiği üzere insan ölümlerinin en çok (yaklaşık 1/3'ünün) KVH'dan kaynaklandığı bilinmektedir. Bu ölümlerde kalp üzerindeki koroner damarların iç kısmının, kan lipidlerinin miktarının artması sonucu daralması önemli rol oynamaktadır. Daralmaya yol açan bileşenlerden en önemlisi ise kolesterol'dür (Ateş ve Velioğlu 2005). KVH ve kolesterol arasındaki ilişki nedeniyle en fazla bilinen lipidlerden birisi olan kolesterol hayvan hücre zarlarının yapısına katılan bir bileşiktir. Kolesterol sentez yolunun belirlenmesi ve incelenmesi kolesterol ve diğer lipidlerin organlar arasında nasıl taşındığını, kolesterolün hücrelere giriş işleminin (reseptör aracılı endositoz), diyet kolesterolü tarafından etkilenen hücre içi kolesterol üretimi yolunun ve kolesterol üretiminin düzenlenmesinin bozulması yoluyla sağlığın nasıl etkilendiği anlaşılmıştır (Nelson ve Cox 2005).



Şekil 1.1. Kolesterolün molekül yapısı ve öncü madde olan asetat (Nelson ve Cox 2005)

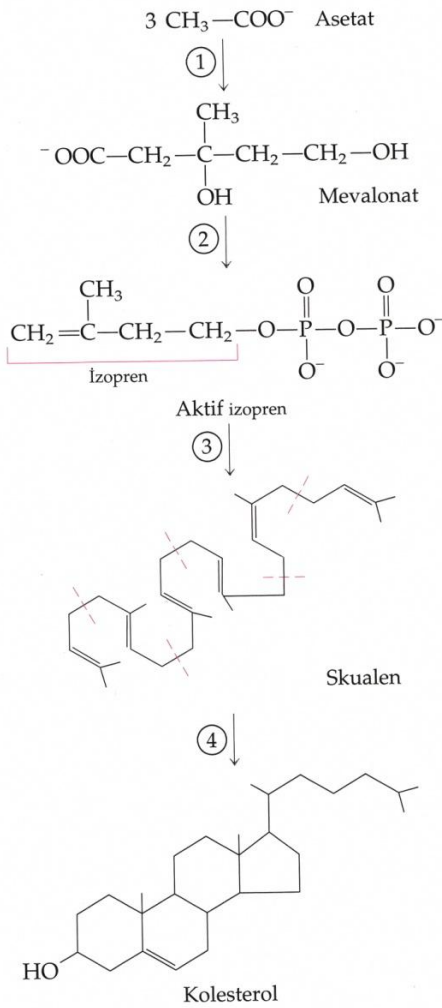
1.1.1. Kolesterol sentezi

Vücuttaki kolesterolün çoğu endojen kaynaklı olup birçok doku tarafından sentezlenmektedir. %66'sının bu şekilde endojen kaynaklı sentezlendiği kolesterolün günlük üretiminin %20-25'i karaciğerde gerçekleşir, ayrıca, ince bağırsak, adrenal bezleri ve üreme organlarındaki sentezlenme miktarı diğer dokulara kıyasla daha yüksektir (Çalışkan 1998).

Kolesterol sentezi dört evrede gerçekleşmektedir. Bunlardan ilki üç asetat birimi altı karbonlu mevalonatı oluşturmak üzere kondanse olmaktadır. İkinci evre mevalonatın aktif izopren birimlerine çevrilmesini içerir. Üçüncü evre ise 30 karbonlu doğrusal yapıda skualen oluşturmak için 6 adet 5 karbonlu izopren biriminin polimerleşmesidir. Son evre olarak da skualen halkasal bir yapıya dönüşür ve steroid çekirdeğin 4 halkası oluşur. Bunu takiben oksidasyon, metil gruplarının uzaklaşması, yer değiştirmesi gibi bir takım değişiklikler sonucunda son ürün olan kolesterol oluşmaktadır (Şekil 1.2). Nelson ve Cox (2005)'e göre bu basamaklar sırası ile aşağıda verilmiştir.

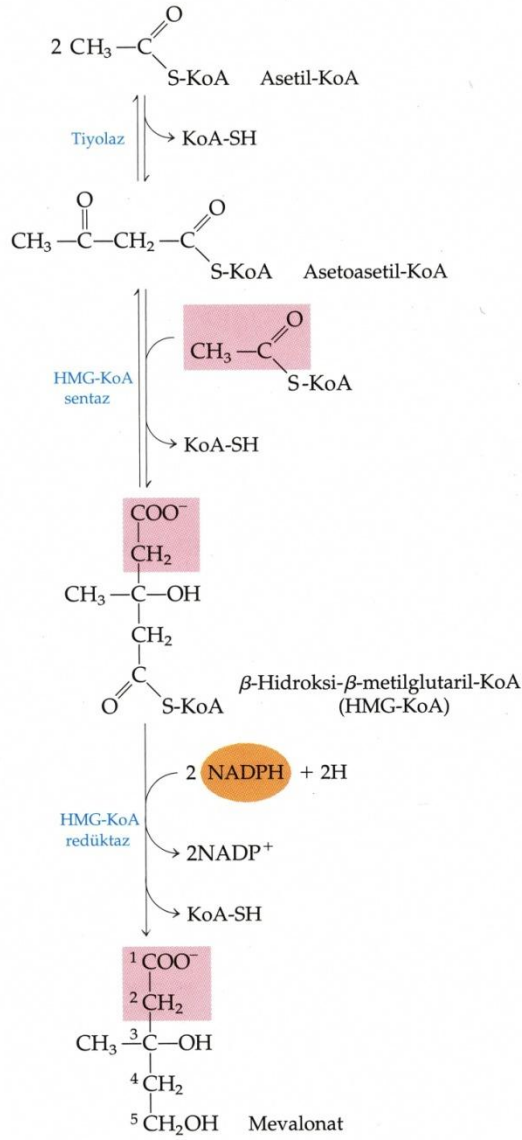
1.1.1.1. Asetattan mevalonat sentezi

Kolesterol sentezinin ilk basamağında 2 molekül asetil KoA kondanslenerek asetoasetil KoA'yı oluşturur. Bu molekül de üçüncü bir asetil KoA molekülüyle birleşerek 6 karbonlu bir bileşik olan β -hidroksi- β -metilglutaril-KoA (HMG-KoA)'yı meydana getirir. Sırası ile tiyolaz ve HMG KoA sentaz enzimleri tarafından katalizlenen bu iki tepkime tersinirdir.



Şekil 1.2. Kolesterol sentezinin evreleri (Nelson ve Cox 2005)

Üçüncü tepkime kontrol altında tutulan basamaktır ve iki molekül NADPH'nin her birinin iki elektron vermesiyle HMG KoA'nın mevalonata indirgenmesidir (Şekil 1.3). Düz endoplazmik retikulumun integral zar proteini olan HMG KoA redüktaz kolesterol biyosentezi yolunda önemli bir düzenleme noktasıdır.

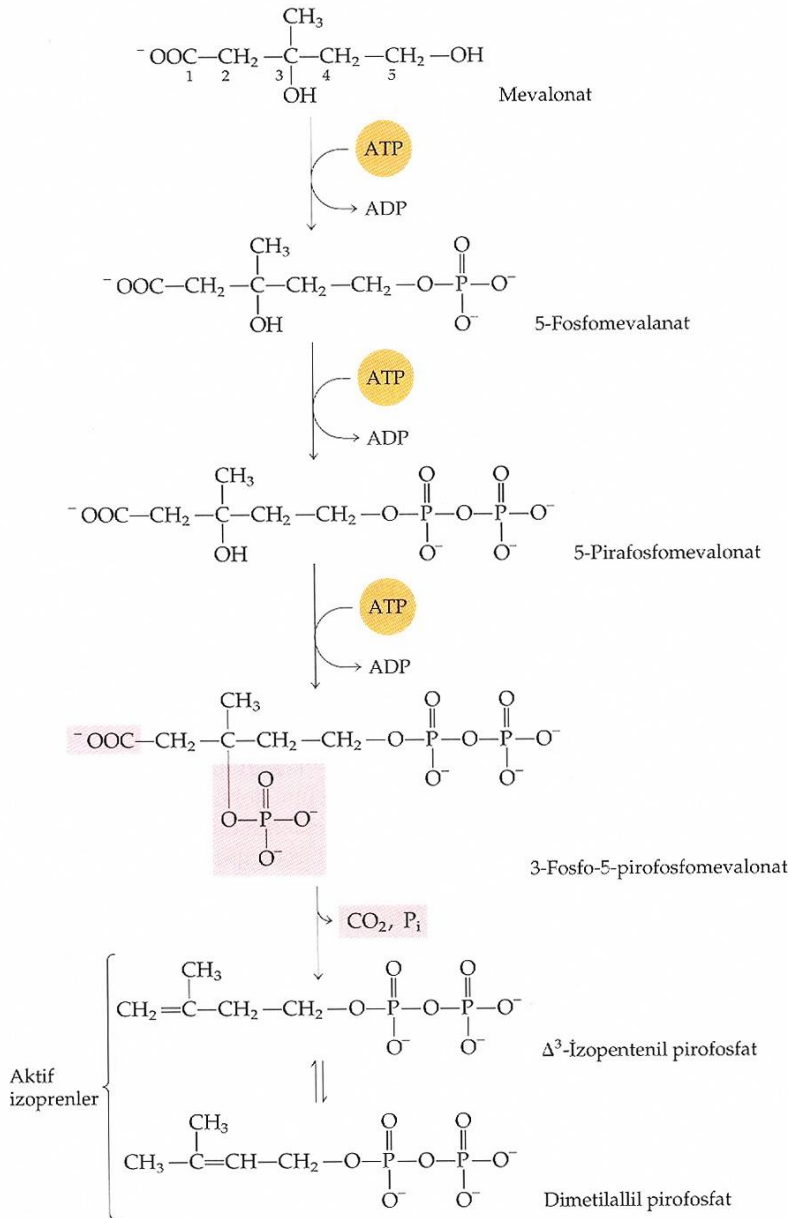


Şekil 1.3. Asetil KoA'dan mevalonatın oluşumu (Nelson ve Cox 2005)

1.1.1.2. Mevalonatın izoprene çevrilmesi

Kolesterol sentezinin sonraki evresinde üç ATP'den üç fosfat grubu mevalonata transfer edilir (Şekil 1.4). 3-fosfo-5-pirofosfomevalonat ara ürünündeki mevalonatın C-3'ündeki hidroksil grubuna tutunan fosfat iyi ayrılabilen gruptur; sonraki kademede bu fosfat ve yanındaki karboksil grubu, beş karbonlu bir ürün olan Δ^3 -izopentil pirofosfatta bir çift bağ oluşturarak birlikte ayrılır. Bu kolesterol oluşumundaki aktifleştirilmiş iki izoprenden birisidir. 3-izopentil pirofosfatın izomerleşmesi ikinci aktif izopren olan dimetilallil pirofosfatı oluşturur. İzopentil

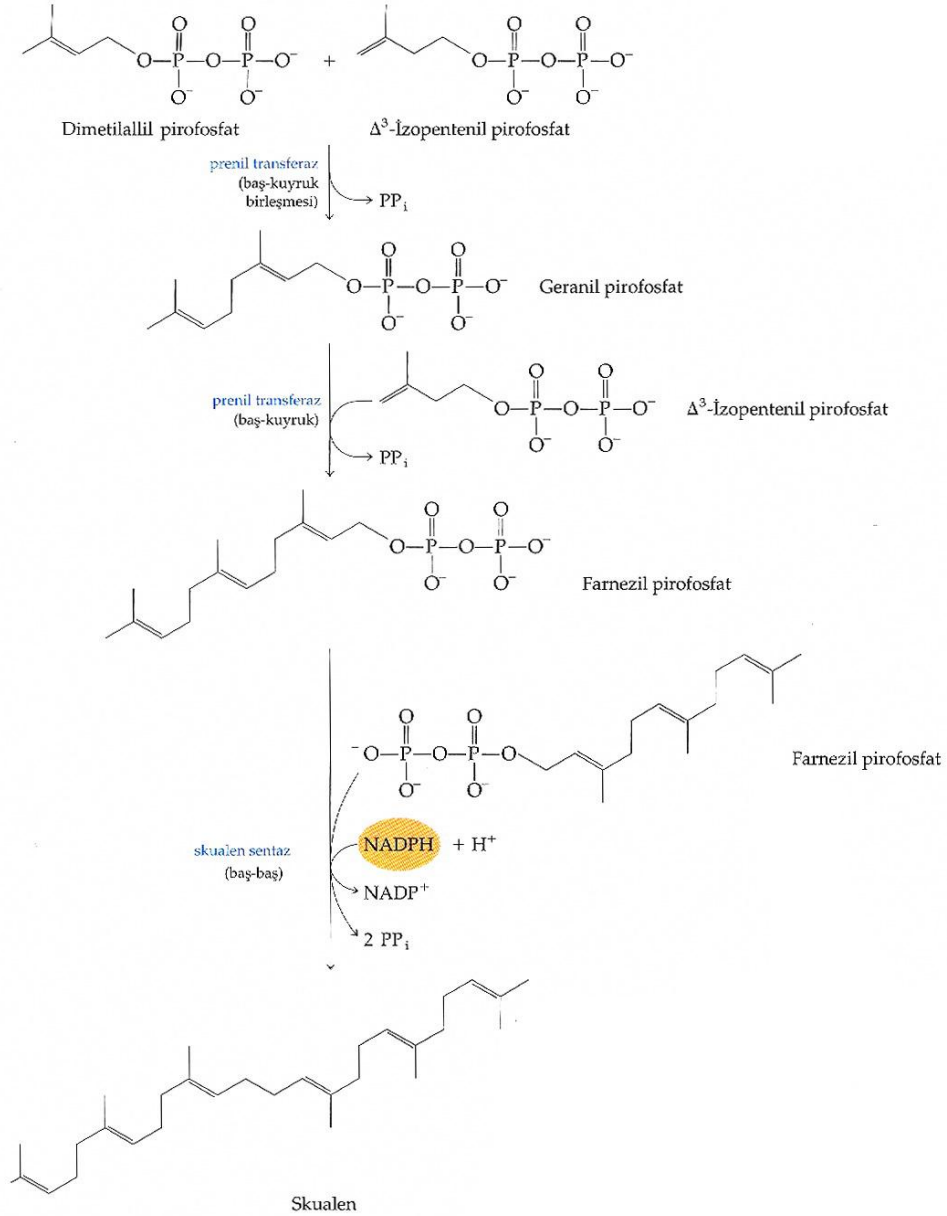
pirofosfatın bitki hücrelerinin stoplazmasındaki sentezi burada tanımlanan metabolik yolu izler. Bununla beraber, birçok bakteride ve bitki hücrelerinin kloroplastlarında mevalonattan bağımsız yol kullanılır. Bu alternatif yol hayvanlarda oluşmaz. Böylece bu yol yeni ilaçların geliştirilmesi için çekici bir hedeftir (Nelson ve Cox 2005).



Şekil 1.4. Mevalonatın aktif izopren birimlerine çevirilmesi (Nelson ve Cox 2005)

1.1.1.3. Skualen oluşumu

İzopentil pirofosfat ve dimetilallil pirofosfat bir baş ve kuyruk birleşmesine uğrar ve bir pirofosfat grubu yerinden ayrılır ve 10 karbon zincirli geranil pirofosfat oluşur (Şekil 1.5).

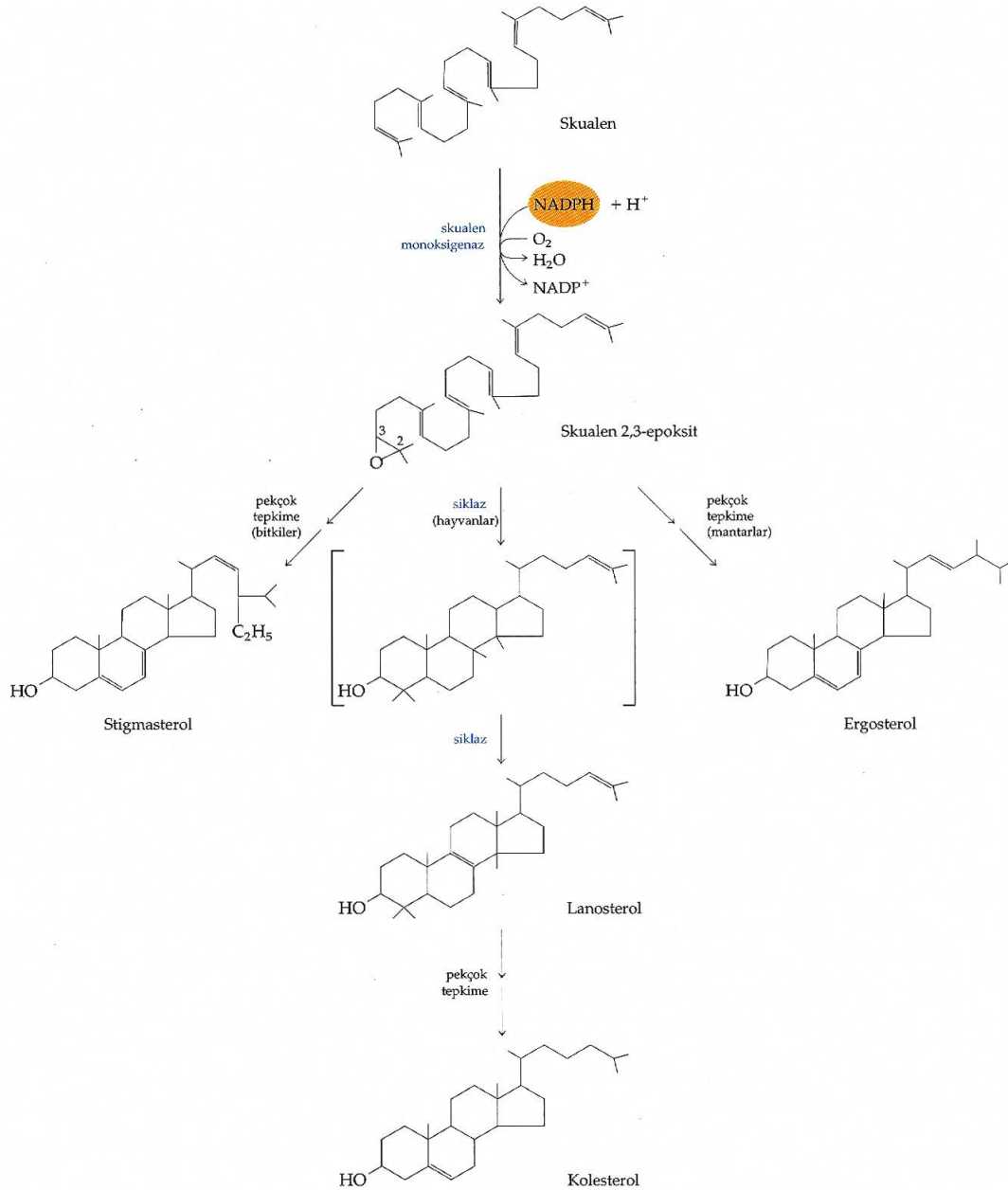


Şekil 1.5. Skualenin oluşumu (Nelson ve Cox 2005)

1.1.1.4. Skualenin 4 halkalı steroid çekirdeğine çevrilmesi

Skualen molekülü Şekil 1.6'daki gibi gösterildiği zaman sterollerin çekirdek yapısıyla doğrusal yapı arasındaki ilişki belirgindir. Sterollerin hepsi dört kaynaşmış halkaya sahiptir (steroid çekirdeği) ve hepsi 3. karbondaki bir hidroksil grubuyla alkol yapısındadır, bu nedenle adları "sterol"dür. Skualen monooksijenazın etkisi O_2 'den bir oksijen atomunu bir epoksit oluşturmak üzere skualen zincirinin ucuna eklemektedir. NADPH O_2 'nin diğer oksijen atomunu H_2O 'ya indirir. Skualen 2, 3-epoksit ürününün çift bağları doğrusal skualen epoksidi halka yapısına çevirebilecek şekilde yönlendirilmiştir. Hayvan hücrelerinde bu halkalaşma steroid çekirdeğin dört karakteristik halkasını taşıyan lanosterolün oluşumuyla sonuçlanır. Sonuç olarak lanosterol, bazı metil gruplarının yer değiştirmesine ve bazılarının ayrılmasını içeren 20 civarında tepkimeyle kolesterole çevrilir (Şekil 1.6) (Nelson ve Cox 2005).

Kolesterol hayvan hücrelerine özgü bir steroldür; bitkiler, mantarlar ve protistler skualen 2,3-epoksidin sentez yolunun aynısını kullanarak, kolesterol yerine yakından ilişkili diğer sterollerini yapar. Sentez yolu bu noktada birçok bitkide stigmasterolü ve mantarda ergosterol gibi diğer sterollerini vermek üzere biraz sapma gösterir. Omurgalılarda kolesterol sentezinin çoğu karaciğerde yer alır. Burada yapılan kolesterolün küçük bir kısmı hepatositlerin zarlarına yerleşir fakat büyük bir kısmı üç formdan birinde uzaklaştırılır; bu formlar safra kolesterolü, safra asitleri ve kolesterol esterleridir. Safra asitleri ve onların tuzları karaciğerde sentezlenen ve yağ sindirimine yardımcı olan kolesterol türevleridir. Kolesteril esterleri karaciğerde açıl-KoA-kolesterol açıl transferaz (ACAT) etkisiyle oluşur. Bu enzim kolesterolü daha hidrofobik bir şekle çevirmek üzere kolesterolün hidroksil grubuna KoA'dan bir yağ asidinin transferini katalizler. Kolesterol esterleri lipoprotein partikülleri olarak kolesterol kullanan diğer dokulara taşınır veya karaciğerde depolanır.



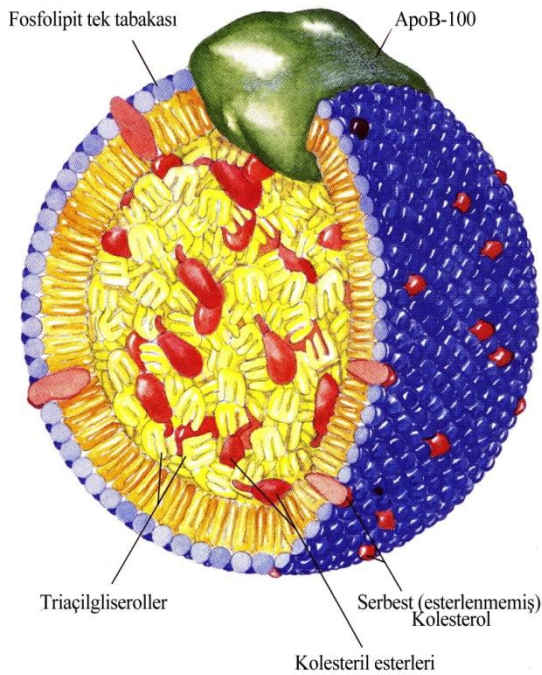
Şekil 1.6. Skualenden kolesterol sentezi

1.1.2. Kolesterolün taşınması

Kolesterol ve kolesterol esterleri, triaçil gliserol ve fosfolipitler esas olarak suda çözünmezler. Bununla birlikte bu lipitler yapıldıkları dokulardan kullanılacakları ya da depolanacakları dokulara taşınmalıdırlar. Bunlar apolipoprotein adı verilen proteinler vasıtasıyla taşınmaktadır. Şekil 1.7’de düşük yoğunluklu lipoprotein üzerinde bulunan bir apolipoprotein gösterilmektedir. Apolipoproteinler;

fosfolipitler, kolesterol, kolesterol esterleri ve triaçilgliserollerin çeşitli bileşimleriyle oluşan makromolekül kompleksleri olan plazma lipoproteinleri şeklinde bir dokudan diğerine kan plazmasında taşınır (Nelson ve Cox 2005).

Garrett ve Grisham (2010)'a göre lipoproteinler yoğunluklarına göre sınıflandırılabilir. En hafifinden (yani en çok lipid, en az protein içereninden) en yoğununa doğru sıralama şöyledir; şilomikronlar, çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL), Ara yoğunluklu lipoprotein (IDL), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) şeklindedir. Bette ve Dietscyh (1978)'de lipoproteinleri 4 farklı grupta toplamıştır. Aynı çalışmada IDL kolesterolü sınıflandırmada ayrı olarak ele alınmamıştır.



Şekil 1.7. Düşük yoğunluklu lipoprotein yapısı (Nelson ve Cox 2005)

Tablo 1.1'de de görüldüğü üzere yoğunluk bakımından en fazla olan lipoprotein LDL'dir ve en düşük yoğunluğa sahip olan ise şilomikronlardır.

Tablo 1.1. Lipoproteinlerin bazı özellikleri (Garrett ve Grisham 2010).

Yoğunluk(g/mL)	Tür	Çap (nm)	% Protein	% Kolesterol	% Fosfolipit	% Triaçilgliserol ve Kolesterol ester
>1,063	HDL	5–15	33	30	29	4
1,019–1,063	LDL	18–28	25	50	21	8
1,006–1,019	IDL	25–50	18	29	22	31
0,95–1,006	VLDL	30–80	10	22	18	50
<0,95	Şilomikron	100-1000	<2	8	7	84

İnsan plazmasındaki lipoproteinlerde farklı apolipoproteinler bulunur (Tablo 1.2). Bunlar büyüklüklerine, özgül antikorlar ile tepkimelerine ve lipoprotein sınıflarındaki karakteristik dağılımlarına göre ayırt edilebilir. Bu protein bileşenleri sinyal olarak davranarak lipoproteinleri özgül dokulara yönlendirmede veya lipoprotein üzerinde görev yapan enzimleri aktifleştirmede görev yapar (Nelson ve Cox 2005). Lipoproteinler, bu özelliklerine ilave olarak farklı dokularda kolesterol sentezi oranının düzenlenmesini de kontrol etmede önemli bir rol oynarlar (Bette ve Dietschy 1978). Bu durum şu şekilde örneklendirilebilir. Şilomikronlar tarafından taşınan eksojen kaynaklı kolesterol karaciğer tarafından alındığında *de novo* olarak kolesterol sentezi baskılanmaktadır. Bu da kolesterol sentezinin oranını değiştirmektedir (Weis ve Dietschy 1969, Nervi ve Dietschy 1975).

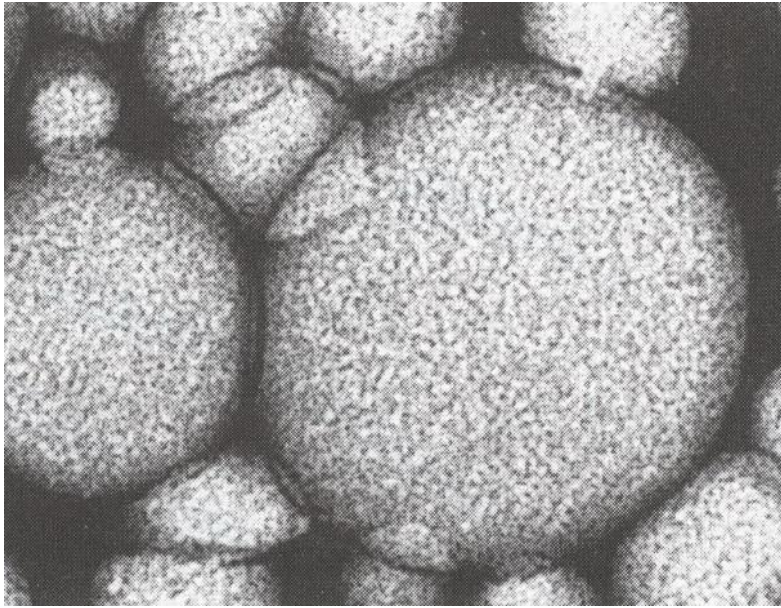
Şilomikronlar, %85-92 oranında triaçilgliserol, %6-12 oranında fosfolipid, %1-3 oranında kolesterol ve %1-2 oranında protein içeren lipoprotein partikülleridir (Hussain 2000). Şilomikronlar incebarsakta sentez edilirler ve elektroforezde hareket edemezler (Şekil 1.8). Şilomikronlar ince barsak mukozası hücrelerinde trigliserit, fosfolipit, kolesterol ve apolipoproteinlerin bir araya gelmesiyle oluşturulur (Tulenko ve Sumner 2002). Şilomikronlar, plazmada dolaşırken birkaç apolipoprotein (apoB48, apoE, apoC) içerirler. ApoB48, apoB'nin barsak tarafından yapılan tek şeklidir (Beisiegel 1998). İnce barsağın epitel hücrelerinde sentezlenirler. İntestinal epitel hücreleri tarafından alınan serbest yağ asitleri ve monogliseritler intestinal hücrelerin apikal bölgesindeki düz endoplazmik retikulumda trigliseritlere dönüşür.

Tablo 1.2. İnsan plazması lipoproteinlerinin Apolipoproteinleri (Vance ve Vance 1985).

Apolipoprotein	Molekül ağırlığı (Da)	Lipoprotein sınıfı
ApoA-I	28331	HDL
ApoA-II	17380	HDL
ApoA-IV	44000	Şilomikronlar, HDL
ApoB-48	240000	Şilomikronlar
ApoB-100	513000	VLDL, HDL
ApoC-I	7000	VLDL, HDL
ApoC-II	8837	Şilomikronlar, VLDL, HDL
ApoC-III	8751	Şilomikronlar, VLDL, HDL
ApoD	32500	HDL
ApoE	34,45	Şilomikronlar, VLDL, HDL

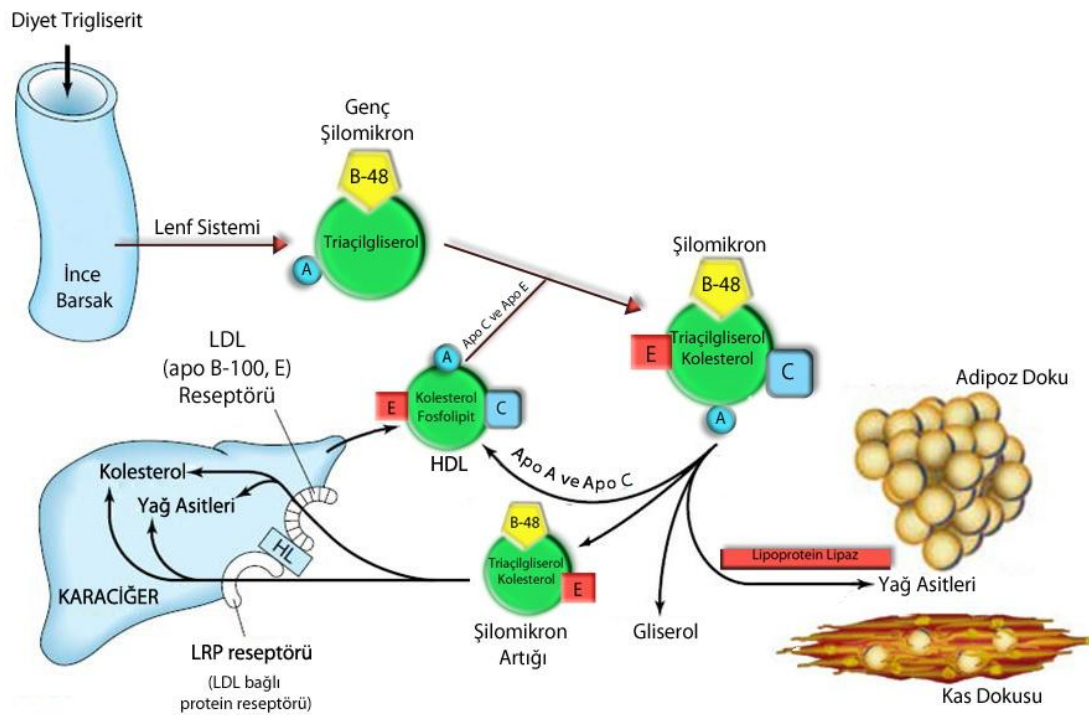
Da: atomik kütle birimi, dalton

Trigliseritlerle beraber hem fosfolipitler hem de kolesterol büyük şilomikron partiküllerinin yapımında kullanılırlar. Şilomikronlar lenf ve kanda dolaşırken taşıdıkları lipitleri yüksek yoğunluklu lipoproteinlerdekiyle (HDL) değiştirler (Mahley ve ark. 2003).



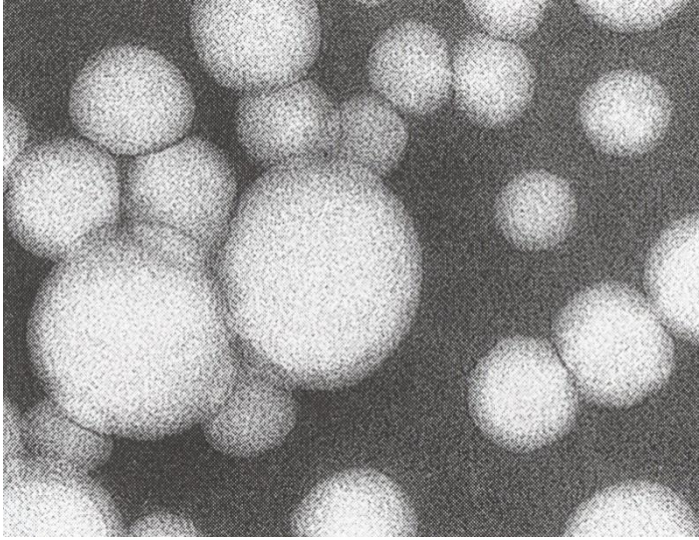
Şekil 1.8. Şilomikronların elektron mikroskobu fotoğrafı (50-200 nm çapında) (Nelson ve Cox 2005)

HDL apoC2 ve apoE'yi yeni salgılanmış şilomikronlara aktarır. apoC2, lipoprotein lipaz (LPL)'ın kofaktörüdür ve trigliseritlerin parçalanmasında etkilidir. Eksojen kaynaklı trigliseritler barsaklarda şilomikronlar tarafından alındıktan sonra yağ, kalp ve kas dokularına taşınır (Komşuoğlu 1992) ve dolaşımdaki şilomikronlar bu dokuların kılcıl damarlarında bulunan LPL etkisiyle trigliseridden fakir, kolesterolden zengin şilomikron artıklarına dönüşürler (Şekil 1.9) (Cooper 2000). Hepatik lipaz (HL) şilomikron artıklarının hepatositler tarafından alınmasının son aşamasında da rol oynar (Beisiegel 1998).

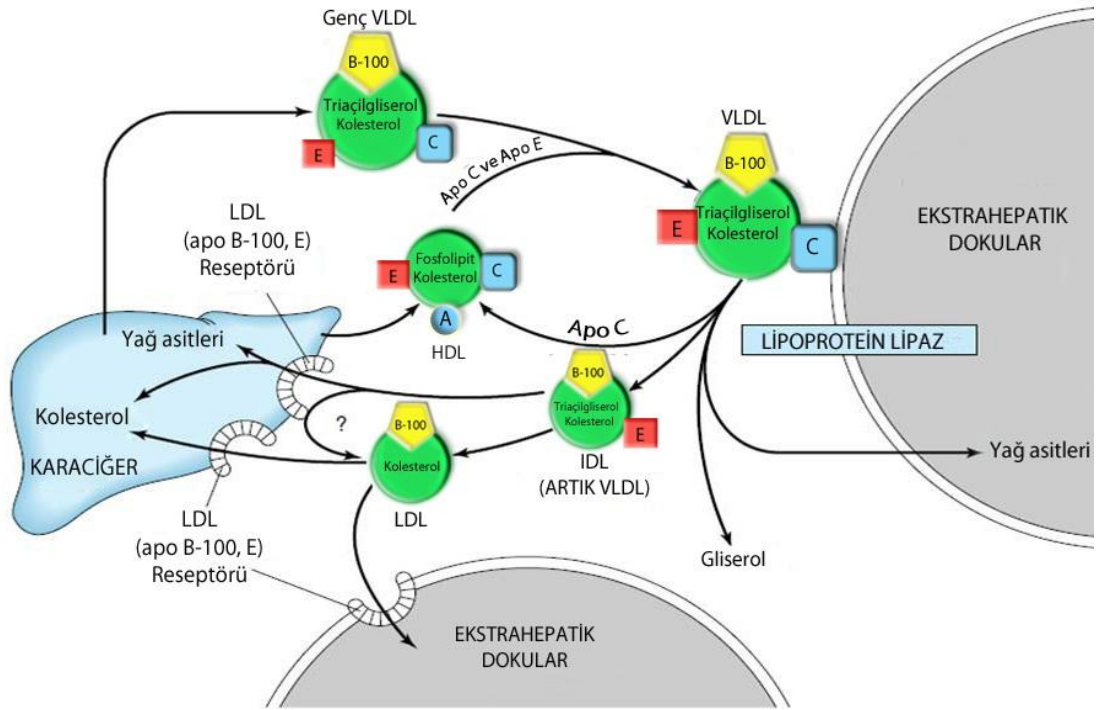


Şekil 1.9. Şilomikron ile kolesterol taşınımı (Medchrome 2013'den modifiye edilmiştir)

VLDL yapımı ve üretimi hepatositlere yağ asidi sağlanmasıyla uyarılır. VLDL karaciğerde sentezlenmiş kolesterolu, trigliseritleri, fosfolipitleri ve kolesteril esterleri taşır. Suda çözünemeyen bu lipidler VLDL'in bünyesi içinde paketlenince kanda taşınabilir hale gelirler. (Tymoczko ve ark 2007)(Şekil 1.10-11).



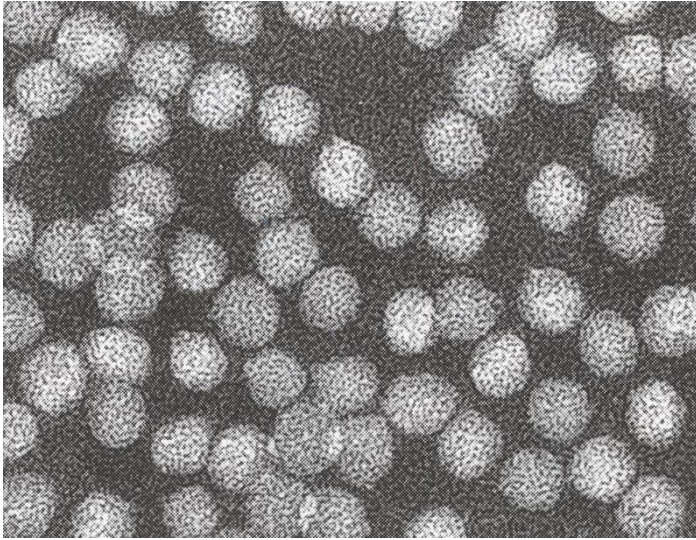
Şekil 1.10. VLDL'nin elektron mikroskobu fotoğrafı (50-200 nm çapında) (Nelson ve Cox 2005)



Şekil 1.11. VLDL metabolizması (Medchrome 2013'den modifiye edilmiştir)

Düşük yoğunluklu lipoproteinler, VLDL'nin bir miktar triaçilgliserol kaybıyla VLDL kalıntısına ve ardından daha fazla triaçilgliserol kaybıyla da LDL ye dönüşmesi şeklinde oluşurlar (Nelson ve Cox 2005). İnsanlarda kan kolesterolünün %60-75'i, dolaşımdaki kolesterolün ana kaynağı olan LDL ile taşınır (Rainwater ve ark. 1997). Yaklaşık %50 lipit (%25 fosfolipit, %15 kolesterol ester, %5 serbest kolesterol, %5 trigliserit) ve %50 proteinden oluşur (Beisiegel 1998, Berg ve ark

2002, Mahley ve ark. 2003). LDL'nin aterojenik olduğu bilinmektedir ve birçok hücrede kolesterol kaynağı olarak kullanılır (Brown ve Goldstein 1984, Walker ve ark. 1990, Russell 1992). Taşıdığı lipitlerin yanı sıra apoB 100 ve apoE proteinlerini içerir (Şekil 1.7 ve Şekil 1.12). LDL reseptörünün LDL'yi bağlaması endositoz olayını başlatır (Şekil 1.13). LDL seviyesi ile kalp hastalıkları arasındaki bağlantıdan dolayı sıkça kötü kolesterol olarak anılır. LDL'nin başlıca işlevi, kolesterol ve trigliserit üreten hücre ve dokulardan bu molekülleri alıp bunlara gereksinimi olan hücre ve dokulara taşımaktır (Heart 2013).

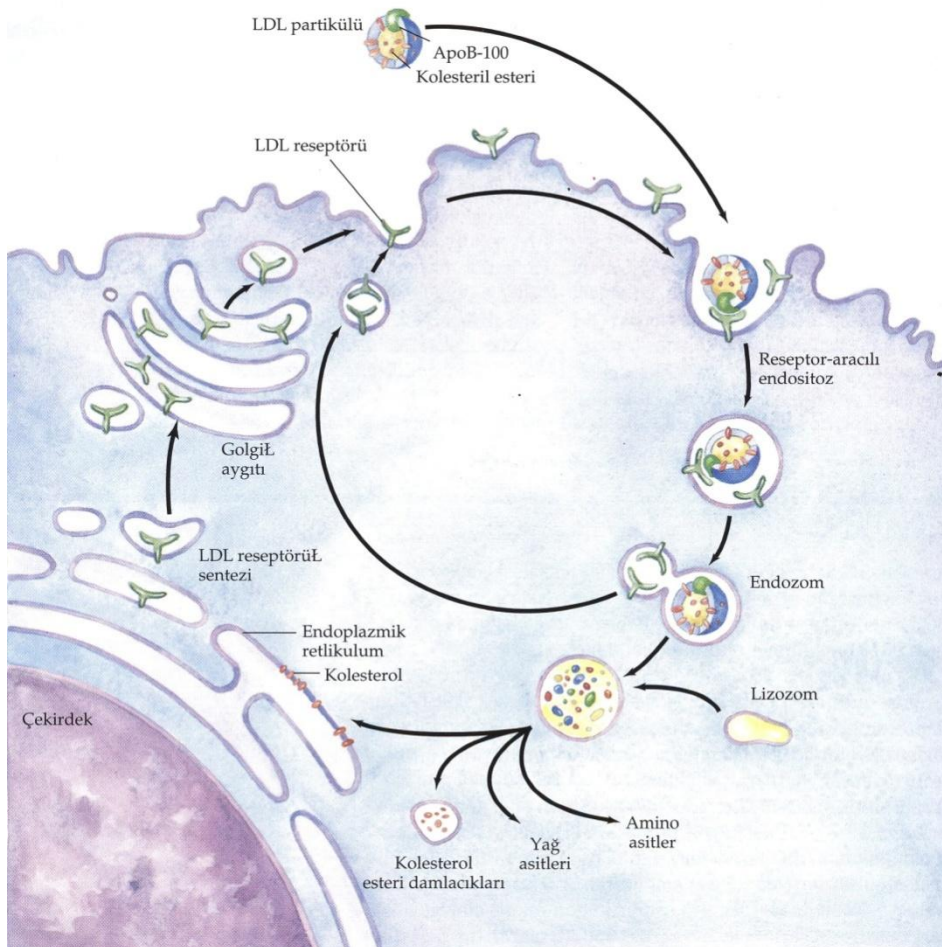


Şekil 1.12. LDL'nin elektron mikroskobu fotoğrafı (20-25 nm) (Nelson ve Cox 2005)

LDL' nin 2/3'ü karaciğer tarafından ve LDL reseptörleri ile tanınıp alınırken, 1/3'ü periferik hücreler tarafından alınırlar. İnsanda plazma LDL düzeyi ve karaciğer LDL reseptörü sayısı arasında ters bir orantı vardır. LDL reseptörü plazma kolesterol düzeylerinden sorumlu ana faktördür, bunun yanı sıra VLDL sentez hızı, LPL ve diğer lipazların aktiviteleri, VLDL reseptörü ve diğer metabolik olaylar LDL düzeylerini belirler. Doymuş yağdan ve kolesterolden zengin bir diyet LDL reseptörü sayısını azaltırken, kan LDL kolesterol düzeylerinin artmasına sebep olmaktadır (Hergenç 2005).

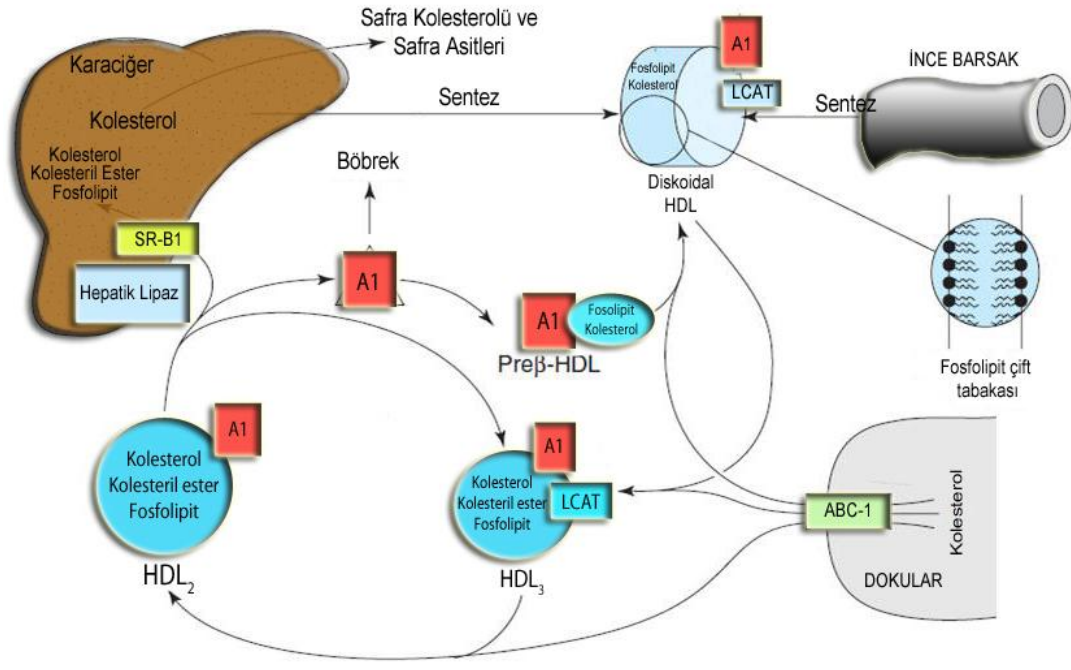
Yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL), vücuttaki dokulardan karaciğere kolesterol taşıyan bir lipoprotein sınıfıdır. HDL arterlerde oluşan ateromlardaki kolesterolu alıp vücuttan atılmak üzere karaciğere taşıdığı için bu lipoproteinde bulunan kolesterol

iyi kolesterol olarak anılır. HDL ayrıca bazı endokrin bezlerinde kolesterol sentezinin regülasyonunda da önemli bir rol oynar (Anderson ve Dietschy 1977). Başlıca apoA1 ve apoA2 proteinlerini içerirler (Despres 2009). Bu lipoproteinler karaciğerde sentezlendiğinde Şekil 1.14’de görüldüğü gibi diskoidal bir görünümündedir. Bu yeni oluşmuş tanecikler yakınından geçtikleri hücrelerin membranlarından kolesterol molekülleri absorblayabilirler. Bu durum serbest kolesterol bakımından zenginleşmiş apoA 1 fosfolipit disklerini meydana getirir. Plazmada bulunan Lesitin kolesterolaçil transferaz (LCAT) enzimi bu kolesterolu kolesteril estere dönüştürür ve bu şekilde HDL’nin çekirdeğini oluşturan kolesteril esterler oluşur. Daha fazla kolesterol esterleştikçe HDL diskleri önce küçük olgun HDL3 ve ardından süreç devam ettikçe HDL2 parçacıkları oluşur. Kolesterol ester transferaz proteini (CETP) kolesterol esterlerinin HDL’den VLDL ve LDL’ye geçişini kolaylaştırır dolayısıyla kolesterol esterlerinin bir kısmı LDL’ye geçmiş olur (Beşoluk 1999).



Şekil 1.13. LDL nin endositoz yoluyla hücreye alınması (Nelson ve Cox 2005)

HDL koroner arter hastalıklarında negatif risk faktörü olarak görülür ve anti aterojen lipoprotein olarak bilinir (Gordon ve ark. 1977). Yapılan çeşitli araştırmalar HDL seviyesinin artmasının koroner kalp hastalığı görülme olasılığının düşmesi ile doğru orantılı olduğunu göstermiştir (Toth 2005, Sirtori 2006).



Şekil 1.14. HDL metabolizması (Medchrome 2013'den modifiye edilmiştir)

1.1.3. Kolesterolün fonksiyonları

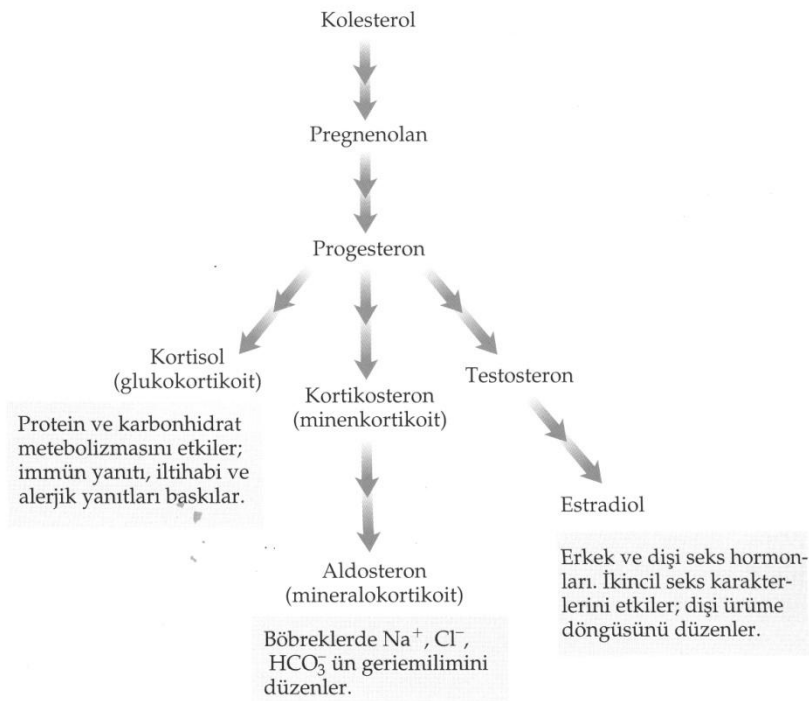
Vücut, günlük sentezlediği kolesterolün yaklaşık yarısını safra asidi üretiminde kullanır. İnsanlarda başlıca primer safra asitleri kolik ve kenodeoksikolik asittir (Champe ve Harvey 1994). Kolesterol karaciğerde en çok kolik asit sentezi için kullanılır. Kolik asitte diğer maddelerle birleşerek yağların sindirimi ve absorpsiyonunu hızlandıran safra tuzlarını oluşturur (Üyükü 2006).

İnsanlardaki tüm steroid hormonlar kolesterolden türetilir (Şekil 1.15). Steroid hormonların iki sınıfı adrenal bezin korteksinde sentezlenir. Bunlar böbrek tarafından inorganik iyonların geri emilimini kontrol eden mineralokortikoidler ve glukoneogenezin düzenlenmesine yardım eden iltihabi yanıtı azaltan

glukokortikoidlerdir. Seks hormonları erkeklik ve dişilik organlarında ve plesentada üretilir. Dişi üreme döngüsünü düzenleyen progesteron, erkeklerde ikincil seksüel karakterleri belirleyen androjen (örn. testesteron), dişilerde ikincil seksüel karakteri belirleyen östrojenler (örn. estradiol)'dir (Nelson ve Cox 2005).

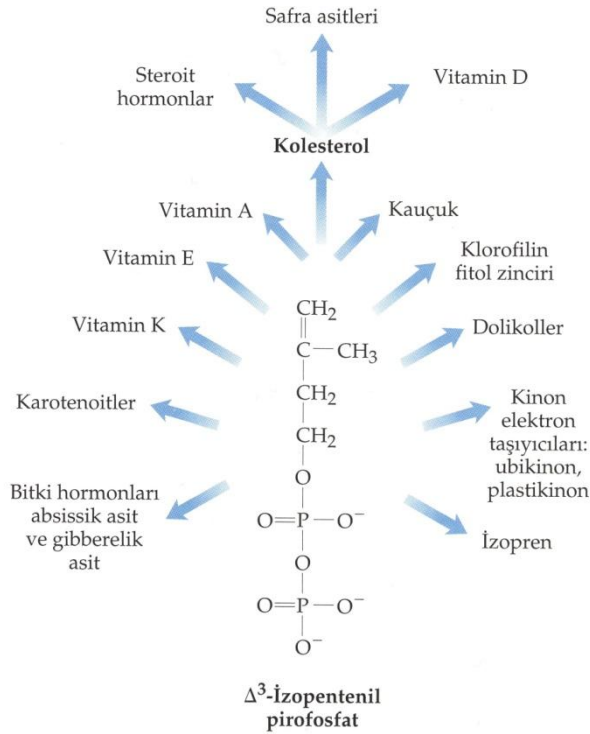
Kolesterolün belki de en önemli görevi bütün hücrelerin, hücre membranının yapısı ve fonksiyonu için çok önemli bir madde olmasıdır. Vücuttaki kolesterolün yaklaşık %93'ünün hücrelerde olup sadece %7'sinin plazmada olması da buna en iyi kanıttır (Russell 1992).

Kolesterol sentezinde ortaya çıkan ara ürünler birçok farklı amaç için canlı sistemler tarafından kullanılmaktadır (Şekil 1.16). Örneğin izopentenilpirofosfat kolesterol sentezinde bir ara üründür buna ek olarak değişik görev yapan bazı biyomoleküllerin oluşumunda gereklidir. Bunların başlıcaları olan A, E ve K vitaminleri, klorofilin fitol zinciri ve karoten gibi bitki pigmentleri; doğal kauçuk, birçok esansiyel yağ, metamorfozu kontrol eden böcek juvenil hormonu, mitokondri ve kloroplastlarda elektron taşıyıcı olan ubikinon ve plastokinondur.



Şekil 1.15. Kolesterol tarafından türetilen steroid hormonlar (Nelson ve Cox 2005)

Bu moleküllere izoprenoit adı verilmektedir ve doğada yaklaşık olarak 20000'den fazla izoprenoit molekülü keşfedilmiştir (Nelson ve Cox 2005).



Şekil 1.16. İzopentenil pirofosfottan türetilen bileşikler (Nelson ve Cox 2005)

Mevalonat yolunda üretilen en önemli moleküller izoprenoid farnesil pirofosfat (FPP) ve geranilgeranil pirofosfattır (GGPP). Bu moleküller hücrel sinyal transdüksiyonu ve sitoskeleton bütünlüğünün korunması için gerekli birçok proteinin post translasyonel modifikasyonu için gereklidir. Kısaca FPP ve GGPP hücrel sinyal üretimi, gen ekspresyonu, hücre büyümesi, farklılaşması ve değişiminde görev almaktadırlar (Nelson ve Cox 2005).

1.1.4. Plazma kolesterol konsantrasyonunun düzenlenmesi

Plazma kolesterol konsantrasyonu endojen ve ekzojen kolesterol metabolizmasının dengesiyle kontrol edilir (Russell 1992, Witztum 1996). Endojen yolla kolesterol karaciğer tarafından sentez edilir ve kana verilir. Dolaşım ile ekstrahepatik dokulara taşınır. Ekzojen yolla ise besinlerle alınan kolesterol ince barsaklardan dolaşıma

geçer. Dolayısıyla her iki mekanizmadaki değişiklikler plazma kolesterol konsantrasyonunu etkiler.

Kolesterol sentezi karmaşık ve enerji gideri yüksek bir işlemdir, bu nedenle diyetle alınanı tamamlamak için sentezin düzenlenebilmesi yeteneği açıkça organizmaya bir avantaj sağlamaktadır. Memelilerde kolesterol üretimi, hücre içi kolesterol derişimi glukagon ve insülin hormonları tarafından kontrol edilmektedir. HMG KoA redüktaz hormonlar tarafından da kontrol edilir. İnsülin ve tiroid hormon uygulamasıyla HMG-CoA redüktaz enziminin aktivitesinin arttığı, buna karşılık glukokortikoidler ve glukagon uygulandığında ise aktivitenin düştüğü bilinmektedir. Kolesterol sentezi yolundaki hız sınırlayıcı basamak HMG KoA'nın mevalonata çevrilmesidir. Bu tepkimeyi katalizleyen enzim olan HMG KoA redüktazdır. Tanımlanmamış bir sterolün yüksek düzeyleri (kolesterol veya türevleri) enzimin hızlı yıkımını uyarır ve enzimin geninin transkripsiyonunu inhibe eder (Nelson ve Cox 2005).

Kolesterol sentezi vücutta bulunan kolesterol miktarına bağlı olarak gerçekleştirilir. Diyet yoluyla fazla kolesterol alınımı vücutta kolesterol sentezini net bir şekilde azaltır. Aynı şekilde dışarıdan kolesterol alım seviyesi azaltıldığında, kolesterolün hücrel sentezi artmaktadır. Kolesterol düzenleme mekanizmasının temeli sterol düzenleyici eleman bağlayıcı proteinleri (SREBP, sterol regulatory element-binding protein 1 and 2) tarafından endoplazmik retikulumda hücreler arası kolesterol seviyesinin algılanması yoluyla gerçekleşir (Espenshade ve Hughes 2007). SREBP'ler aktif olmadıkları durumlarda endoplazmik retikulumun zarlarında bağlı olurlar. Sterol seviyesinin düşük olduğu hücrelerde SREBP'ler enzimler aracılığıyla kesilir ve suda çözünür hale gelir ve bir N-terminal bölge, çekirdeğe taşınır. Bu etkinleşmiş SREBP'ler daha sonra spesifik sterol düzenleyici eleman DNA dizilerine bağlanarak, sterol sentezinde yer alan enzimlerin sentezini arttırır (Wang 1994, Gasic 1994). Bu yolla da kolesterol miktarı hücrel sentez yoluyla artmış olur.

Kolesterolün yüksek hücre içi derişimleri depolama için kolesterolün esterleşmesini arttıran açıl-KoA-kolesterol açıl transferazı (ACAT) aktifleştirir. Sonuç olarak yüksek hücre kolesterolü LDL reseptörünü kodlayan genin transkripsiyonunu azaltır,

reseptörün üretimi ve böylece kandan kolesterolün alınması azaltılmış olur (Nelson ve Cox 2005).

1.1.5. Plazma kolesterol konsantrasyonu ve etkileri

Düzenlenmemiş kolesterol üretimi ciddi hastalıklara neden olabilmektedir. Sentezlenen ve diyetle alınan kolesterolün toplamı safra tuzlarının, zırların ve steroidlerin sentezi için gerekenden fazla olduğu zaman, kolesterolün kan damarlarında patolojik birikimiyle aterosklerotik plaklar gelişir ve damarların tıkanmasıyla sonuçlanır. Koroner arterlerin tıkanması nedeniyle gelişen kalp yetmezliği endüstrileşmiş toplumlarda ölümün başlıca nedenidir. Ateroskleroz kanda kolesterolün yüksek düzeylerine ve özellikle LDL bağlı kolesterolün yüksek düzeyleriyle bağlantılıdır. HDL düzeyiyle arter hastalığı arasında negatif bir bağlantı söz konusudur (Nelson ve Cox 2005).

Plazma kolesterol seviyesinin yükselmesine hiperkolesterolemi (>200 mg/dL) denir. Primer ve sekonder olmak üzere ikiye ayrılır. Primer hiperkolesterolemi genetik temelli, hatalı apoprotein sentezi, reseptör eksikliği veya reseptör fonksiyonundaki hatalardan kaynaklanır. Örneğin, ailesel hiperkolesterolemi (tip 2A) LDL reseptör yetersizliği veya bozukluğunda ortaya çıkar (Rubin ve Farber 1999, Nabel 2003). Sekonder hiperkolesterolemi ise obezite, yüksek kalori alımı, diabetes mellitus, inaktivite ve sigara ile ilişkili görülmekte, yaşa ve cinsiyete bağlı olarak değişim göstermektedir (Kreisberg ve Oberman 2003).

1.2. Statinler

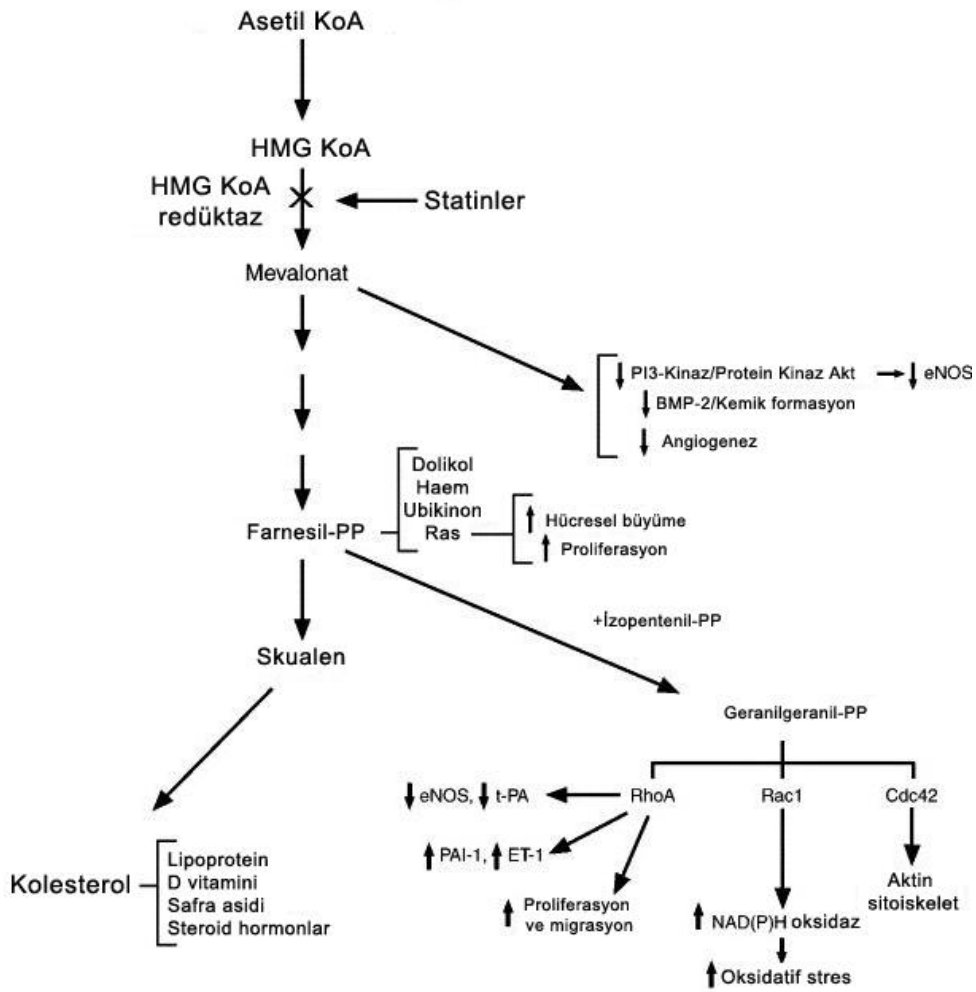
1970 yılında HMG-CoA redüktaz enziminin kolesterol sentezindeki öneminin anlaşılması üzerine Akira Endo adlı Japon bilim adamı bu enzimin inhibe edilmesiyle kolesterol sentezinin önemli ölçüde bloke edilebileceği hipotezi üzerine çalışmaya başlamıştır. Akira Endo “doğada bulunan bazı mikroorganizmaların, sterol veya diğer mevalonik asit türevleriyle beslenen diğer mikroorganizmalardan korunabilmek amacıyla HMG-CoA redüktaz inhibisyonu yapan metabolitler ürettiyor olmalı” fikri ile doğada bu özelliklere sahip canlı organizmaları test etmeye

başlamıştır. Yaklaşık 6000 mikroorganizmayı inceledikten sonra 1976 yılında *Penicilim citrinum* adlı mantar türünden izole ettiği ve mevastatin ismini verdiği maddenin HMG-CoA redüktazı inhibe ettiğini belirlemiştir (Endo 2004). Daha sonraları *Aspergillus terreus*'dan izole edilen lovastatin, ilk statin olarak patent almıştır. Lovastatin ve 1986 yılında kullanıma giren simvastatinle yapılan klinik çalışmalarda beş yıl gibi bir sürede statin kullanımının koroner kalp hastalığı morbidite ve mortalitesini anlamlı derecede azalttığının gösterilmesiyle birlikte statinler yoğun bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Pravastatin, fluvastatin, serivastatin gibi moleküller ardı ardına Amerika Birleşik Devletleri'nde FDA onayı alarak piyasaya verilmiştir. Kardiyovasküler morbidite ve mortalitede azalma sağlayan bu ilaçlar günümüzün vazgeçilmez ilaçları haline gelmiştir. Klinik çalışmaların düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterol için “ne kadar düşük, o kadar iyi” yönünde sonuçlar vermesi ve buna paralel olarak tedavi kılavuzlarında “LDL hedeflerinin giderek daha aşağı çekilmesi” bu hedeflere ulaşmada statinlerin önemini artırmıştır (Güleç 2007).

3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-KoA) redüktaz, insanda hepatic ve ekstrahepatik kolesterol biyosentezinde hız-kısıtlayıcı basamağı oluşturan HMG-KoA'nın mevalonata dönüşmesi olayını katalize eden bir enzimdir. Statinler, HMG-KoA redüktaz enziminin substratı olan HMG-KoA'ya ve onun yarı indirgenmiş metabolitine benzemektedirler. HMG KoA redüktaz enzimini kompetitif olarak inhibe ederler (Şekil 1.17). Bu şekilde hem karaciğer hücresi içinde kolesterol yapımını engellerler, hem de hücre yüzeyinde apoB/E (LDL reseptörü) reseptörlerinin ekspresyonuna yol açarak apoB ihtiva eden lipoproteinlerin tasfiyesini artırır. Bu şekilde başta aterojenik LDL olmak üzere apo-B içeren lipoproteinlerin karaciğer hücrelerine ve diğer hücrelere girişini ve orada yıkımını arttırmak suretiyle kanda LDL kolesterolü ve total kolesterol düzeyini düşürürler (Kayaalp 2005, Uyanık 2007).

Statin grubu ilaçlar vasıtasıyla kolesterol sentezi engellenerek karaciğer hücrelerindeki kolesterol ve lipoprotein düzeyi azaltılmaktadır. Bunun yanında bu uygulama ile hücre yüzeylerinde bulunan LDL reseptörlerinin sayısını da arttırmaktadır.

Mevcut lipid düşürücü ilaçlar arasında en güçlü LDL düşürücü ilaçlar olan statinler standart dozlarda LDL kolesterol düzeyinde %25-63, trigiliserit düzeylerinde %10-29 oranlarında azalma, yüksek dansiteli lipoprotein düzeylerinde %6-12 arasında artış sağladıkları çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Jones ve ark 1998, De Angelis 2004).



Şekil 1.17. Statinlerin HMG KoA redüktazı inhibe ettiği metabolik yol (Liao 2002)

Statinler elde edilişlerine göre doğal ve sentetik olmak üzere ikiye ayrılırlar. Bunlardan doğal olanlar; mevastatin, lovastatin, simvastatin, pravastatin sentetik olanlar ise serivastatin, fluvastatin, atorvastatin, rosuvastatin ve pitavastatindir (Alberts ve ark 1980, Davidson 2002, Dikeç 2006).

Statinlerin yarı ömürleri farklılık göstermektedir. Lovastatin, pravastatin, simvastatin ve fluvastatin gibi moleküllerin yarılanma ömrü 1-2 saat civarındayken atorvastatinin yarılanma ömrü 14 saattir (Shepherd 2001). Tüm statinler arasında en uzun yarılanma ömrü ise 19 saat ile rosuvastatine aittir (Warwick ve ark 2000). Kolesterol sentezi gece daha fazla olduğundan (Miettinen 1982) plazma yarı ömrü kısa olan statinler gece verildiklerinde daha fazla kolesterol düşüşü sağlarlar. Ancak yarı ömrü uzun olanlar (atorvastatin, rosuvastatin) sabah verildiklerinde de aynı derecede etkinlik gösterebilir (Jones ve ark 1998).

Statinler fizikokimyasal ve farmakokinetik özellikleri bakımından birbirlerinden farklılıklar gösterirler. Statinlerin farmakolojik etkilerini ve kronik kullanımla ortaya çıkabilecek yan etkilerini değerlendirebilmek için bu ilaçların farmakokinetik özelliklerinin bilinmesi önemlidir. Statinlerin farmakokinetik özellikleri Tablo 1.3'de verilmiştir.

1.2.1. Statinlerin pleotropik etkileri

Bir ilacın hedef etkisinin haricinde farklı sistemler üzerinde meydana getirdiği etkiye pleotropik etki denir. HMG KoA redüktaz inhibitörlerinin lipit düşürücü etkinliklerinin yanında bazı pleotropik özelliklerinin de olduğu bilinmektedir (Zhou ve Liao 2010). Bu pleotropik etkilerinin başında GTPazların prenilasyonunun inhibisyonu bulunmaktadır. GTPazlar birçok hücresel süreçte görev almaktadırlar (Liao ve Laufs 2005, Fritz 2009). Yüksek doz statinlerin antikanser ilaçlarının etkisini arttırdığı ve statin uygulamasıyla tümör hücrelerinin yıkımının da artmasına neden olduğu belirtilmiştir (Agarwal ve ark 1999, Cafforio ve ark 2005).

Yapılan çalışmalar hiperkolesterolemik hastalarda endotel bağımlı vazodilatasyonun (damar genişlemesi) statinlerle düzeldiğini göstermiştir. Endotel bağımlı vazodilatasyondaki düzelmenin, statinlere bağlı NO biyoyararlılığındaki artışla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Egashira ve ark 1994, Tan ve ark 2002).

Statinler trombosit membranının kolesterol içeriğini, dolayısıyla da membranın akışkanlığını değiştirerek agregasyonu (kümeleşme) azaltır. Statinlere bağlı bu etkinin lipit düşürücü etkiden daha kısa sürede meydana geldiği gösterilmiştir (Rosenson ve Tangney 1998, Koh 2000).

Tablo 1.3. Statinlerin farmakinetik özellikleri (De Angelis 2004, Schachter 2005, Shitara ve Sugiyama 2006, Uyanık 2007)

Özellik	Lovastatin	Pravastatin	Simvastatin	Fluvastatin	Atorvastatin	Rosuvastatin
Doz aralığı (mg/gün)	10-80	5-40	5-80	20-80	10-80	5-80
Klinikte sık kullanılan doz (mg/gün)	40	40	80	40	20	5-10
Eşit potent dozlar (mg/gün)	40	40	20	80	10	Belli Değil
Plazma LDL Düzeyinde Azalma (%) (40 mg/gün)	34	34	41	24	50	63
Plazma TG Düzeyinde Azalma (%) (40 mg/gün)	16	24	18	10	29	28
Plazma HDL Düzeyinde Artma (%) (40 mg/gün)	9	12	12	8	6	10
Absorpsiyon (%)	30	35	60-80	98	30	20
t _{max} (saat)	2-4	0,9-1,6	1,3-2,4	0,5-1,5	1,5-3	3
C _{max} (ng/ml) (min-max)	2,7-20	45-66	6,9-34	53-100	13-67	6,1-50
Biyoyararlanım (%)	<5	18	<5	10-35	12	20-75
Metabolizasyon	CYP3A4	SK	CYP3A4	CYP2C9	CYP3A4	CYP2C9
Hepatik Ekskresyon (%)	>70	46-66	78-87	>68	>70	63-90
Plazma Yarı Ömrü(saat)	2,5-3	0,8-3	1,9-3	0,5-2,3	11-30	20
Renal Eliminasyon (%)	10-30	20-60	13	6	<2	10
Feçesle Eliminasyon (%)	83	71	58-60	90	90	90

C_{max}: maksimum plazma konsantrasyonu; t_{max}: C_{max}'a ulaşmak için gereken süre; CYP Sitokrom P450, TG: trigliserit; SK: Sülfat Konjugatı.

Aterosklerozda olduğu gibi, kalp yetersizliği fizyopatolojisinde de enflamasyon ve endotel fonksiyon bozukluğu yer almaktadır. Statinlerin, deneysel veya küçük çaplı çalışmalarda kalp yetersizliği tedavisinde kullanılabileceği yönünde bazı bulgular elde edilmiştir (Eren 2009).

Statinlerin ayrıca immunsupresif durumunun (bağışıklık sistemi baskılanması) düzeltilmesi (Kobashigawa 1995), tümör baskılayıcı (Wong ve ark 2002), yüksek kan basıncını düşürücü (Glorioso ve Troffa 1999, Ferrier ve ark 2002), insülin rezistansını düzeltici (Paolisso ve ark 2000), ölümcül ve ölümcül olmayan inme oranlarını azaltıcı etkileri gösterilmiştir (Ridker ve ark 1998, Schwartz ve ark 2001).

Statinlerin faydalı etkileri Alzheimer hastalığı, multipl sklerozis ve kronik böbrek hastalığında da gösterilmiştir (Agarwal ve Curley 2005, Sparks ve ark 2005).

Mevcut bilgiler statinlerin periferik etkilerinin yanında, santral etkilerinin de olduğunu göstermektedir. Statinler bu etkilerini nöron yapısında değişimlere yol açarak ya da merkezi sinir sistemi faaliyetlerini düzenleyen nörotransmitter düzeylerini değiştirerek gerçekleştirmektedir (Erdoğmuş 2009).

Klinik çalışmalarda statin tedavisinde C-reaktif protein düzeylerinde azalma gözlemlenmiştir. C reaktif protein bağ dokusu hastalıklarında, kanser, enfeksiyon, tüberküloz gibi hastalıklarda yükselebilen bir proteindir (Kinlay ve ark 2002, Ansell ve ark 2003).

Statinlerin antikanser ilaçlarının anti tümör etkilerini arttırmasının yanı sıra doksorubisin ve iyonize radyasyonla muamele edilen primer insan endotelial hücrelerinin de ölümünü azalttığı gösterilmiştir (Damrot 2006, Nuebel 2006).

Onat ve ark (1990) yaptıkları çalışmayla lovastatinin kanda yüksek lipid düzeyini düşürmedeki etkinliğini araştırmışlardır. Bu alışma için hiperkolesterolemili 31 kişiye lovastatin verilmiştir. Bireylerde tedaviden önce alınan iki kan örneğinde düşük dansiteli lipoprotein kolesterolünün 150 mg/dL'den yüksek olması şartı aranmıştır. Lovastatin dozu kişilerin yalnız dördünde günde 40 mg'a, birinde de 60

mg'a yükseltilmiştir; diğerlerinde günde 20 mg ile yetinilmiştir. İlk iki ayı tamamlayan 28 kişide ortalama serum LDL kolesterolü konsantrasyonunun tedaviden önce ortalama 196,3 mg/dL'den, iki ay sonunda 143,6 mg/dL'ye (%27) ($p<0,001$), total kolesterol düzeyi de 282,6 mg/dL'den 225,3 mg/dL'ye (%20) ($p<0,001$) düştüğü tespit edilmiştir. HDL kolesterol değerlerinde tedavi süresince anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiş ve serum trigliseridleri ortalama %18'lik düşüş göstermiştir. Bunun yanında çalışmaya katılan bireylerde yan etki olarak dispepsi, bulantı ve uykusuzluğa rastlanılmıştır. Araştırma sonucunda araştırmacılar, primer hiperkolesterolemili kişilerde koroner riski azaltmak amacıyla kullanılan lovastatin'in LDL kolesterol ve total kolesterol düzeylerini etkin ve güvenli bir biçimde düşürebildiği, ilaca tahammülün ve uyumun iyi olduğunu belirtmişlerdir. Aytekin ve ark (1992) aynı şekilde 1 yıl süre ile lovastatin tedavisinde LDL seviyelerinde anlamlı düşüşler olduğunu belirtmişlerdir. Downs ve ark (1998) yaptıkları çalışmada lovastatinin kardiyovasküler mortalite üzerindeki etkisini yetersiz bulmuşlardır.

Statin grubu ilaçların diğer benzer grup ilaçlar ile kombinasyonu sonucunda ne tür etki göstereceği üzerine çalışmalar da mevcuttur. Pierce ve ark (1990) 12 olguda yaptıkları çalışmada Lovastatin ve diğer bir kolesterol ilacı olan gemfibrozili kombine ederek uygulamışlar ve tedavi sonucunda hastalarda ağır rabdomiyoliz gözlendiğini ve bu kombinasyonun iki ilacın rabdomiyoliz olasılığını arttırdığını bildirmişlerdir. Ayrıca, Tobert (1988) tarafından yapılan bir çalışmada 88 hastada yine kombinasyon şeklinde verilen lovastatin ve gemfibrozilin miyopati sıklığının, sadece lovastatin tedavisiyle verileden çok daha fazla olduğu kaydedilmiştir. Sadece lovastatin tedavisiyle bu oran %0,05 iken kombinasyon tedavisiyle %5'e kadar çıktığı belirlenmiştir. Daha sonra, serivastatin-gemfibrozil kombinasyonuna bağlı ortaya çıkan ölümcül rabdomiyoliz olguları serivastatinin piyasadan çekilmesine yol açmıştır (Streja 2004).

Martirosyan ve ark (2010) yaptıkları çalışmada lovastatinin ovaryum kanser hücrelerinde doz bağımlı olarak bu hücrelerin apoptozisine neden olduklarını belirtmişlerdir. Aynı çalışmada Komet metodu ile lovastatinin doxorubisinin neden olduğu DNA hasarlarını normal hücre hatlarında azalttığını belirtmişlerdir.

Muldoon ve ark (2000), deneklere uyguladıkları psikolojik testlerde, lovastatin alan grubun plasebo grubuna göre; mental fleksibilite, işlek bellek, ve hafızanın tekrar geri çağırılması gibi mental fonksiyonlarda daha düşük performans gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Huelsenbeck ve ark (2011) çalışmalarında antrasiklin türevi olan ve kanser tedavisinde kullanılan doxorubisin ile muamele edilmiş rat kardiyak dokularından izole edilen H9c2 hücre hatlarında lovastatinin etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmada doxorubisinin tek başına uygulanmasıyla apoptotik hücre frekansının arttırdığı tespit edilmiştir. 1 μ M doxorubisin ve 20 μ M lovastatin kombinasyonu ile yapılan uygulama ile lovastatinin H9c2 hücre hatlarını doxorubisine karşı koruduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmada lovastatinin doxorubisinin anti tümör aktivitesini arttırdığını da belirtmişlerdir ayrıca doxorubisin tedavisi gören hastalarda meydana gelebilen akut veya subakut kalp rahatsızlıklarının da yine lovastatin ile azaltılabileceği hipotezini ileri sürmüşlerdir. Snyder (2009) yaptığı çalışmada lovastatinin doxorubisinin genotoksik etkisini arttırdığını belirtmiştir.

İnsan cholangiokarsinoma hücrelerinde (HuCCT1 ve YSCCC), pitavastatin ve atorvastatin ile yapılan uygulamada ilaçların kanser hücrelerinde proliferasyonu baskıladığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada bu iki ilaç maddesinin bu kanser hücre hatlarında apoptozisi indükledikleri de belirtilmiştir (Kamigaki ve ark 2011).

İntraabdominal yapışıklık (adezyon) karın içi organların cerrahiye bağlı olarak ya da kemoterapi, radyasyon ve kanser nedeni ile oluşan fibröz bantlarla, kendi aralarında ya da karın duvarına yapışmalarıdır. Arslan (2009) çalışmasında lovastatinin postoperatif intraabdominal yapışıklıkları önlemede etkili olduğunu belirtmiştir. Çalışmada lovastatin uygulanan grupların kontrol grubuna göre yapışıklık bakımından belirgin bir şekilde farklılık gösterdiği kaydedilmiştir.

Kornbrust ve ark (1989) yaptıkları çalışmada lovastatinin prelinik güvenlik değerlendirmesi esnasında, oral dozların köpekler tarafından tolere edildiği, ratlarda ve farelerde ise tavşanlara uygulanan dozlara göre lethal etkiye sebep olduğunu

belirtmişlerdir. Tavşanlardaki postmortem (ölüm sonrası) bulgularda hepatik nekroz, renal tübüler nekroz ve seyrek olarak da safra kesesi nekrozları rapor edilmiştir. Ayrıca besin alımında azalma ve kilo kaybıyla birlikte organlarda hasar oluştuğunu da tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada araştırmacılar tüm histopatolojik olgularda ve serum biyokimyasında meydana gelen değişimlerin lovastatin tarafından indüklendiğini belirtmişlerdir.

Vural ve Tuğlu (2011) nöroblastoma NB2a hücre hatlarında lovastatin, mevastatin ve atorvastatinin nörotoksik etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar çalışmalarında lovastatinin 3 µM konsantrasyonda istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde hücre canlılıkları üzerine toksik etkisinin olduğunu belirtmişlerdir. Diğer iki statinin de 10 µM ve üstü dozlarda aynı toksik etkiye sebep olduklarını tespit etmişlerdir.

Aydın ve ark (2009) metabolik sendrom patogenezinde inflamasyonun (yangı veya iltihaplanma) önemli rol oynayabileceğini ve fluvastatin tedavisi ile bu etkinin kontrol altına alınabileceğini belirtmişlerdir.

Bir diğer statin grubu ilaç olan simvastatin ile yapılan çalışmada Onat ve ark (2000) Hiperlipidemili Türk erişkinlerinin düşük doz simvastatin'e batılı hastalardan daha fazla duyarlı olup olmadığını araştırmak amacıyla çok merkezli bir çalışma yapmışlardır. 52'si kadın olmak üzere, toplam 86 kişinin (54 ± 9 yaş) dahil edildiği çalışma sonucunda araştırmacılar, Türk erişkinlerinde 10 mg simvastatin ile sağlanan LDL kolesterol cevabının, 4S (SSSS 1994) çalışmasında yaklaşık 17 mg simvastatin dozu ile elde edilen LDL kolesterol düşüklüğüne karşılık geldiği hesaplamışlardır.

Gliemroth ve ark (2003) yaptıkları çalışmada simvastatin terapisinin beyin tümörlü hastalarda tümörünün büyümesini ve migrasyonunu inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Habeos ve ark (2008) ise ratlarda simvastatinin antioksidan aktivitesini araştırmış ve sonuç olarak da simvastatin uygulamasının oksidatif stresle oluşabilecek hücre hasarlarını önleyebileceğini belirtmişlerdir.

Smith-Lemli-Opitz (SLO) sendromu otozomal resesif geçişli, çok sayıda doğuştan malformasyonun gözleendiği nadir görülen bir sendromdur. Smith-Lemli-Opitz

sendromlu olgularda kolesterol biyosentezinin son basamağında 7-dehidrokolesterolü (7DHK) kolesterole çeviren ve geni 11q13'te lokalize bir enzim olan 7DHK redüktazın doğuştan eksikliği söz konusudur (Cormier-Daire ve ark 1996, Nowaczyk ve ark 2004). Bu durumla ilgili olarak SLO sendromlu hastalarda simvastatin kullanılmasının çok zararlı olacağı belirtilmektedir (Starck ve ark 2002).

Orsi ve ark (2001) simvastatin alan bir kişide ilerleyici bir şekilde gelişen hafıza kaybının oluştuğunu, ilacın kesilmesi ile bu etkinin ortadan kalktığını rapor etmişlerdir. Wagstaff ve ark (2003) yaptığı çalışmada da simvastatin kullanan 60 kişide hafıza kaybının oluştuğunu vaka raporlarında bildirmişlerdir. Benzer şekilde simvastatin kullanımına bağlı olarak depresyon, anksiyete düzeyinde artış ve intihar eğilimi gibi psikiyatrik semptomlar görüldüğü belirtilmiştir (Duits ve Bos 1993, Wang ve ark 2006). Simvastatinin etkilediği nörotransmitter sistemlerin depresyon ve anksiyetenin oluşumunda görev aldıkları bilinmektedir. Bu ilişkinin varlığı simvastatinin anksiyete düzeyini değiştirebileceğini düşündürmektedir (Erdoğan 2009).

Dolaşım sistemi açısından nitrik oksit (NO)'in vazodilatör (damar genişletici) etki gösterdiği, bölgesel kan akımını ve sistemik kan basıncını düzenlediği, endotele yönelik olarak da ateroskleroza önleyici etki yaptığı bilinmektedir (Dusting 1996). McGirt ve ark (2002) fareler üzerinde yaptıkları çalışmada, simvastatin uygulamasının beyinde endotel kaynaklı nitrik oksit sentaz (eNOS) miktarını arttırdığını açıklamışlardır.

Mills ve ark (2008) tarafından yapılan meta-analiz kapsamındaki atorvastatin, lovastatin, pravastatin ve fluvastatin ile yapılmış olan çalışmalarda tüm nedenlere bağlı mortalitede %7, kardiyovasküler mortalitede %11, majör kardiyovasküler olaylarda %15, miyokard infarktüsü sıklığında %23 görece risk azalması saptamışlardır. Bu çalışma kapsamında düşük riskli olguların da bulunduğu ve bu grubun statin tedavisinden gördüğü yararın sınırlı olduğu belirtilmiştir.

Fujieda ve ark (2011) kanser tedavisinde kullanılan ve böbrek hasarına neden olan cisplatinin, pravastatin ile kombine edildiğinde böbrek hasarlarının azaltılıp

azaltılamayacağını araştırmışlardır. Araştırma sonucunda pravastatinin kısmen de olsa renal hasarı azalttığını belirtmiştir. Bu çalışmayı destekler nitelikte olan ve benzer sonuçların bildirildiği çalışmalar mevcuttur (Jorge ve ark 1994, An ve ark 2011).

Pravastatinin KKH olan bireylerdeki dentrik hücreler (antijen sunucu, T hücresi aktivasyonu, patojen fagositesi) üzerine olan etkileri araştırılmış ve pravastatinin bu hasta bireylerde dentrik hücre aktivasyonunu azalttığı belirtilmiştir (Li ve ark 2009).

Abe ve ark (2005) fluvastatinin endotelial NO aktivitesinde rol aldığını ve NO gibi vücut için önemli bir molekülün sentezinin artmasına neden olduğunu belirtmiştir. John ve ark (1998) yaptıkları çalışmada hiperkolesterolemik hastalarda fluvastatinin endotel disfonksiyonunu önlediğini belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada ise fluvastatinin dolaylı da olsa koroner endotelial hücrelerde faydalı bir etkisinin olduğu belirtilmiştir (Sieberlink ve Boven 1998).

Vasküler düz kas hücrelerinin damar içerisine doğru hareketleri ve daha fazla proliferasyonu aterosklerotik lezyonların oluşmasındaki erken evredir (Ip 1990, Ross 1999). Corsini ve ark (1995, 1996) fluvastatinin rat aort düz kas hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiklerini belirlemişlerdir. Aynı çalışmalarda insan femur arter myositlerinde de *in vitro* olarak bu kas hücrelerinin proliferasyonunun fluvastatin tarafından engellendiği bildirilmektedir.

İtalya bölgeler arası farmakoloji grubu'nun verilerine dayanarak Conforti ve ark (2006) yapmış olduğu çalışmada statin kullanan hastalarda hepatit riskinin nadir de olsa oluşabileceğini ve fluvastatinin hepatite beklenmedik derecede neden olduğunu ve hepatoksisitesinin diğer statinlere göre daha fazla olduğunu belirtmişlerdir.

Viola ve ark (2010)'nın yaptığı çalışmada fluvastatinin fototoksik bir özelliğinin olabileceğinden bahsetmiştir.

Fluvastatinin antiviral etkisini de Bader ve ark (2008) 31 hasta ile yaptıkları çalışmada göstermişlerdir. Bu çalışmada fluvastatinin Hepatit C ye karşı antiviral bir aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Fluvastatin ile ilgili olarak yapılan mutajenite ve karsinojenite testlerinde Robinson ve ark (1994) fluvastatinin genotoksik potansiyelini araştırmışlardır. *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, Çin hamster hücrelerinde gen mutasyonları, kromozomal anormallikler, Rat hepatositlerinde DNA hasar düzenlemesi, *in vivo* fare kemik iliğinde klastojenik/anojenik ve sitogenetik analizlerini yapmışlardır. Bahsi geçen tüm bu test yöntemlerinde fluvastatinin herhangi bir genotoksik ve karsinojenik etkisinin olmadığı belirtilmiştir.

Hamit (2008), endotel fonksiyon bozukluğu saptanan behçet hastalarında atorvastatin ve lisinopril tedavisinin endotel fonksiyon bozukluğu üzerine belirgin düzeltici etkisinin olduğunu belirtmektedir.

Uysal (2008) çalışmasında atorvastatinin lipid parametreleri üzerine olumlu etkilerinin yanında bu etkilerinden bağımsız olarak trombosit sayısını azalttığını, antitrombotik, inflamatuvar belirteçleri azaltarak anti-inflamatuvar etkinlik sağlayarak ateroskleroz üzerinde olumlu etkisinin olabileceğini belirtmiştir.

Tibiasında kırık oluşturulan ratlarla yapılan bir çalışmada yüksek doz atorvastatinin ratlara verilmesi ile kırık iyileşmesinin radyolojik olarak hızlandığını, biyomekanik ve histopatolojik olarak herhangi bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir (Aydın 2009).

Ciaravino ve ark (1995) yaptıkları çalışmada atorvastatinin genotoksik değerlendirmesini birçok test yöntemi kullanarak belirlemeye çalışmışlardır. Bakteriyel mutajenik testlerde *E. coli*, *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535 ve TA1538 suşları kullanılmıştır. Çalışma sonucunda atorvastatinin her iki mikroorganizma grubu için mutajenik bir etki göstermediğini açıklamıştır. Yine aynı çalışmada Çin hamster karaciğer V79 hücre kültürleri atorvastatinin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılarak S9-, S9+ ve kromozomal anormallikler bakımından değerlendirilmiştir. Bunun yanında *in vivo* fare kemik iliği hücrelerinde

mikronükleus testi de uygulanmıştır. Bu testlerin hiç birinde atorvastatinin mutajenik ya da klastojenik bir etki göstermediği belirtilmiştir.

Ajith ve Soja (2006) çalışmalarında atorvastatin ve lovastatinin antimutajenik aktivitelerini incelemişlerdir. Çalışmada Ames *S. typhimurium* test yöntemi kullanılmış ve aktif mutajen olan sodyum azit (NaN_3) ve 4-nitro-o-fenilenediamin (NPDA) *Salmonella*'da mutasyonu indüklemek amacı ile uygulanmıştır. Araştırma sonucunda atorvastatin ve lovastatinin bu iki madde için antimutajenik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Diğer yandan atorvastatin lovastatine göre daha düşük konsantrasyonda antimutajenik aktivite göstermiştir.

Atorvastatin ile yapılan ve herhangi bir toksik etkinin gözlemlenmediği çalışmaların yanında bazı toksik etkilerin belirlendiği çalışmalarda mevcuttur. Dostal ve ark (1994) hamile ratlarda ve tavşanlarda yaptıkları çalışmada atorvastatinin gelişim toksikolojisini çalışmışlardır. İncelenen parametreler dış görünüş, iç organların yapısı, hacmi (visceral) ve iskelet malformasyonları olarak belirlenmiştir. Çalışmada atorvastatinin 300 mg/kg dozda ratlarda bu belirtilen parametreler açısından toksik bir etkiye neden olduğu görülmüştür, tavşanlarda ise bu toksik etkiler 50 mg/kg'lık dozda gözlemlenmiştir. Ratlara uygulanan 300 mg/kg'lık dozda 1 rat ölmüştür. Tavşanlarda ise 100 mg/kg'lık dozda 7 ölüm, 50 mg/kg'lık dozda da 2 ölüm gözlenmiştir. Atorvastatinin bu toksik etkileri sadece ebeveynlerde gözlemlenmiş olup istatistiksel olarak anlamlı bir teratojenik etki oluşmamıştır.

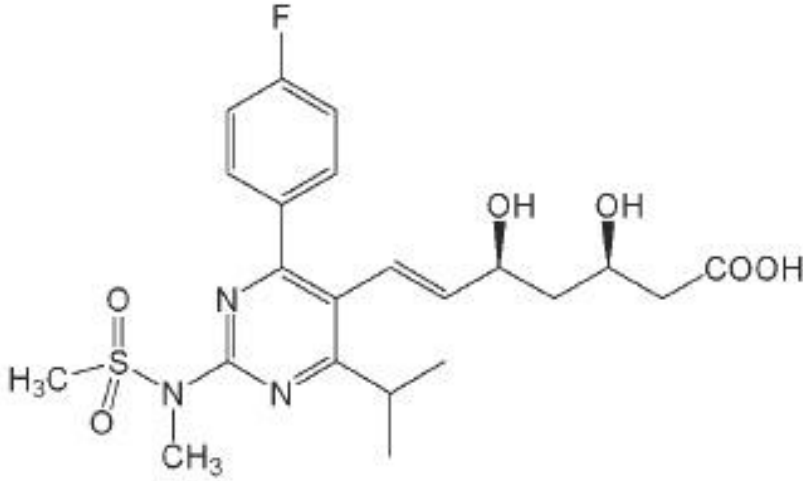
Serivastatin de kolesterol seviyesinin düşürülmesi için kullanılan sentetik statin grubu ilaçlardandır. 1990'lı yıllarda piyasaya sürülen serivastatin yüksek toksisite nedeniyle 2001 yılında piyasadan çekilmiştir. Pazarlama sonrasında serivastatin kullanan ve çoğunlukla rabdomiyoliz ve renal bozukluklar yüzünden 52 kişinin öldüğü belirtilmiştir (Furberg ve Pitt 2001). Ayrıca 385 kişide ölüme sebep olmamış rabdomiyoliz rapor edilmiştir (Psaty ve ark 2004). Serivastatinin neden olduğu ölümcül rabdomiyolizin frekansı diğer statinlere göre 16-80 kat daha fazla olarak tespit edilmiştir (Zeitlinger ve Müller 2003).

1.2.2. Rosuvastatin

Rosuvastatin diğer statinler gibi HMG KoA redüktaz enziminini inhibe eden bir sisteme sahiptir (Nissen ve ark 2006). Yarılanma ömrü 19 saat olan rosuvastatinin ağız yoluyla alınmasıyla plazma doruk konsantrasyonuna 3-5 saatte ulaştığı bilinmektedir (FDA 2010). Moleküler formülü Şekil 1.18’de verilmiş olan rosuvastatinin moleküler ağırlığı 1001,14 gr/mol, kimyasal adı bis[(E)-7-[4-(4-florofenil)-6-izopropil-2-[metil(metilsülfonil)amino]Pirimidin-5-yl](3R,5S)-3,5dihidr oksi ept-6-enoik asit]’ dir ve empirik formülü $(C_{22}H_{27}FN_3O_6S)_2Ca$ ’dır.

Statinlerin piyasaya sürülmesinden bugüne kadar tedavi amaçlı verildikleri hastalarda karaciğer enzimlerinde belirli bir artışın meydana geldiği bilinmektedir (özellikle alanin, aspartat transaminaz) (Grundy 1988). Rosuvastatinin karaciğer toksisitesinde artışlar meydana getirmesiyle ilgili yapılan çalışmalarda rosuvastatinin; paravastatin ve simvastatin gibi statinlere göre karaciğere daha fazla disturb olduğunu ve daha seçicici davrandığını (Nezasa ve ark 2002) ve böylece diğer statinlere göre farmakolojik olarak daha etkili bir ilaç olduğunu belirtmişlerdir (McTaggart ve ark 2001, Paoletti ve ark 2001). Ayrıca toksikolojik etkisinin de diğer statin gruplarına göre daha az olduğu belirtilmiştir (Olsson ve ark 2001).

Rosuvastatin çok fazla metabolize olabilen bir ilaç değildir bu nedenle bazı lipid düşürücü tedaviler gibi karaciğerin biyokimyasal fonksiyonlarında anormallikler meydana getirdiği bulunmuştur (FDA 2005). Famularo ve ark (2007) yaptıkları çalışma ile tedavi amaçlı normal dozlarda bile, hastalara verilen rosuvastatinin karaciğer toksisitesinde klinik olarak anlamlı artışlar meydana getirdiğini tespit etmişlerdir.



Şekil 1.18. Rosuvastatinin moleküler formülü (MacDonald ve Halleck 2004)

Birçok ilacı metabolize eden, karsinojenleri substrat olarak kullanabilen P450 (CYP) enzim grubunun en önemli enzimi P450 3A4 (CYP3A4) enzimidir (Bozina ve ark 2009). Rosuvastatinin P450 3A4 (CYP3A4) tarafından metabolize olmadığı (FDA 2005), esas itibariyle CYP2C9 tarafından metabolize olduğu bildirilmiştir (Olsson ve ark 2002). FDA yine bu etken maddeye sahip ilaçların kullanımında kas hasarının (rhabdomyolysis) meydana geldiğini açıklamış ve diğer statin grubu ilaçların yanı sıra rosuvastatini kullanan hastalarda çeşitli böbrek rahatsızlıklarının da görüldüğünü belirtmiştir (FDA 2011). Diğer yandan Sattar ve ark (2010) yaptıkları çalışma ile statin terapisi olarak verilen rosuvastatinin diyabete yönelik çok az da olsa artışa neden olduğunu göstermişlerdir.

Çin hamsteri akciğer hücrelerinde rosuvastatinin mutajenik ve klastojenik etkisi incelenmiş ve kromozomal anormallik testlerinde bu ilacın herhangi bir mutajenik ve klastojenik etkiye sahip olmadığı belirtilmiştir. Farelerle yapılan *in vivo* mikronükleus testlerinde de negatif sonuçlar alındığı belirtilmiştir (FDA 2005). Doktorlara yönelik hazırlanan referans kitabında (PDR 2005) rosuvastatinin iki bakteriyel mutasyon testinde negatif olduğu, *in vitro* sitogenetik çalışmalarda da negatif sonuçlar alındığı, fare lenfoma L5871Y hücreleri ile yapılan araştırmada gen mutasyonlarına rastlanmadığı, *in vivo* sitogenetik çalışmada da sonucun negatif olduğu belirtilmiştir.

FDA (2007) raporlarına göre statin grubu ilaçlardan biri olan atorvastatinin genotoksik etkisinin negatif olduğu belirtilirken, Gajski ve Garaj-Vrhovac (2008) yaptıkları bir çalışmada atorvastatinin genotoksik aktivitesini belirlemek için *in vitro* Komet assay, Kromozom anormalliği (KA), kardeş kromozom değişimi (KKD) tekniği kullanarak insan lenfositlerinde genotoksik aktivitesini incelemiş ve atorvastatinin farklı uygulama zamanlarına göre KA dışındaki diğer testlerde (Komet ve KKD) istatistiksel olarak anlamlı artışlara neden olduğunu tespit etmişlerdir.

İlaç araştırması ve geliştirmesi ile uğraşan ilaç endüstrisi kuruluşlarında, akademik kuruluşlarda yeni tedavi yaklaşımı sayılacak yeni ilaçlar bulmak için devamlı çalışmalar yapılmaktadır. Tüm ilaçlar, temizlik, kozmetik maddeleri, pestisitler, gıda katkı maddeleri ve sanayi amaçlı üretilen ve maruz kalabileceği kimyasal maddeler, kullanıma sunulmadan önce toksik potansiyelleri yönünden değerlendirilirler. Bu maddelerin kullanım amaçları, maruziyet yolları ve süreleri göz önüne alınarak toksisite testleri dizayn edilir. Muhtemel toksik etkiler *in vivo* koşullarda deney hayvanlarında veya *in vitro* koşullarda hücre kültürlerinde araştırılır. Bahsedildiği üzere bir ilacın kullanıma sunulmadan önce, ulusal ve uluslararası birçok kuruluşun onayından geçmesi gerekmektedir. İlaçların kullanım izinlerinin verilmesinde ilk basamak, kullanıma sunulacak olan kimyasalın deney hayvanlarında hangi miktarlarda hangi etkileri göstereceğinin saptanmasıdır. Bu amaçla genellikle fare, rat, kobay gibi deney hayvanları kullanılmaktadır. Kimyasalın etkisini belirlemek amacıyla öncelikle bu maddenin yüksek konsantrasyonlar da dahil olmak üzere çeşitli dozları oral, intraperitoneal veya buna benzer yollarla deneklere verilerek muhtemel tüm toksik etkileri araştırılır. Tüm toksisite testlerinde bir kimyasal madde için ortalama 3000 civarında deney hayvanı kullanılır. Bu testler uluslararası kuruluşların belirlediği iyi laboratuvar uygulamaları (GLP) kurallarına göre çalışan laboratuvarlarda yapılır (Saygı 2003, Sarıkaya 2005, Yılmaz 2008). Çalışmalarda kullanılan testler aşağıda özetlenmiştir.

Toksikokinetik çalışmalarda incelenen katkı maddesinin organizmada emilimi, dağılımı, biyotransformasyonu ve atılımı incelenir.

Akut toksisite testinde en az üç doz ve tek seferde uygulanan ve 1, 2, 24, 48, 72 ve 96 saat gibi kısa süreler içinde uygulanan testlerdir.

Subakut toksisite testinde kimyasal madde deney hayvanlarına her gün bir veya daha fazla tekrarlanan şekilde verilir. Test süresi 1-3 haftadır.

Subkronik toksisite testinde sıçan ve köpek gibi deney hayvanları kullanılır ve bu testte her gün bir veya daha fazla tekrarlanan şekilde dozlar genellikle 3 ay süre ile uygulanır.

Kronik toksisite testi deney hayvanlarının yaşam sürelerinin önemli bir bölümünü kapsayacak kadar uzun süreli günlük veya sık dozlar şeklinde bir ksenobiyotiğin verilmesiyle yapılan çalışmalardır. Bu testin süresi test edilen maddenin kullanım amacına ve kullanılan hayvanın türüne göre değişiklik göstermektedir. Örneğin bu süre sıçanlarda yaklaşık 2 yıl, köpeklerde ise 5-7 yıl kadar olabilir.

Mutajenik etki DNA üzerinde kalıcı değişikliklerin incelenmesidir.

Karsinojenik etki kanser yapıcı etkinin değerlendirilmesidir.

Teratojenik etki sakat yavru doğumlarına yol açan etkidir.

Transplasental karsinojenik etki gebenin yavrusunda doğumdan yıllar sonra kanser oluşumudur.

İmmünotoksik etki immün sistem üzerinde toksik etkidir.

Fertilite testi üreme yeteneği üzerine etkidir.

Nörotoksik etki sinir sistemi üzerine toksik etkidir.

Toksisite test sonuçları uluslararası/ulusal kuruluşlarca oluşturulan bilimsel komitelerce değerlendirilerek güvenli kullanım için gerekli sayısal değerlere ulaşılır

(Sarıkaya, 2005). Çalışmalar sonunda kullanılan maddenin hiçbir etkisinin bulunmadığı bir doz elde edilmezse, bu maddenin kullanımına izin verilmez. Eğer deney hayvanına hiçbir etki göstermeyen bir doz elde edilirse, bu doz etkisiz doz veya NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) olarak tanımlanır (Yılmaz 2008).

Ekonomik İş Birliği ve Kalkınma Örgütü (OECD) tarafından pazarlama öncesi yapılacak minimum testler belirlenmiştir. Bu rapora göre pazarlama öncesi yapılması gereken toksisite testleri akut ve mutajenite testleri olmak üzere ikiye ayrılır. Akut testler içerisinde; akut oral toksisite, akut dermal toksisite, akut inhalasyon toksisitesi, akut dermal korozyonu, akut göz iritasyonu, deri duyarlılığı ve tekrarlı doz toksisitesi testleri uygulanır. Mutajenite testleri için de Ames test (*S. Typhimurium* ve *E. coli* WP₂), *in vitro* memeli sitogenetik testi (KA), *in vivo* memeli kemik iliği testi (KA) ve mikronükleus testleri olarak belirlenmiştir (Kurtz ve Cohen 1981).

Günümüzde, başta insan olmak üzere bütün canlılar çeşitli kimyasal ve radyoaktif maddelere farklı doz ve sürelerde maruz kalmaktadırlar. Tedavi amaçlı olarak insanlar daha fazla kimyasal ilaç ve maddeler ile bu maruziyeti her geçen gün arttırmaktadır. Bu tür maruziyetlerin insanlar üzerinde herhangi bir anormalliğe yol açıp açmadığının anlaşılabilmesi için çeşitli test metotları geliştirilmiştir. Kısa süreli mutajenite ve kanserojenite testleri olarak bilinen bu metotlar bir kimyasal ya da etken maddenin potansiyel olarak mutajen ya da kanserojen olup olmadığının belirlenmesinde kullanılmaktadırlar. Bu test metotlarının başında bakteriyel mutajenite testleri gelmektedir. Çabuk bölünebilen ve kısa sürede büyük sayılara ulaşabilen tek hücreli bakteriler, özellikle gen mutasyonlarının tespiti için yaygın olarak kullanılmaktadırlar. En iyi bilinen bakteriyel mutajenite testi Ames testidir. (Loprieno ve ark 1983, Zimmermann ve ark 1984, Aksoy 2006).

Çeşitli etkenlerin kromozom seviyesinde her hangi bir anormalliğe neden olup olmadığının anlaşılması için yapılan test metotlarından birisi de bahsedildiği gibi *in vitro* test sistemleridir. Bu sistemde araştırmanın amacına bağlı olarak değişmekle birlikte, fare, sıçan veya tavşan gibi çeşitli memeli hayvanlardan elde edilen sperm, fibroblast, kemik iliği ya da periferal kan hücrelerinin yanı sıra insan periferal

lenfositleri de sıklıkla kullanılmaktadır. Bu test sisteminin deney materyalini genellikle insan kaynaklı hücreler oluşturmaktadır. Çünkü herhangi bir çevresel faktörün insan hücrelerinde ne tür zararlara yol açabileceği yönünde fikir edinilmesi için insana da herhangi bir zararı olmayan bu test sistemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu test sisteminde de, besi ortamlarında üretilen periferal kan gibi çeşitli hücrelerde, etken maddenin mikronukleus (MN), kromozom anormallikleri (KA) ve kardeş kromatidlerde değişimleri (KKD) gibi çeşitli anormallikleri oluşturup oluşturmadığı kontrol edilmektedir.

In vivo genotoksisite testleri çoğunlukla, *Drosophila* cinsi böceklerde ve fare, sıçan ve kobay gibi memelilerde uygulanmaktadır. Bunların yanında daha üst grup memelilerde de denemeler yapılmaktadır. Memelilerin kullanıldığı en bilinen *in vivo* mutajenite testi dominant lethalite testidir. Diğer yandan kromozomlarda meydana gelebilecek yapısal değişimlerin incelenmesi için kemik iliği hücrelerinde MN, KA ve KKD incelenmesi yapılmaktadır (Aksoy 2006).

Yapılan literatür taraması sonucunda rosuvastatinin genotoksisitesi üzerine kapsamlı çalışmalar yapılmadığı ve yapılan çalışmaların genelde pazarlama öncesine ait olduğu görülmektedir. Diğer çalışmalar ise genotoksisite dışında kalan araştırmalardır. Bu araştırmaların sonuçları rosuvastatinin insanlarda kötü kolesterol olarak adlandırılan LDL seviyesini düşürme etkisinin yanında bazı olumsuz etkilerinin de olduğunu göstermiştir. Araştırmacıların bir kısmı bu ilacın yan etkilerinin önemsenmesi gerektiğini vurgularken bir kısmı herhangi bir zararı olmadığını ve pleotropik olarak çok faydalı bir madde olduğunu savunmaktadır. Yukarıda belirtildiği üzere rosuvastatin üzerine yapılan araştırmaların yetersiz olduğu görülmekte ve özellikle de genetik etkilerinin değişik organizmalarda, değişik test metotları ile araştırılmasının, bu ilacın etkileri hakkında daha da aydınlatıcı sonuçlar verebileceği düşünülmektedir. Rosuvastatinin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılan bu araştırmada sağlıklı bireylerden alınan periferal kanlarda *in vitro* yöntemler (KA, MN, KOMET) kullanarak genotoksik bir etkiye neden olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır.

BÖLÜM 2. MATERYAL ve METOD

2.1. Materyal

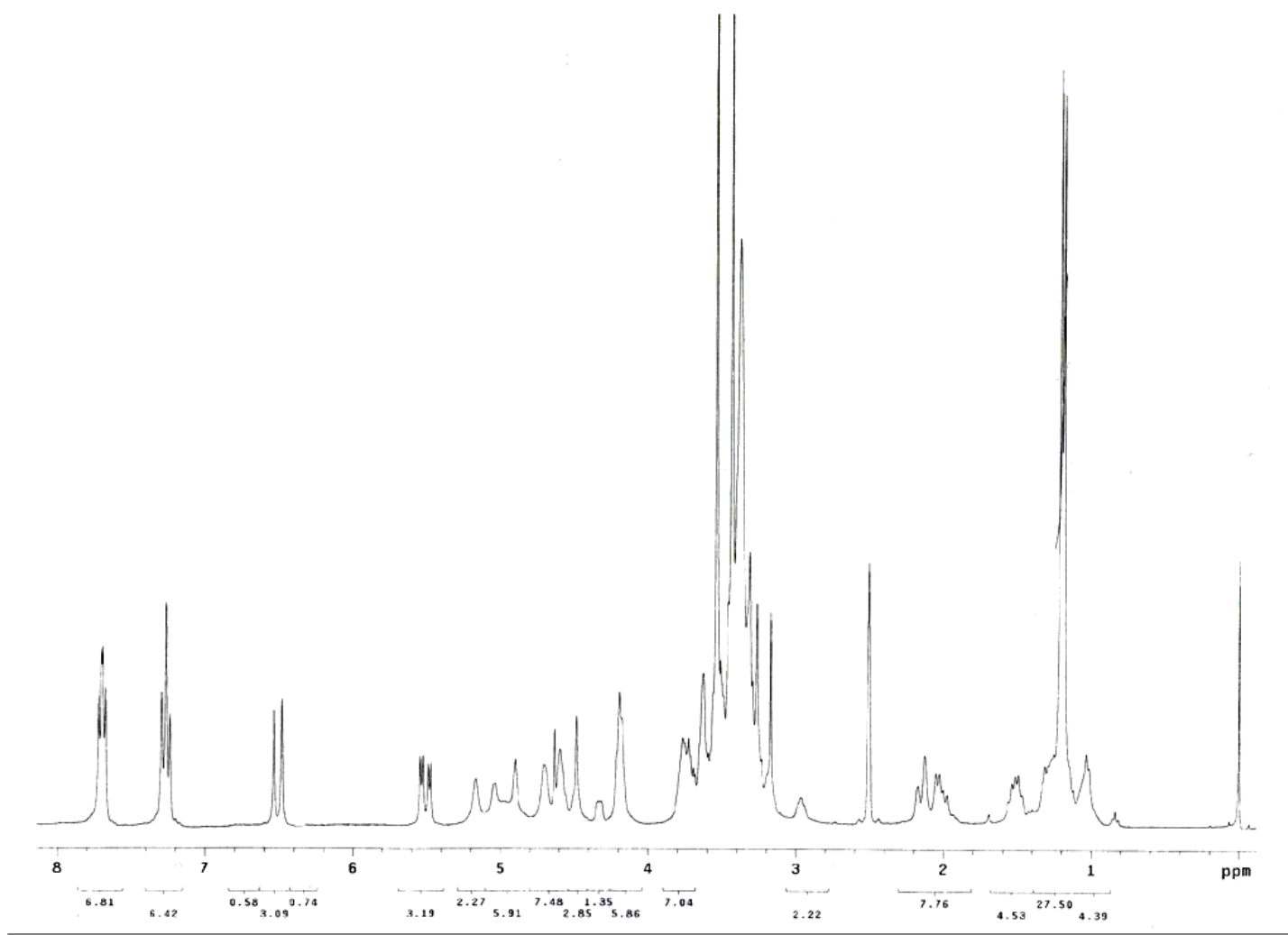
2.1.1. Rosuvastatin

Rosuvastatin Kalsiyum sentetik bir lipid düşürücü ajandır ve HMG KoA'yı mevalonata çeviren HMG KoA redüktazı yarışmalı olarak inhibe eder. Rosuvastatinin bis[(E)-7-[4-(4-florofenil)-6-izopropil-2-[metil(metilsülfonil)amino] Pirimidin-5-yl](3R,5S)-3,5-dihidroksiept-6-enoik asit] tuzudur ve empirik formülü $(C_{22}H_{27}FN_3O_6S)_2Ca$ 'dır. Molekül ağırlığı 1001,14 gr/mol olan rosuvastatinin yarılanma süresi 19 saattir. Rosuvastatin beyaz amorf bir tozudur. Daha çok metanolde çözünen bu madde etanolde de hafifçe çözünmektedir. Piyasa da oral kullanım için bulunan rosuvastatinin 5, 10, 20 ve 40 mg'lık dozları satılmaktadır.

Çalışmamızda kullanılan rosuvastatin kalsiyum piyasada satılan ilaçlardan izole edilmiştir. Bunun için ilaç tabletleri daha önceden metanol ile steril edilen havanda dövülerek toz haline getirilmiştir. Bu ilaç tozları 100 mL metanol ile 20 saat süreyle manyetik karıştırıcı vasıtasıyla çözülmüştür. Filtre kağıdı ile süzülen çözelti daha sonra evaporatöre koyularak çözücü alınmış ve madde saf olarak elde edilmiştir. Maddenin saflığını belirlemek için Sakarya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Organik Anabilim Dalı'nda NMR spektrumuna bakılmıştır (Şekil 2.1). NMR sonuçlarına göre rosuvastatinin beklenen saflıkta olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada rosuvastatinin klinik amaçlı olarak tavsiye edilen günlük dozlarına benzer şekilde dozlar hazırlanarak 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonları kullanılmıştır. Dozların belirlenmesinde normal bir insanın ortalama ağırlığı 80 kg olarak kabul edilmiş ve en yüksek doz olacak 1 mg/kg'a eşdeğer 1 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyon hazırlanmıştır. En yüksek doz olan 1mg/kg dan

başlayarak 0,5, 0,25, 0,125 ve 0,0625 mg/kg'lık dozlara eşdeğer konsantrasyonlar kullanılmıştır. Burada 0,5 mg'lık doz 80 kg'lık bir insanın almış olduğu 40 mg'lık rosuvastatine, 0,25 mg'lık doz 20 mg'lık rosuvastatine 0,125 mg'lık doz 10 mg'lık rosuvastatine, 0,0625 mg'lık doz ise 5 mg'lık rosuvastatine eş değerdedir. Rosuvastatinin kullanılan konsantrasyonları ultra saf suda çözölerek hazırlanmıştır. Çalışmamızda mg/kg değeri $\mu\text{g/mL}$ olarak *in vitro* şartlarda uygulanmıştır.



Şekil 2.1. Rosuvastatin kalsiyuma ait NMR spektrumu

2.1.2. Periferel kan

Çalışmada sigara içmeyen, alkol kullanmayan, kronik hastalığı olmayan, son 1 hafta içinde herhangi bir ilaç kullanmayan, son 6 ay içerisinde teşhis ya da tedavi amacı ile herhangi bir ışına maruz kalmamış, 20-25 yaşları arasında sağlıklı iki erkek iki bayan donörden alınan periferel kanlar kullanılmıştır.

2.1.3. Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler

Chromosome medium B

Cat No: F 5023

Marka: Biochrom

Kullanım amacı: Kromozomal anormallik ve mikronukleus testlerinde kan hücrelerinin üreyebilmeleri için gerekli ortamın sağlanması için kullanılır.

Mitomycin C (C₁₅H₁₈N₄O)

Cat No: 50-07-7

Marka: Applichem

Kullanım amacı: Kromozomal anormallik ve mikronükleus testinde pozitif kontrol olarak kullanılır.

Colchicine (C₂₂H₂₅NO₆)

Cat No: 64-86-8

Marka: Sigma

Kullanım amacı: Kromozomal anormallik testi için hücrede iğ ipliklerini depolimerize ederek kromozomların anafaz evresine geçmesini engellemesi ve kromozomların metafaz plağında kalmasını sağlaması için kullanılır.

Potasyum klorür (KCl)

Cat No: 7447-40-7

Marka: Merck

Kullanım amacı: Kromozomal anormallik ve mikronükleus testinde hipotonik solüsyon hazırlanmasında kullanılır.

Metanol (CH₃OH)

Cat No: 67-56-1

Marka: Merck

Kullanım amacı: Kromozomal anormallik ve mikronükleus testinde fiksatifin hazırlanmasında kullanılır

Asetik asit (CH₃COOH)

Cas No: 64-19-7

Marka: Merck

Kullanım amacı: Kromozomal anormallik ve mikronükleus testinde fiksatifin hazırlanmasında kullanılır

Fiksatif 3 birim metanol ve 1 birim asetik asitten oluşmaktadır ve bu fiksatif lökositleri canlı hallerine en yakın şekilleriyle muhafaza etmek için kullanılır.

Giemsa boyası

HS Kodu: 3204 19 00

Marka Merck

Kullanım amacı: Preparatların boyanması işleminde kullanılır.

Tampon A (KH₂PO₄)

Cat No: 7778-77-0

Marka: Sigma Aldrich

Kullanım amacı: Boyanın hazırlanması esnasında tampon çözelti amaçlı kullanılır

Tampon B (Na₂HPO₄)

Cat No: 7558-79-4

Marka: Sigma Aldrich

Kullanım amacı: Boyanın hazırlanması esnasında tampon çözelti amaçlı kullanılır

Entellan

HS kodu: 3208 20 10

Marka: Merck

Kullanım amacı: hazırlanan preparatların daimi preparat haline getirilmesinde kullanılır.

Heparin ($C_{12}H_{19}NO_{20}S_3$)

Adı: Nevparin enjektabl 25000 İ.Ü. / 5 mL

Marka: Mustafa Nevzat

Kullanım amacı: Kandaki pıhtılaşma faktörlerinin reaktivitesini inhibe ederek kanın pıhtılaşmasını engellemek amacıyla kullanılır.

Cytochalasin-B ($C_{29}H_{37}NO_5$)

Cas No: 14930-96-2

Marka: Applichem

Kullanım amacı: Mikronükleus testinde sitokinezi bloke etmek amacıyla kullanılır.

Fosfat tamponu (PBS)

Cat No: L1825

Marka: Biochrom

Kullanım amacı: Komet testinde tampon olarak kullanılır.

Sodyum klorür (NaCl)

Cat no: 7647-14-5

Marka: Merck

Kullanım amacı: Komet testinde lizis çözeltisi hazırlanmasında kullanılır.

Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Cat No: 7722-84-1

Marka: Applichem

Kullanım amacı: Komet testinde pozitif kontrol olarak kullanılır.

Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)

Cat No: 6381-92-6

Marka: Applichem

Kullanım amacı: Komet testinde elektroforez tamponu ve lizis çözeltisinin hazırlanmasında kullanılır.

Tris-hidroksimetil-aminometan (Tris)

Cat No: 77-86-1

Marka: Applichem

Kullanım amacı: Komet testinde lizis çözeltisi ve nötralizasyon tamponu hazırlanmasında kullanılır.

NaOH (Sodyum hidroksit)

Cat No: 13-10-73-2

Marka: Applichem

Kullanım amacı: Komet testinde elektroforez tamponu hazırlanmasında ve lizis stoğunun pH seviyesini ayarlama da kullanılır.

Triton X

Cat No: 9002-93-1

Marka: Applichem

Kullanım amacı: Komet testinde lyzing solüsyonu hazırlanmasında kullanılır.

DMSO (Dimetil sülfoksit)

Cat No: 67-68-5

Marka: Applichem

Kullanım amacı: Komet testinde lyzing solüsyonunun hazırlanmasında kullanılır.

LMA (Düşük erime ısıli agar)

Cat No: 9012-36-6

Marka: Applichem

Kullanım amacı: Komet testinde lenfositlerin içine gömüldüğü ortam olarak kullanılır.

NMA (Yüksek erime ısıli agar)

Cat No: 9012-36-6

Marka: Applichem

Kullanım amacı: Komet testinde lamaların kaplanması için kullanılır

Etidyum bromür (EtBr)

Cat no: 1239-45-8

Marka: Applichem

Kullanım amacı: Komet testinde DNA molekülünün boyanmasını ve floresan mikroskopunda gözlenmesi amacıyla kullanılır.

Tyrpan blue

Cat No: L 6323

Marka: Biochrom

Kullanım amacı: Komet testinde hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla kullanılır.

Biocoll

Cat No: L6115

Marka: Biochrome

Kullanım amacı: Komet testinde lenfosit ayırıcı solüsyon olarak kullanılır.

2.1.4. Çalışmalarda kullanılan çözeltiler

Tampon A (KH_2PO_4) 0,0833 M

Tampon B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 0,0414 M

Hipotonik solüsyon KCl 0,075 M

Kolkisin 0,06 $\mu\text{g/mL}$

Mitomisin C 0,2 $\mu\text{g/mL}$

Sitokalesin B 5,2 $\mu\text{g/mL}$

NaOH çözeltisi 10 M

EDTA çözeltisi 0,2 M

Etidyum Bromür çözeltisi 25 µg/ml

Stok lizis çözeltisi

2,5 M NaCl

10 mM Tris

100 mM EDTA

Çözeltinin pH'sı 10 M NaOH ile pH=10'a ayarlanır. Hazırlanan stok lizis çözeltisi oda sıcaklığında saklanır. Kullanmadan önce her 100 ml çözelti için 1 mL Triton X ve 10 mL DMSO ilave edilir.

Elektroforez Tamponu

10 M NaOH

0,2 M EDTA

Nötralizasyon tamponu

0,4 M Tris

Çözeltinin pH'sı konsantre HCl ile pH=7,5'e ayarlanır .

Düşük kaynama dereceli agar %0,65

Yüksek kaynama dereceli agar %0,65

2.2. Metod

2.2.1. Kromozom anormallik testi

Besi yerleri (Chromosome Medium B) steril tüplere 2,5 mL olacak şekilde dağıtılmıştır. Çalışmamızda 5 uygulama dozu (0,0625, 0,125, 0,25, 0,5 ve 1 µg/mL) pozitif kontrol ve negatif kontrol kullanılmıştır.

Sağlıklı 4 bireyden 1/10 oranında heparin içerecek şekilde hazırlanmış olan enjektörlerle alınan kan, önceden hazırlanmış olan 2,5 mL'lik besi yerine (Chromosome Medium B) 0,2 mL olacak şekilde aktarılmıştır. Tüpler daha önceden 37 °C'ye getirilmiş olan etüve kaldırılarak 72 saat süreyle kültüre alınmıştır. Kültür süresi boyunca tüpler hergün 3 defa çalkalanmıştır.

Kültürdeki tüplere ilaç uygulama süresine göre madde ekimi yapılmıştır. 24 saatlik doz uygulaması için kültür süresinin 48. saatinde, 48 saatlik rosuvastatin maruziyeti için kültür süresinin 24. saatinde kültür ortamına 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5 ve 1 µg/mL'lik konsantrasyonda olacak şekilde madde uygulaması yapılmıştır. Aynı zamanda negatif kontrol olarak steril distile su ve pozitif kontrol olarak da Mitomycin C (MMC) 0,2 µg/mL olacak şekilde eklenmiştir. Çalışmanın 70. saatinde iğ ipliklerinin depolimerizasyonunu sağlayan kolkisinden 0,06 µg/mL olacak şekilde ekim yapılmıştır.

Kültür süresinin sonunda tüpler 1200 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj bitiminden sonra süpernatant pastör pipeti ile atılarak 5 mL 0,075 M KCl'den vorteks üzerinde ilave edilmiştir. Hipotonik solüsyon eklemesinin ardından tüpler 37 °C'lik etüvde 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler tekrar 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve santrifüjden sonra süpernatant atılmıştır. Yine daha önceden hazırlanmış olan ve +4 °C'de bekletilmiş soğuk fiksasyon çözeltisinden (3 metanol : 1 asetik asit) 5'er mL her tüpe vorteks üzerinde eklenmiştir. Bu işlemden sonra tüpler 45 dakika buzdolabında bekletilmiştir. Ardından tüpler santrifüj edilerek (1200 rpm, 10 dakika) üzerlerinden süpernatant atılmıştır. Tekrar damla damla soğuk metanol : asetik asit (3:1) fiksatifinden 5'er mL

her tüpe vorteks üzerinde eklenmiştir. Tüpler tekrar santrifüj edilip (1200 rpm, 10 dakika boyunca) süpernatant atılmıştır. Bu şekilde bir kez daha yapıldıktan sonra sonra tüplerin konik kısma kadar olan kısmı atılmıştır. Kalan kısım pastör pipeti ile pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir.

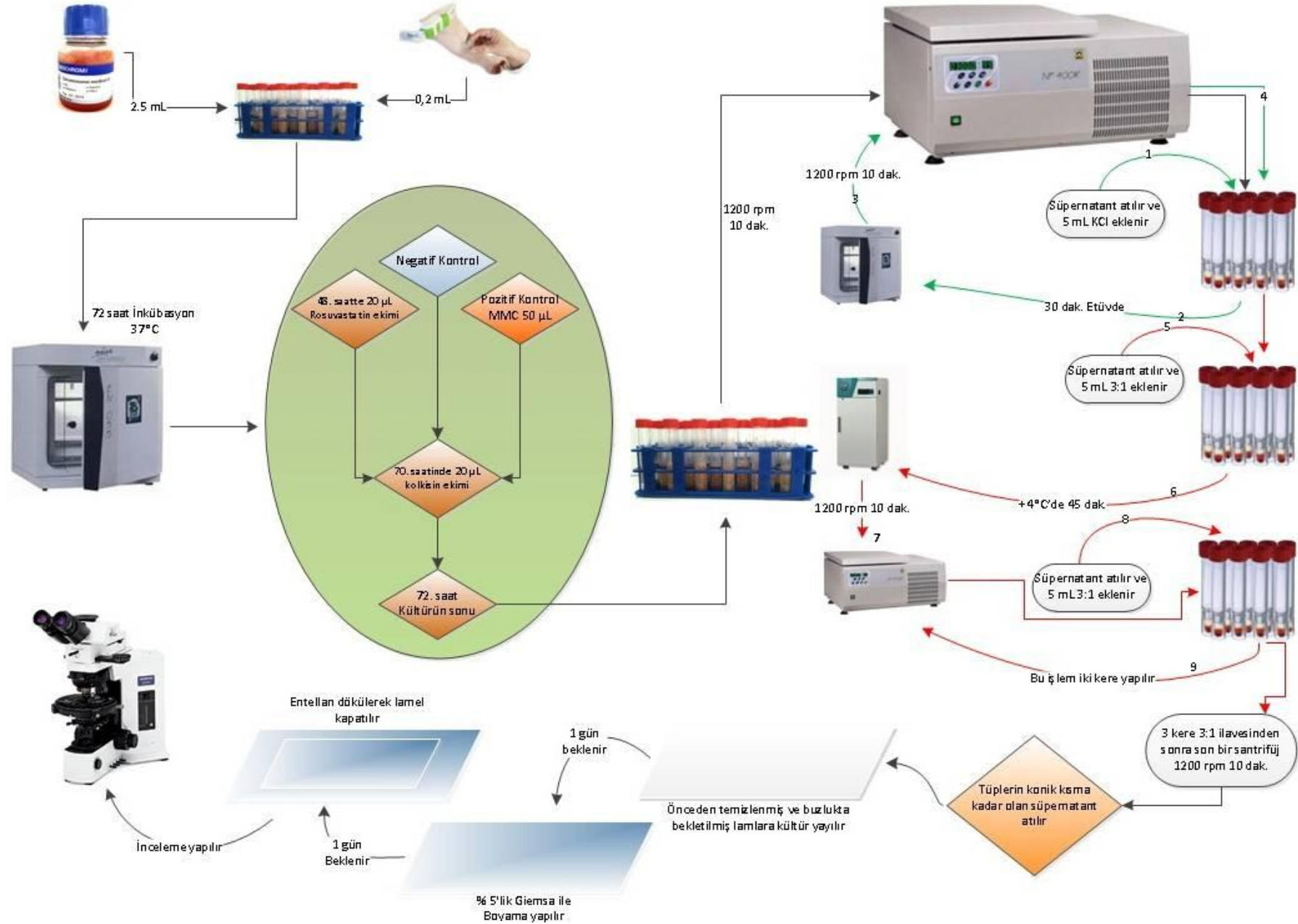
Elde edilen hücre kültürü önceden temizlenmiş (saf su ile yıkandıktan sonra -20 °C'de bekletilmiş) lamalar üzerine damlatılarak preparat hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatlar en az bir gün süreyle kurumaya bırakılmıştır.

Kuruyan preparatlar tampon A ve tampon B kullanılarak pH 6,8 olacak şekilde hazırlanmış %5'lik Giemsa boyası ile 25-30 dakika boyanmış ve 3 kez saf sudan geçirildikten sonra daimi preparat haline getirmek için entellan ile kapatılmıştır.

2.2.1.1. Mitotik indeks ve kromozomal anormalliklerin incelenmesi

Mitotik indeksin (MI) saptanmasında, bütün uygulamalar için her bir bireye için 3000 hücre olmak üzere her bir doz için toplam 12000 hücre incelenmiştir. Bölünen hücre sayısının toplam hücreye oranı yüzde cinsinden hesaplanarak mitotik indeks belirlenmiştir. Kromozomal anormalliklerin saptanmasında, her bir uygulama için her bir bireye ait preparatlarda 46 kromozomlu ve kromozomları iyi dağılmış olan 100'er hücre (her bir doz için toplam 400 hücre) değerlendirilerek kromozom anormallikleri tespit edilmiştir. İncelenen toplam hücre içindeki anormal hücrelerin yüzdesi ve hücre başına düşen kromozom anormalliği (KA/Hücre) sayısı belirlenmiştir.

Şekil 2.2'de kromozomal anormallik testinin 24 saatlik maruziyet uygulamasını gösteren bir diyagram yer almaktadır. 48 saatlik uygulamada bundan farklı olarak sadece etüvdeki kültüre 24. saatte madde ekimi yapılır. Diğer tüm protokol 24 saatlik uygulama metodu ile aynıdır.



Şekil 2.2. Kromozomal anormallik testi diyagramı

2.2.2. Mikronükleus test metodu

Kromozomal anormallik testi metodunda olduğu gibi besi yerleri (Chromosome Medium B) steril tüplere 2,5 mL olacak şekilde dağıtılmıştır. Mikronükleus testinde 5 uygulama dozu (0,0625, 0,125, 0,25, 0,5 ve 1 µg/mL), pozitif kontrol ve negatif kontrol kullanılmıştır.

Kromozomal anormallik testinde belirtildiği gibi alınan kan önceden hazırlanmış olan 2,5 mL'lik besi yeri (Chromosome Medium B) üzerine 0,2 mL olacak şekilde aktarılmıştır. Tüpler daha önceden 37 °C'ye getirilmiş olan etüve kaldırılarak 72 saat süreyle kültüre alınmıştır. Kültür süresi boyunca tüpler hergün 3 defa çalkalanmıştır.

Kültürün başlangıcından itibaren 24. saatte madde uygulaması yapılmıştır (0,0625, 0,125, 0,25, 0,5 ve 1 µg/mL). Aynı zamanda negatif kontrol olarak steril distile su ve pozitif kontrol olarak da MMC (Mitomycin C) ekimi yapılmıştır. Kültürün 44. saatinde sitokinez inhibitörü olan Cytochalasin-B 5,2 µg/mL olacak şekilde eklenmiştir.

Kültür süresi bitiminde tüpler etüvden çıkarılmış ve 1000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atılarak daha önceden hazırlanan ve +4 °C'ye getirilen 5 mL 0,075 M KCl vorteks üzerinde ilave edilmiştir. Hipotonik solüsyon eklemesinin ardından tüpler +4 °C'de 5 dakika bekletilmiştir.

Süre sonunda tüpler tekrar 1000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve santrifüjden sonra süpernatant atılmıştır. Yine daha önceden hazırlanmış olan ve +4 °C'de bekletilmiş soğuk fiksatif çözeltisinden (3 metanol : 1 asetik asit) 5'er mL vorteks üzerinde eklenmiştir. Bu işlemde sonra tüpler 15 dakika buzdolabında bekletilmiş ve ardından tekrar santrifüj edilmiştir (1000 rpm, 10 dakika). Santrifüj sonrasında süpernatant atılmıştır. Tekrar damla damla soğuk metanol : asetik asit (3:1) fiksatifinden 5'er mL her tüpe vorteks üzerinde eklenip tüpler tekrar santrifüj edilmiştir (1000 rpm, 10 dakika). Santrifüj sonrası süpernatant atılmıştır. Bu işlemde sonra daha önceden hazırlanmış olan ve 3:1 fiksatifine %1'lik olacak şekilde formaldehit eklenmesiyle elde edilen fiksatiften her tüpe 5'er mL eklenmiştir.

Son fiksatif eklendikten sonra tüpler tekrar santrifüj edilmiştir (1000 rpm, 10 dakika). Santrifüj işleminden sonra tüplerin konik kısma kadar olan kısmı atılmış ve kalan kısım pastör pipeti ile yavaş bir şekilde homojen hale getirilmiştir.

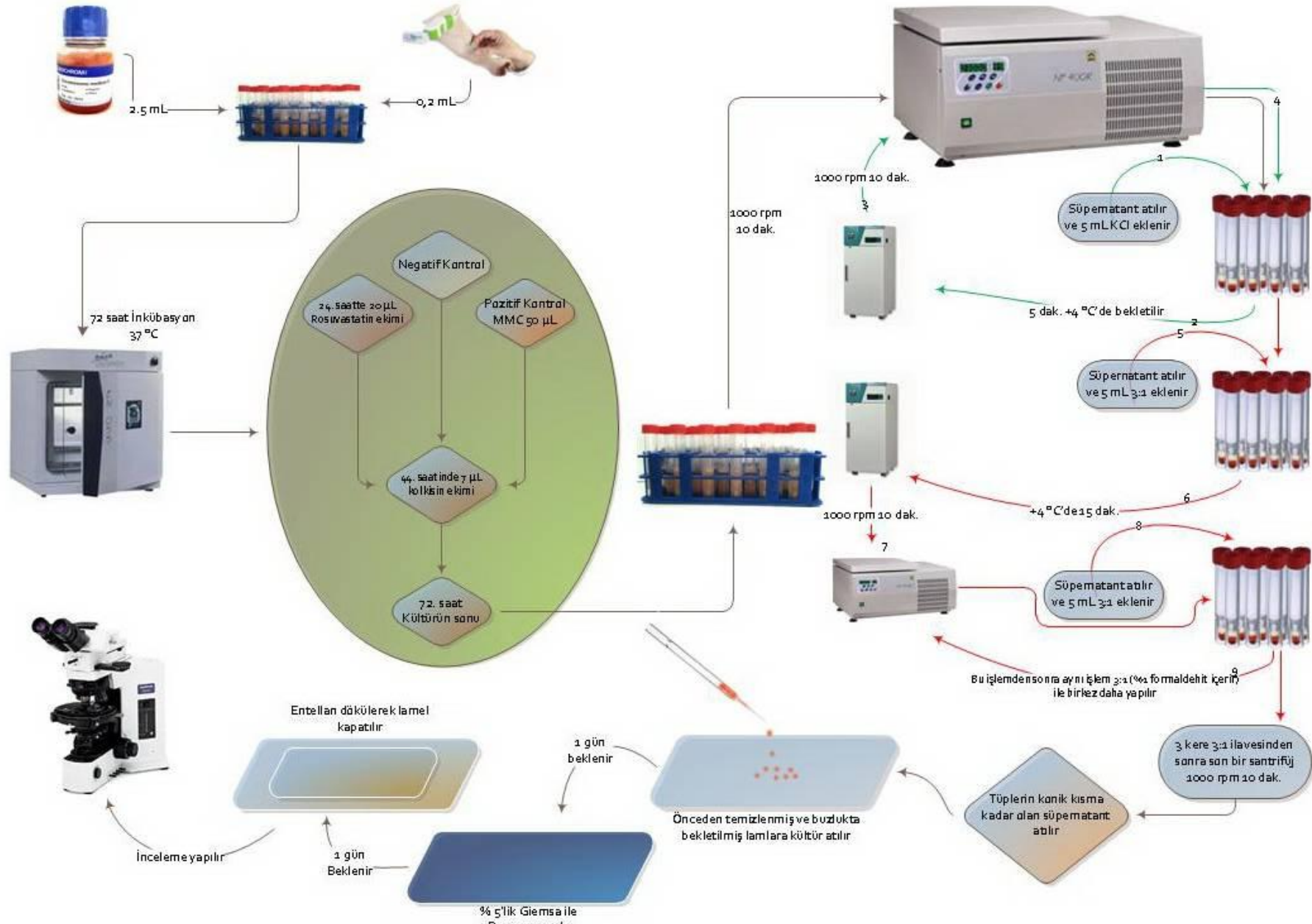
Elde edilen hücre kültürü önceden temizlenmiş (1 N nitrik asitte 1 gece bekletilmiş ve 25-30 dakika çeşme suyunda yıkanmış, saf sudan geçirilmiş, daha sonra %70'lik alkol içerisinde -20°C 'de çalışma zamanına kadar bekletilmiş) lamalar üzerine damlatılmıştır.

Kuruyan preparatlar kromozomal anormallik testinde olduğu gibi %5'lik Giemsa boyası ile 13-15 dakika boyanmış ve daimi preparat haline dönüştürmek için entellan ile kapatılmıştır (Şekil 2.4).

2.2.1.2. MN frekansı ve nükleer bölünme indeksinin belirlenmesi

Daimi hale getirilmiş preparatlarda her bir doz için her bir bireyde 1500 binükleat hücrede (her bir doz için toplamda 6000 binükleat hücre) mikronükleus frekansları belirlenmiştir.

Nükleer bölünme indeksi belirlenirken, her bir bireyden her bir doz için 500 hücre sayılmış ve $1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times (N_3 + N_4) / N$ formülünden yararlanılarak 1, 2, 3 ve daha fazla çekirdekli hücrelerin sayısına göre nükleer bölünme indeksi tespit edilmiştir.



Şekil 2.3. Mikronükleus testi diyagramı

2.2.3. Komet (kuyruklu yıldız = tek hücre jel elektroforezi) testi

900'er µL PBS ependorflara konulmuş ve 100'er µl kan her bir ependorfa ilave edilmiştir. Kan ve PBS süspanse edilip 10 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Bu işlemin ardından kan ve PBS karışımlarının bulunduğu ependorf tüplerinin dip kısmına 100'er µl lymphoprep ilave edilmiştir. İlave yapıldıktan sonra tüpler +4 °C'de 1060 rpm de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası ependorflar tekrar buz içerisine alınmıştır. Ependorflarda görüntü olarak en altta kırmızı, onun üzerinde pembe bir katman görülür. En üst pembe katmanın üzerindeki şeffaf katmanın 100 µl'si ayrı ependorflara aktararak lenfositler toplanmış ve buz üzerine yerleştirilmiştir.

Elde edilen lenfositler 100'er µL olarak ependorflara dağıtılmış, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5 ve 1 µg/mL olacak şekilde 100 µl'lik rosuvastatin çözeltisi ile negatif kontrol olarak steril H₂O ve pozitif kontrol olarak da H₂O₂ eklenerek 37 °C'de 1 saat kültüre alınmıştır. Kültür sonrasında ependorflar 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrası ependorflardan süpernatant atılmış ve 100 µl PBS eklenerek resüspanse edilmiştir. Low Melting Agar'nın 75 µl'si alınarak 100 µl lenfosit ile hızlı bir şekilde karıştırılmış ve daha önceden normal erime dereceli agar ile kaplanmış lamalar üzerine yayılmıştır. Daha sonra lamaların üzeri 24X60 mm'lik lamelle kapatılmıştır. Kapatılan lamalar kapalı kutu içinde 20-25 dakika buzdolabında bekletilmiştir.

Süre sonunda lam üzerindeki lameller kaldırılarak içerisinde lizing solüsyonu bulunan şale içerisine yerleştirilmiştir. Bu şekilde preparatlar buzdolabında 1 saat bekletilmiştir.

Lizis işleminden sonra lamalar elektroforez tankında bulunan tampon içerisine yerleştirilmiş ve burada 20 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda preparatlar 1V/cm 300 mA'de 20 dakika süresince elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Elektroforezden sonra lamalar, içerisinde nötralizasyon tamponu bulunan şale

içerisine alınmış ve burada +4 °C'de 5 dakika bekletilmiş ve aynı işlem 2 kez tekrarlanmıştır.

İşlemler sonunda her bir lama 50 µl EtBr eklenerek üzerine lamel kapatılmıştır. Boyanan preparatlar 15-20 dakika buzdolabında bekletilmiştir. Daha sonra buharının uçması için 2 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve elde edilen preparatlarda sayım yapılmıştır. Bu test sisteminde yapılan işlemler karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

Boyanan preparatlar BAB marka flöresan ataçmanlı mikroskop altında 40X büyütmede incelenmiştir. Rosuvastatinin her bir dozu için her bir donörden 100'er hücre olmak üzere toplam 400 hücre "BAB Bs200ProP / BsComet DNA Comet Assay" görüntüleme yazılımı kullanılarak incelenmiş ve sonuçlar % kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti cinsinden değerlendirilmiştir.

2.2.4. İstatistiksel değerlendirme

Deney gruplarındaki mitotik indeks, nükleer bölünme indeksi, kromozomal anormallikler ve mikronükleus frekanslarının kontrol grupları ile farklılık gösterip göstermediğinin belirlenmesinde z dağılım testi kullanılırken, komet değerlendirilmesinde *students-t* testi kullanılmıştır. Anormal hücre frekansı, hücre başına düşen kromozom anormalliği, mitotik indeks, mikronükleus frekansı ve nükleer bölünme indeksi doz-etki ilişkilerini ortaya koymak için SPSS 11.0 yazılımı kullanılmıştır.

BÖLÜM 3. BULGULAR

3.1. Kromozomal Anormallik

3.1.1. 24 saatlik uygulama

Sağlıklı bireylerden alınan periferik kan ile yapılan 24 saatlik *in vitro* rosuvastatin uygulamasında 5 farklı doz (0,0625, 0,125, 0,25, 0,5 ve 1µg/mL) kullanılmış ve 6 farklı kromozomal anormallik çeşidi tespit edilmiştir (Tablo 1.3). Yapısal tipte olan bu kromozom anormallikleri kromatit kırığı, kromozom kırığı, fragment, kromatid değişimi, kardeş kromatidlerde birleşme ve disentrik kromozomlar şeklindedir (Şekil 3.1-3.6). Tespit edilen yapısal anormalliklerden en sık gözlenen kromatid kırıklarıdır. Bunu sırasıyla kromozom kırığı, fragment, kromatid değişimi ve kardeş kromatidlerde birleşme, sonuncu olarak da disentrik kromozomlar izlemiştir.

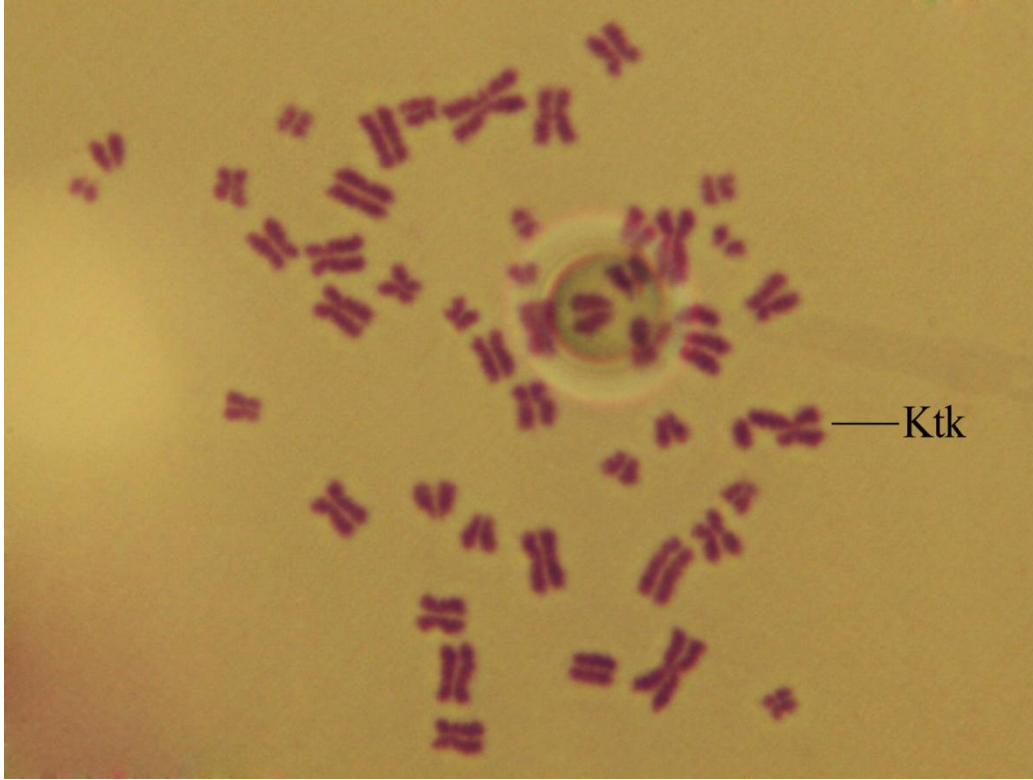
Tablo 3.1. Rosuvastatinin 24 saat uygulaması ile lenfositlerde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları

Madde	Uygulama		Anormallikler						Anormal hücre (%) ± SH	KA/Hücre ± SH	Mitotik İndeks (%) ± SH
	Süre (s)	Kon. (µg/ml)	Ktk	Kzk	F	Ktd	Kkb	Ds			
Kontrol	24	0,00	1	-	-	-	-	-	0,25±0,25	0,003±0,003	5,81±0,21
P. K	24	0,20	118	31	12	22	-	5	36,50±2,41	0,470±0,025	3,21±0,16
Ros.	24	0,0625	9	4	-	-	2	-	3,75±0,95**	0,038±0,010**	5,38±0,21
		0,125	23	3	-	-	-	-	6,50±1,23**	0,065±0,012**	5,83±0,21
		0,25	17	2	4	-	-	-	5,75±1,16**	0,058±0,012**	5,30±0,21
		0,50	32	8	1	1	-	-	10,25±1,52**	0,105±0,015**	4,95±0,20*
		1,00	18	5	4	1	-	1	7,25±1,30**	0,073±0,013**	4,48±0,19**

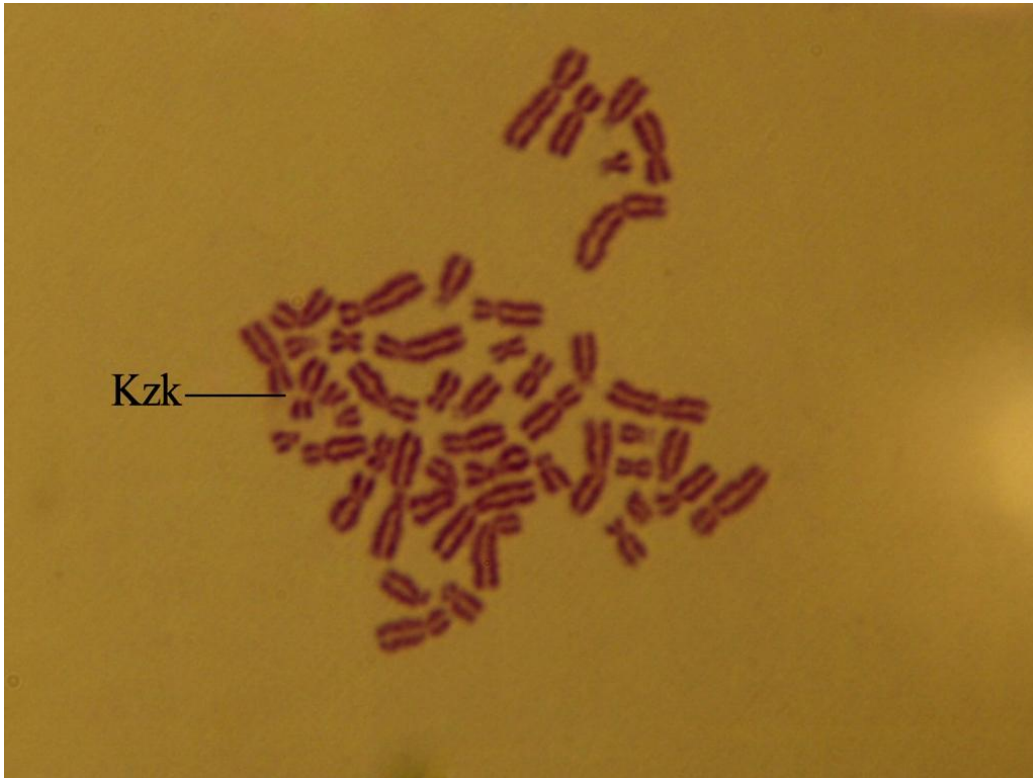
Ktk: kromatid kırığı, Kzk: kromozom kırığı, F: Fragment, Ktd: Kromatid değişimi, Kkb: Kardeş kromatidlerde birleşme, Ds: disentrik kromozom, P.K: Pozitif kontrol, Kon: Konsantrasyon, s: saat. Kromozomal anormalliklerde her doz için 400 metafaz hücresi, Mitotik indeks için 12000 hücre incelenmiştir.

*Kontrolle göre anlamlı fark vardır (p<0,01)

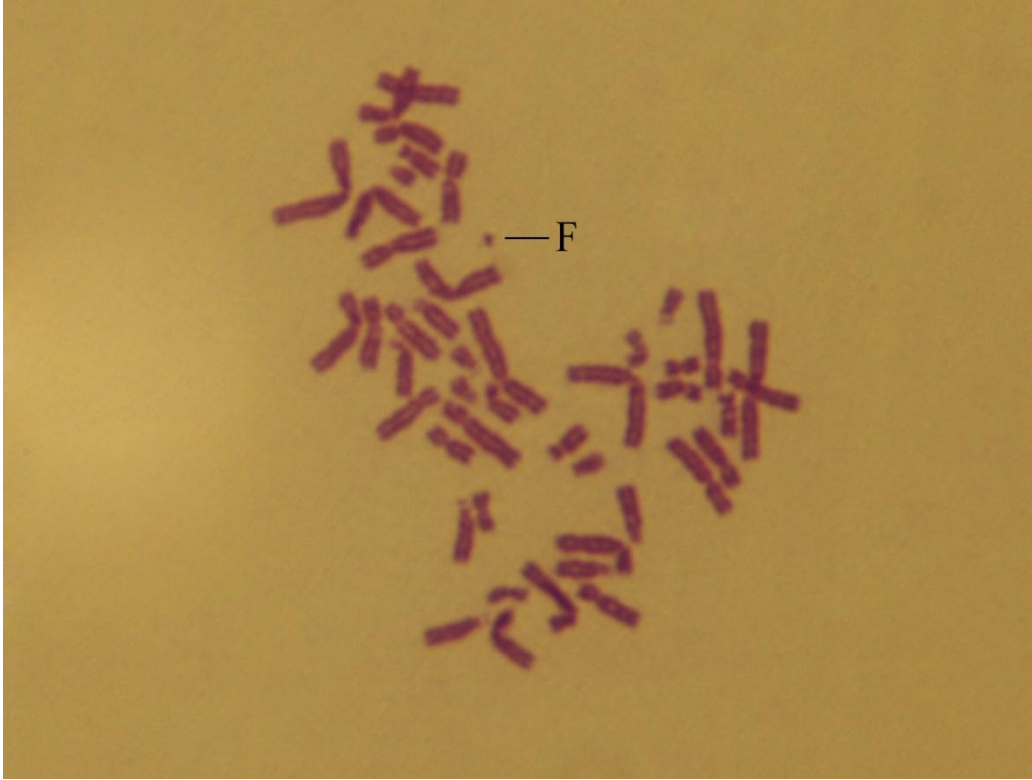
** Kontrolle göre anlamlı fark vardır (p<0,001)



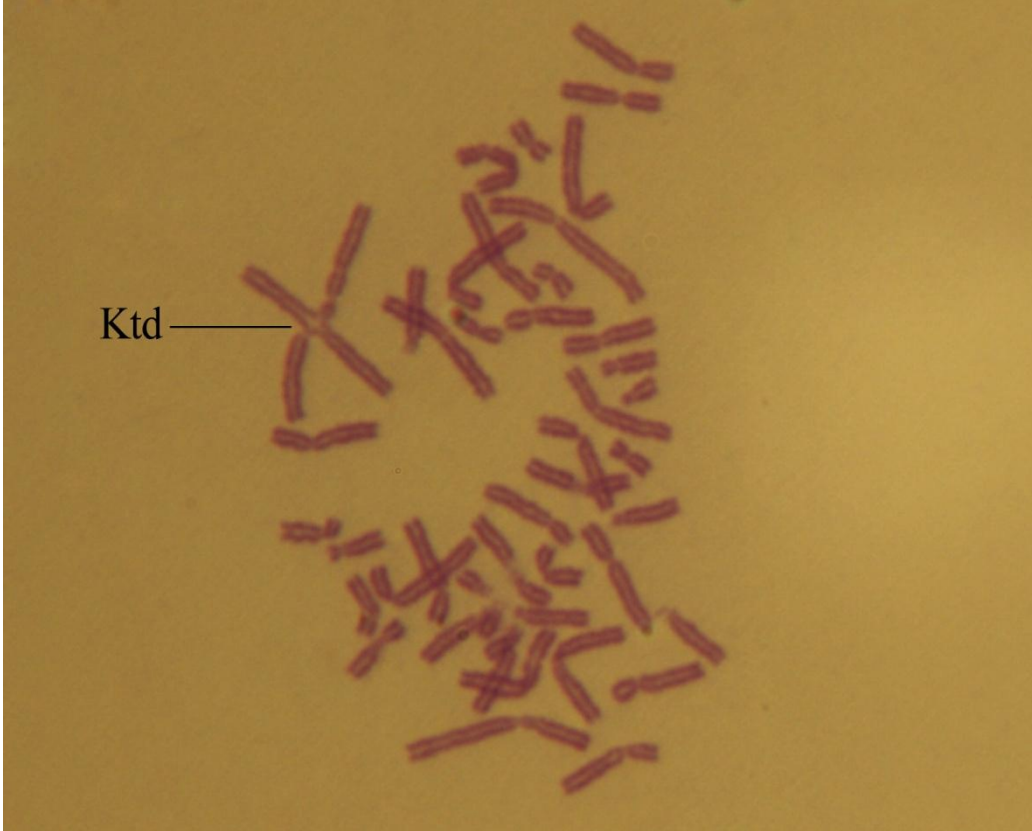
Şekil 3.1. Rosuvastatin uygulaması ile oluşan kromatid kırığı (Ktk: kromatid kırığı)



Şekil 3.2. Rosuvastatin uygulaması ile oluşan kromozom kırığı (Kzk: kromozom kırığı)



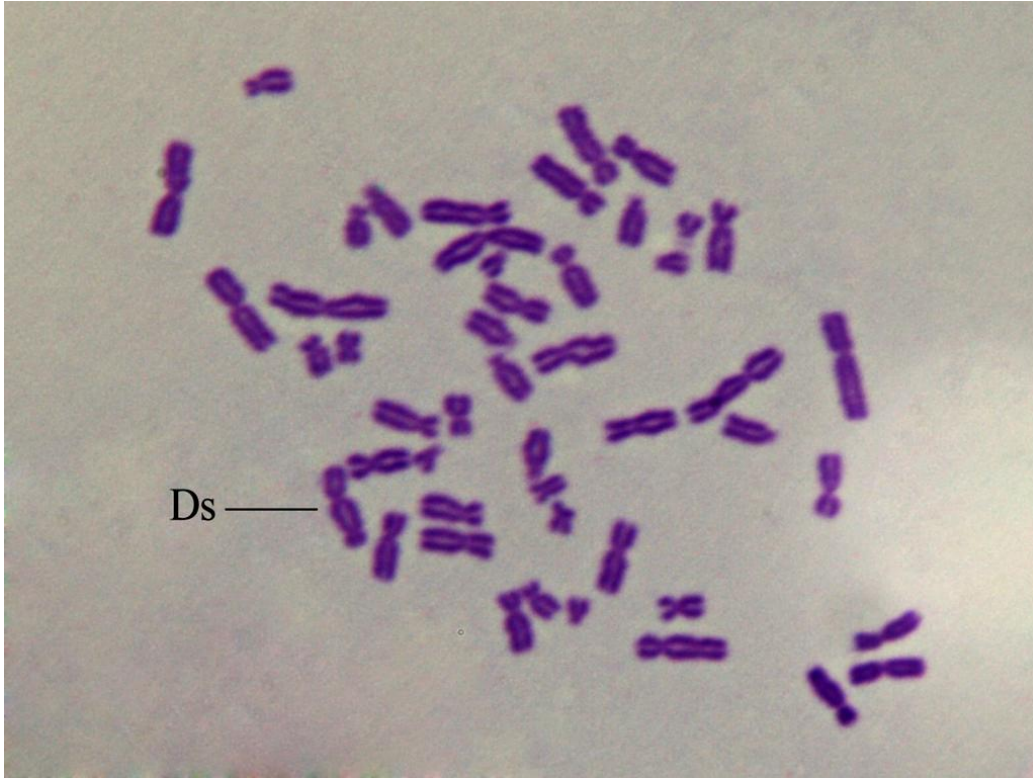
Şekil 3.3. Rosuvastatin uygulaması ile oluşan fragment (F: Fragment)



Şekil 3.4. Rosuvastatin uygulaması ile oluşan kromatid değişimi (Ktd: Kromatid değişimi)

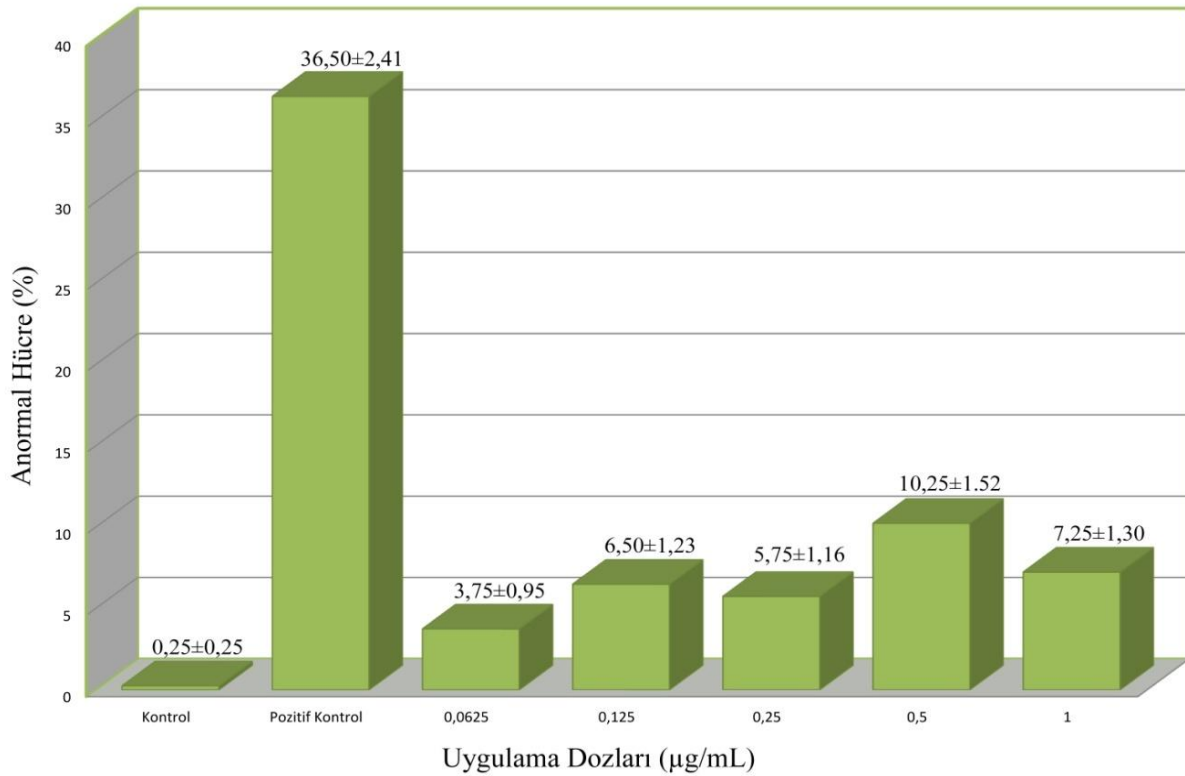


Şekil 3.5. Rosuvastatin uygulaması ile oluşan kardeş kromatidlerde birleşme (Kkb: kardeş kromatidlerde birleşme)

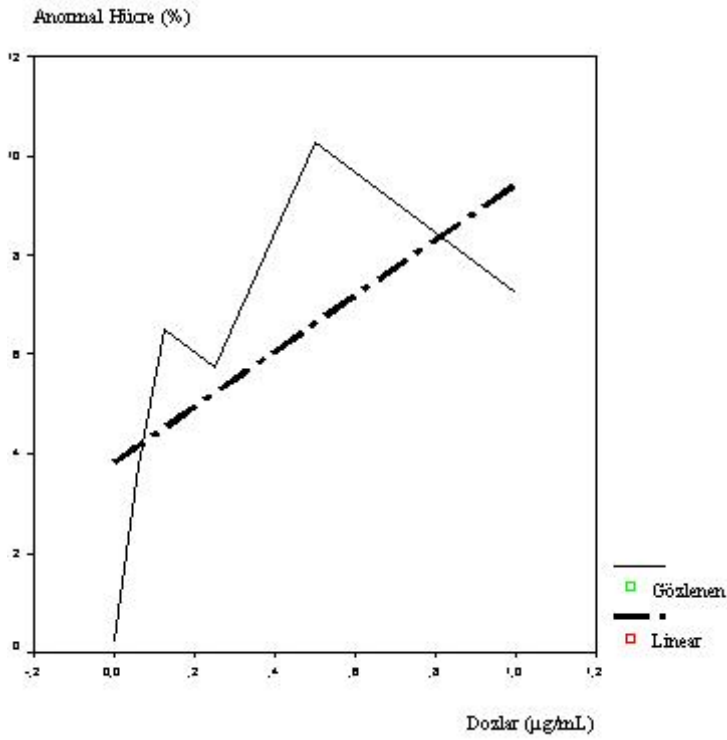


Şekil 3.6. Rosuvastatin uygulaması ile oluşan disentrik kromozom (Ds: disentrik kromozom)

Rosuvastatinin 24 saatlik uygulaması anormal hücre yüzdesi bakımından istatistiksel olarak değerlendirildiğinde bütün uygulama dozlarında kontrole göre anlamlı bir artış tespit edilmiştir (Tablo 3.1). En düşük anormal hücre yüzdesi 0,0625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik dozda gözlenirken (% 3,75) en yüksek oran 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik dozda gözlenmiştir (%10,25). Diğer yandan 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik dozda anormal hücre yüzdesi 6,50 iken 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik dozda 5,75 olarak gözlenmiştir. Benzer şekilde 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik dozda anormal hücre yüzdesi 7,25 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.7). 24 saatlik muamele sonucunda oluşan kromozomal anormalliklerin doz artışı ile orantılı olarak arttığı görülmekte ve bu doz-etki ilişkisi anlamlı bir korelasyona sahiptir ($r=0,623$) (Şekil 3.8).

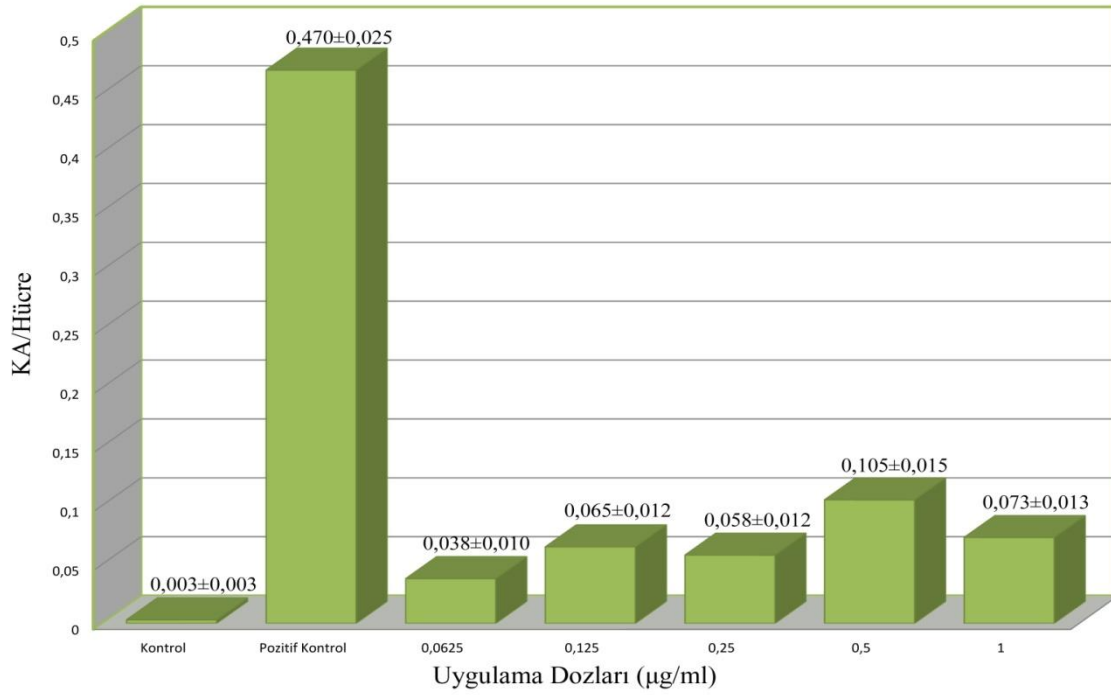


Şekil 3.7. 24 saatlik rosuvastatin uygulamasında dozlara göre anormal hücre yüzdeleri

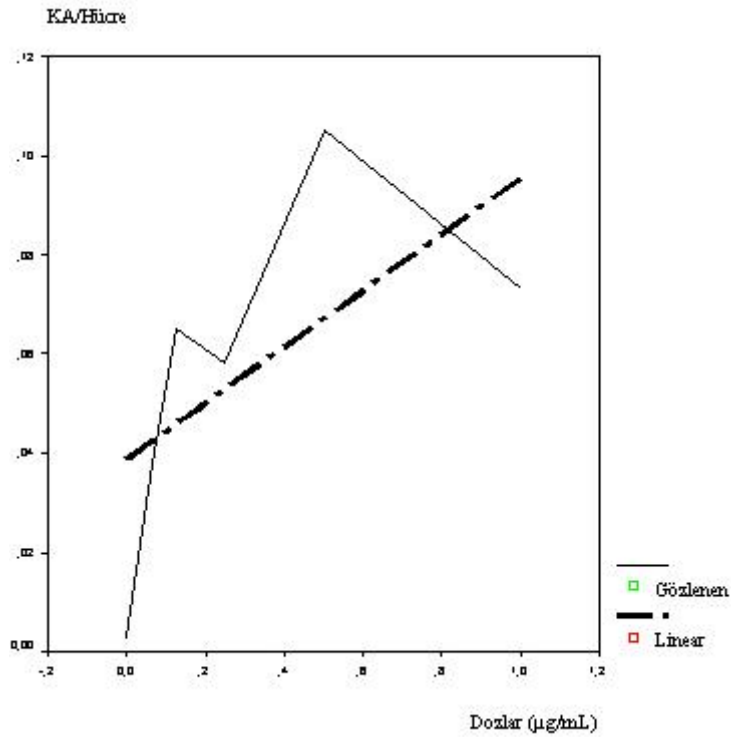


Şekil 3.8. 24 saatlik rosuvastatin uygulamasının insan lenfositlerinde anormal hücre yüzdesinin doza bağlı ilişkisi

Hücre başına düşen anormallik sayısının da istatistiksel olarak yapılan değerlendirilmesinde bütün uygulama dozlarında kontrole göre anlamlı bir artış tespit edilmiştir. 24 saatlik uygulama sonucunda tespit edilen hücre başına düşen anormallik değerleri içerisinde en düşük oran 0,0625 µg/mL'de (0,038), en yüksek oran ise 0,50 µg/mL'lik konsantrasyonda tespit edilmiştir (0,105). Hücre başına düşen anormallik sayısı 0,125 µg/mL'lik dozda 0,065 iken 0,25 µg/mL'lik dozda 0,058 olarak tespit edilmiştir. 1 µg/mL'lik dozda ise hücre başına düşen anormallik sayısı 0,073'dür (Şekil 3.9). Hücre başına düşen anormallik değeri doza bağlı olarak anlamlı bir korelasyon göstermiştir ($r=0,62$) (Şekil 3.10).



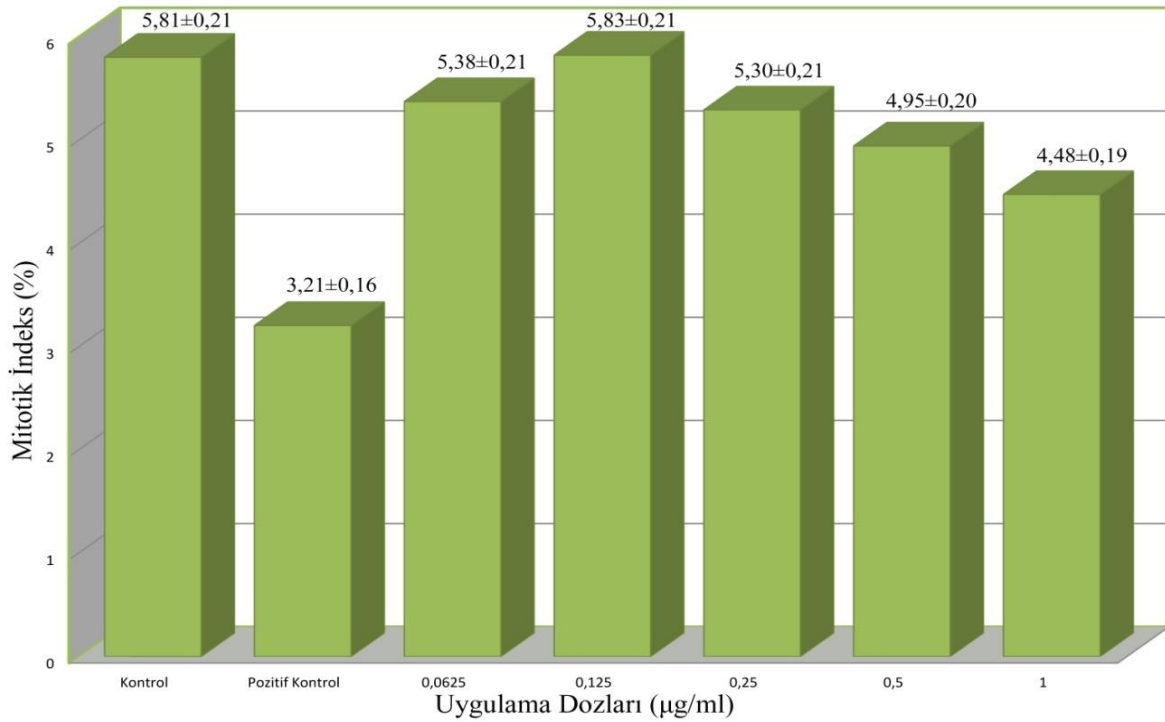
Şekil 3.9. 24 saatlik rosuvastatin uygulamasında hücre başına düşen anormallik miktarı değerleri



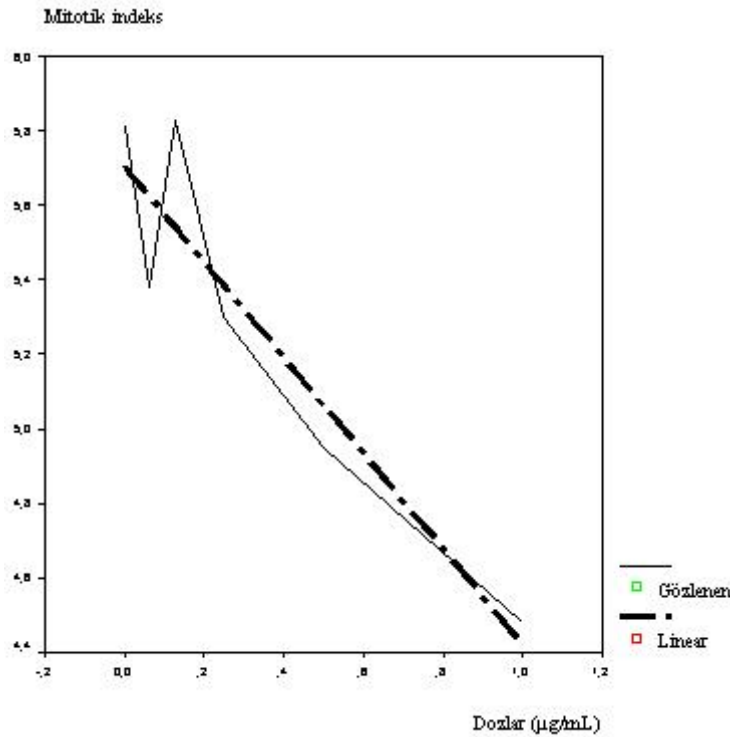
Şekil 3.10. 24 saatlik rosuvastatin uygulamasının insan lenfositlerinde hücre başına düşen anormallik değerlerinin doza bağlı ilişkisi

24 saatlik rosuvastatin uygulamasında mitotik indeks kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm dozlarda bir düşüş gözlenmiştir fakat bu düşüşün sadece 0,5 ve

1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik dozlarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.1). Mitotik indeks değeri 0,0625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik dozda kontrol değeri olan 5,81'den düşük bulunmuştur. 0,0625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik dozda mitotik indeks 5,38 iken bir sonraki doz olan 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'de %5,83 seviyesine çıkmıştır (Şekil 3.11). 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik dozda düşüşe geçen mitotik indeks bu düşüşünü 0,5 ve 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik dozda da sürdürmüştür. Rosuvastatin muamelesi ile yapılan 24 saatlik uygulamada mitotik indeks doza bağlı olarak azalma göstermiştir ($r = -0,93$) (Şekil 3.12).



Şekil 3.11. 24 saatlik rosuvastatin uygulamasında dozlara göre mitotik indeks değerleri



Şekil 3.12. 24 saatlik rosuvastatin uygulamasının insan lenfositlerinde mitotik indeksin doza bağlı ilişkisi

3.1.2. 48 saatlik uygulama

Rosuvastatinin 48 saatlik uygulanmasının kromozomlar üzerinde meydana getirebileceği hasarları gözlemek için bay ve bayan 4 kişiden oluşan donörlerden alınan periferik kanlar ile yapılan *in vitro* uygulamada yine 5 farklı dozda (1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL, 0,125 µg/mL ve 0,0625 µg/mL) 4 farklı kromozomal anormallik tespit edilmiştir. 24 saatlik çalışmaya benzer şekilde anormalliklerin hepsi yine yapısal tipte kromozom anormallikleridir. Bu anormallikler sıklıklarına göre sırasıyla kromatit kırığı, kromozom kırığı, fragment ve kromatid değişimidir (Tablo 3.2).

Rosuvastatinin 48 saatlik kromozomal anormallik testinde elde edilen bulguların istatistiksel olarak değerlendirilmesi yapılmıştır. Anormal hücre yüzdeleri bakımından değerlendirildiğinde tüm dozlarda anormal hücre yüzdeleri doğrusal olarak bir artış göstermiştir (Şekil 3.13). Bütün dozlarda meydana gelen bu artış 0,0625 µg/mL'lik doz haricinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

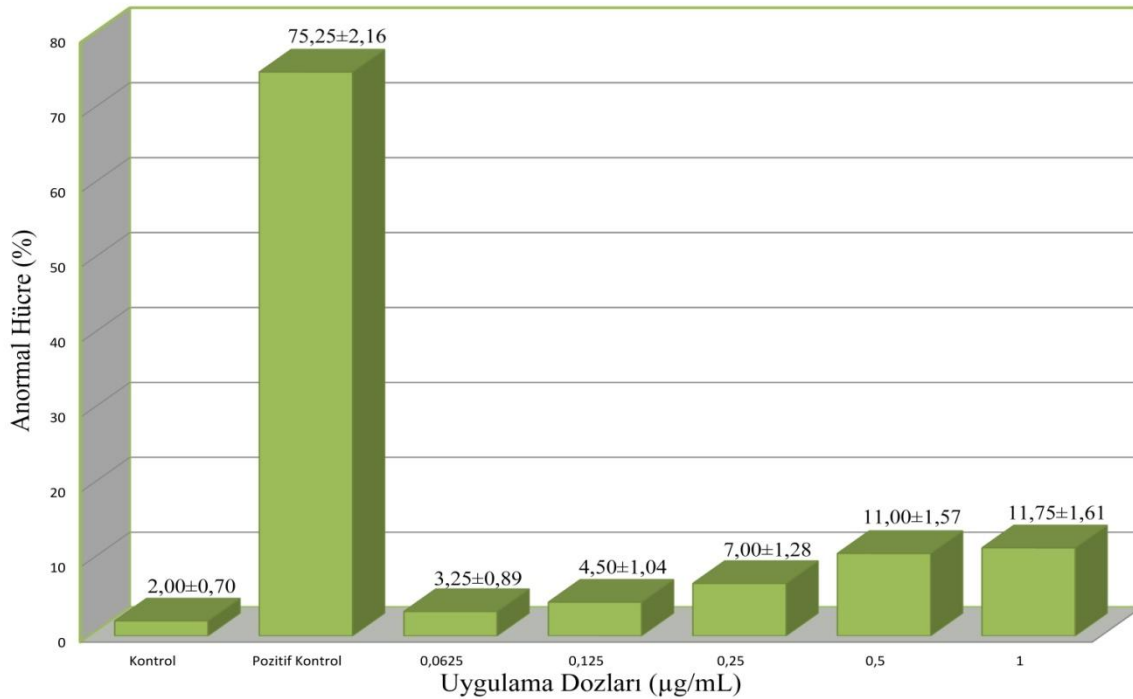
Tablo 3.2. Rosuvastatinin 48 saat uygulaması ile insan periferik lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları

Madde	Uygulama		Anormallikler				Anormal hücre (%) ± SH	KA/Hücre ± SH	Mitotik İndeks (%) ± SH
	Süre (s)	Kon. (µg/ml)	Ktk	Kzk	F	Ktd			
	Kontrol	48	0,00	8	-	-	-	2,00±0,70	0,0200±0,007
P. K	48	0,20	529	138	35	49	75,25±2,16	1,878±0,022	1,73±0,22
Ros	48	0,0625	12	1	-	-	3,25±0,89	0,033±0,009	5,82±0,21
		0,125	19	-	-	-	4,50±1,04*	0,048±0,011*	4,78±0,19**
		0,25	24	2	2	1	7,00±1,28**	0,073±0,013**	3,60±0,17**
		0,50	41	6	3	-	11,00±1,57**	0,125±0,017**	2,21±0,13**
		1,00	49	4	1	-	11,75±1,61**	0,135±0,017**	1,82±0,12**

Ktk: kromatid kırığı, Kzk: kromozom kırığı, F: Fragment, Ktd: Kromatid değişimi, P.K: Pozitif kontrol, Kon: Konsantrasyon, Ros: rosuvastatin, s: saat. Kromozomal anormalliklerde her doz için 400 metafaz hücresi, mitotik indeks için 12000 hücre incelenmiştir.

* Kontrole göre anlamlı fark vardır (p<0,05)

** Kontrole göre anlamlı fark vardır (p<0,001)

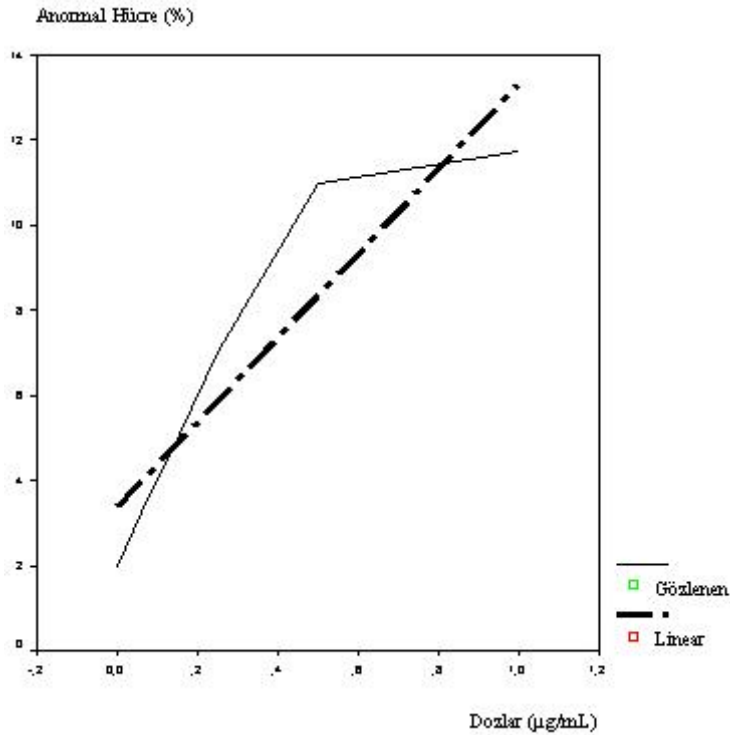


Şekil 3.13. 48 saatlik rosuvastatin uygulamasında dozlara göre anormal hücre yüzdeleri

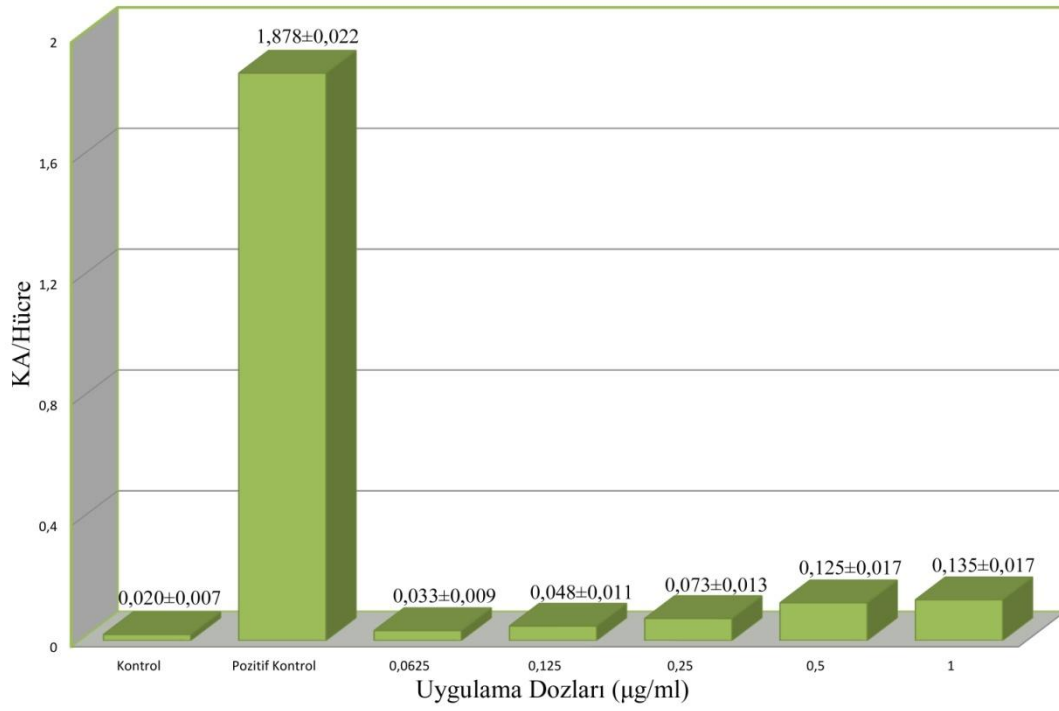
Bu anlamlı artış 0,125 µg/mL'lik uygulama dozunda p<0,05 düzeyinde iken 0,25, 0,5 ve 1 µg/mL'lik uygulama dozlarında p<0,001 düzeyindedir. 48 saatlik kromozomal anormallik testinde elde edilen bulguların istatistiksel olarak analizinde anormal hücre yüzdesinde doz artışı ile orantılı olarak anormalliklerinde arttığı

görülmektedir. Bu doz-etki ilişkisi güçlü bir korelasyona sahiptir ($r=0,92$) (Şekil 3.14).

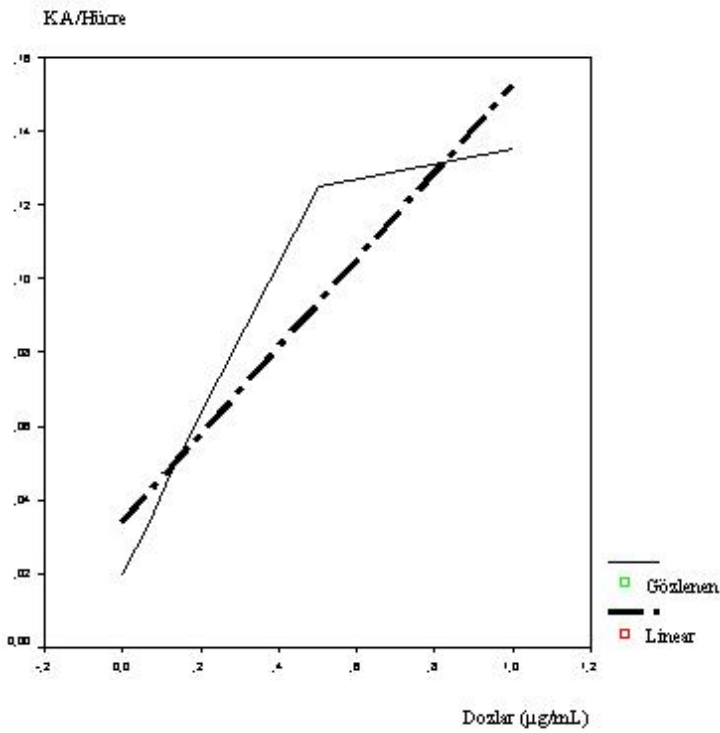
Hücre başına düşen anormallik frekansında da anormal hücre yüzdesi ile benzer sonuçlar gözlenmiştir. 0,0625 $\mu\text{g/mL}$ 'lik doz, kontrol ile kıyaslandığında artış olmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 3.15). 0,125 $\mu\text{g/mL}$ 'lik doz $p<0,05$ düzeyinde anlamlı bulunurken 0,25, 0,5 ve 1 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozlar $p<0,001$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Hücre başına düşen anormallik değeri doza bağlı olarak anlamlı bir korelasyon göstermiştir ($r=0,92$) (Şekil 3.16)



Şekil 3.14. 48 saatlik rosuvastatin uygulamasının insan lenfositlerinde anormal hücre yüzdesinin doza bağlı ilişkisi

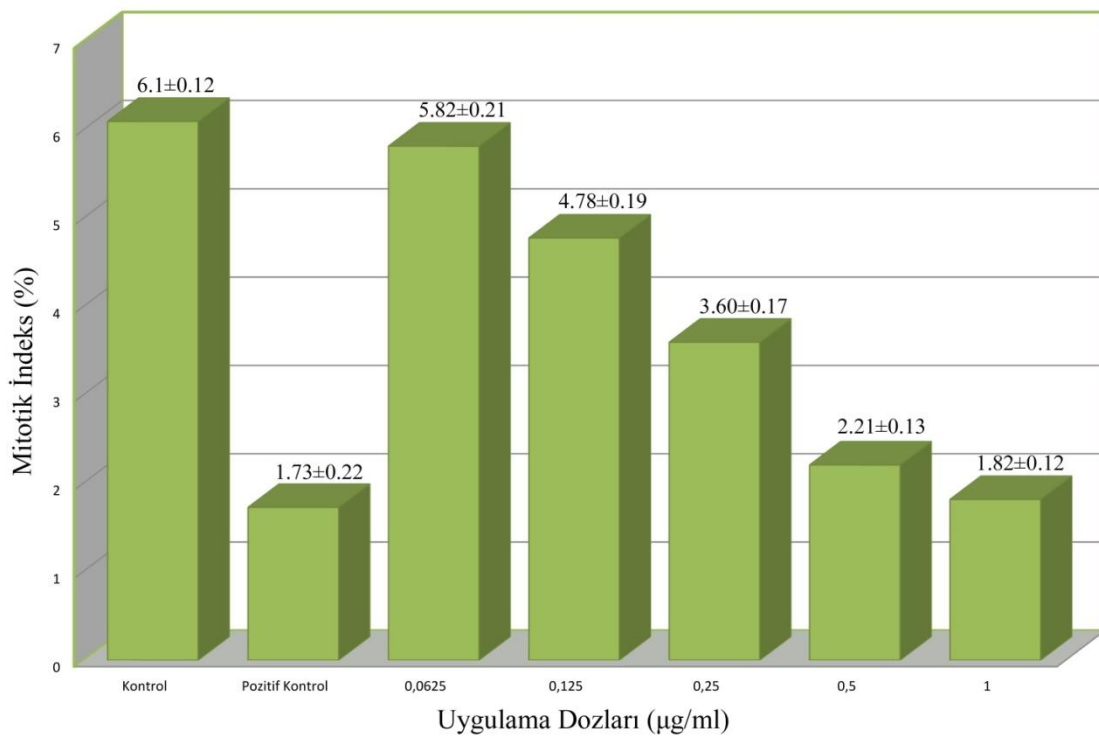


Şekil 3.15. 48 saatlik rosuvastatin uygulamasında hücre başına düşen anormallik miktarı değerleri

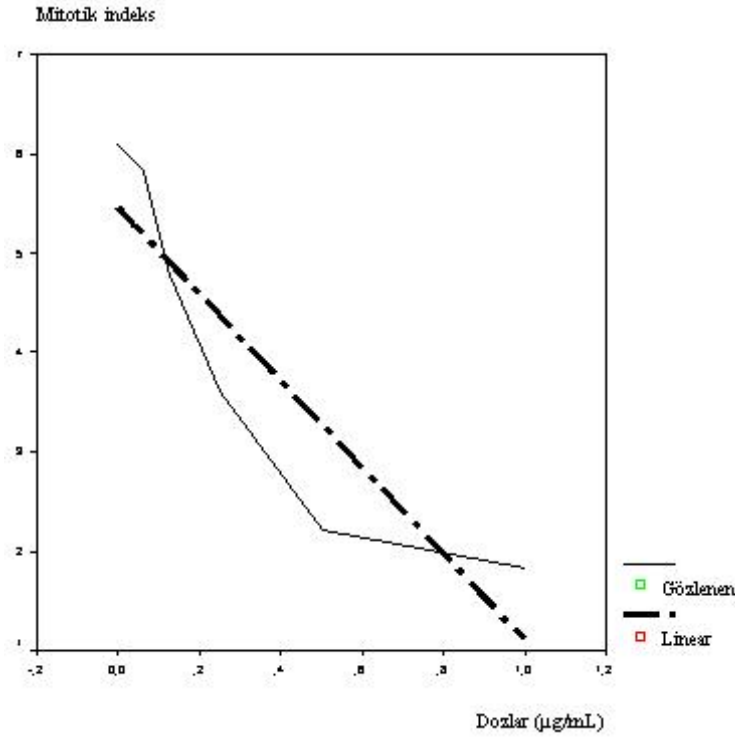


Şekil 3.16. 48 saatlik rosuvastatin uygulamasının insan lenfositlerinde hücre başına düşen anormallik değerlerinin doza bağlı ilişkisi

Her bir doz için 12000 hücrenin incelenmesiyle tespit edilen mitotik indeksin bütün uygulama dozlarında kontrole göre azalma gösterdiği tespit edilmiştir. 0,0625 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda gözlenen bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değilken diğer tüm dozlarda mitotik indeks kontrole göre $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur (Tablo 3.2) 0,0625 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda 5,82 olan mitotik indeks değeri, 1 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda 1,82'ye kadar düşmüştür (Şekil 3.17). Rosuvastatin muamelesi ile yapılan 48 saatlik uygulamada mitotik indeks doza bağlı olarak azalma göstermiştir ($r = -0,90$) (Şekil 3.18).



Şekil 3.17. 48 saatlik rosuvastatin uygulamasında dozlara göre mitotik indeks değerleri



Şekil 3.18. 48 saatlik rosuvastatin uygulamasının insan lenfositlerinde mitotik indeksin doza bağlı ilişkisi

3.2. Mikronükleus

Rosuvastatin uygulamasıyla hazırlanan mikronükleus testinde her doz için her bir bireyden 1500, toplamda ise 6000 binükleat hücre incelenerek mikronükleus frekansları tespit edilmiştir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde mikronükleus frekansında artışlar meydana geldiği belirlenmiştir (Tablo 3.3). Bu artış tüm dozlarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Binükleat hücreler içerisinde 1, 2, 3 ve daha fazla mikronükleusa sahip hücreler tespit edilmiştir. Mikronükleuslu hücreler içerisinde 6 ve 14 mikronükleus içeren binükleat hücreler de tespit edilmiştir. Ayrıca rosuvastatin uygulaması ile apoptoza uğrayan hücreler de gözlemlenmiştir (Şekil 3.19-24). Her bir doz için bir bireyden 500, toplamda ise 2000 hücre sayılması ile belirlenen nükleer bölünme indeksinde elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi yapılmış ve rosuvastatin uygulaması ile nükleer bölünme indeksinin düştüğü fakat bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir.

Tablo 3.3. Rosuvastatin'in insan lenfositlerinde mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi

Madde	Uygulama		Sayılan binükleat hücre	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları			MN (%) ± SH	Nükleer bölünme indeksi ± SH
	Süre (saat)	Kon (µg/ml)		(1)	(2)	(3+)		
				Kontrol	48	0,00		
P. K	48	0,20	6000	844	93	6	17,47±0,49	1,19±0,24
Ros	48	0,0625	6000	25	-	-	0,42±0,08*	1,26±0,25
		0,125	6000	37	-	1 ^a	0,85±0,12**	1,34±0,26
		0,25	6000	48	3	1	0,95±0,13**	1,31±0,25
		0,50	6000	52	2	1 ^b	1,03±0,13**	1,22±0,25
		1,00	6000	72	2	-	1,27±0,15**	1,13±0,24

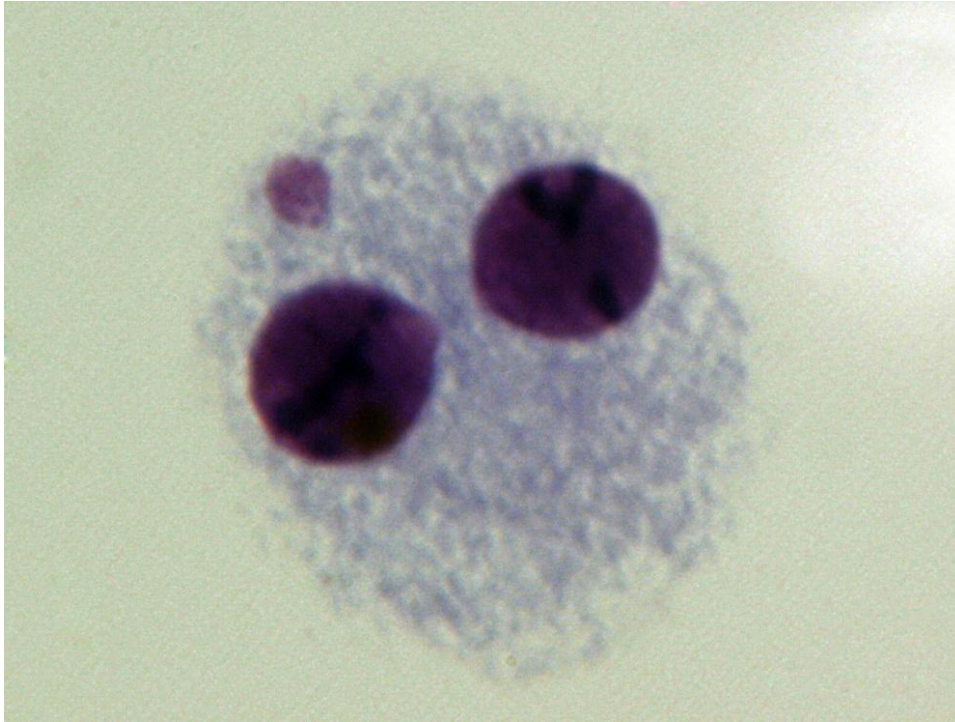
BN: Binükleat hücre, MN: Mikronükleus, Kon: Konsantrasyon, P.K: Pozitif kontrol, Ros: rosuvastatin, s: saat.

^a 14 mikronükleus görülmüştür

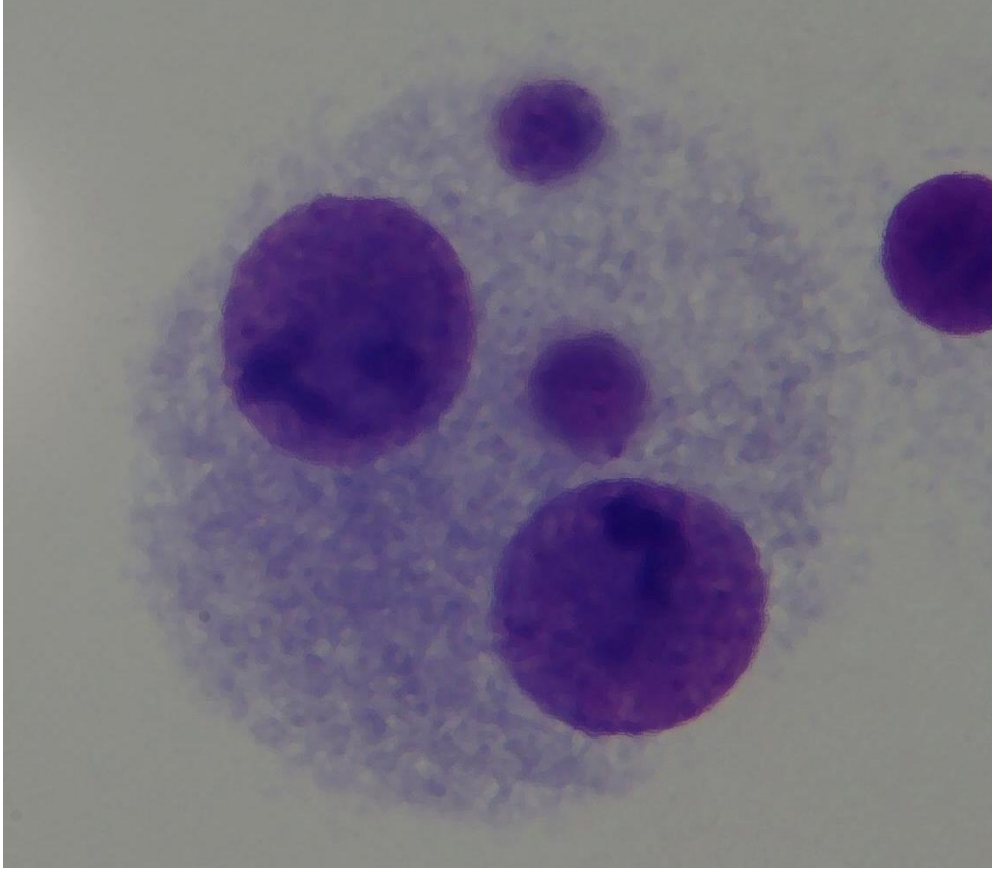
^b 6 mikronükleus görülmüştür

*Kontrole göre $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z-testi)

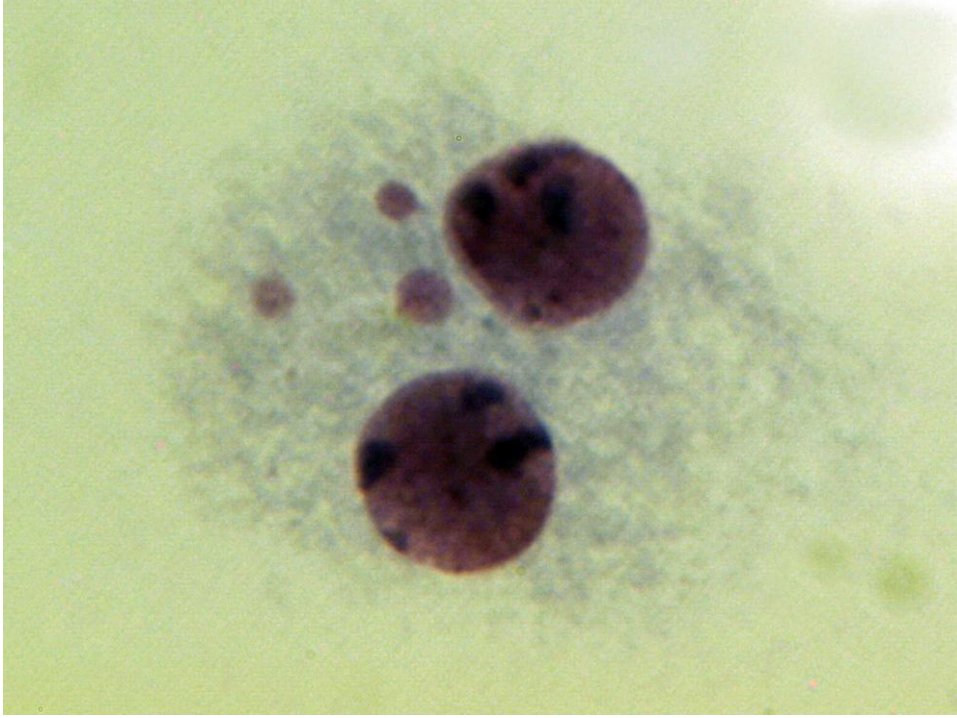
**Kontrole göre $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z-testi)



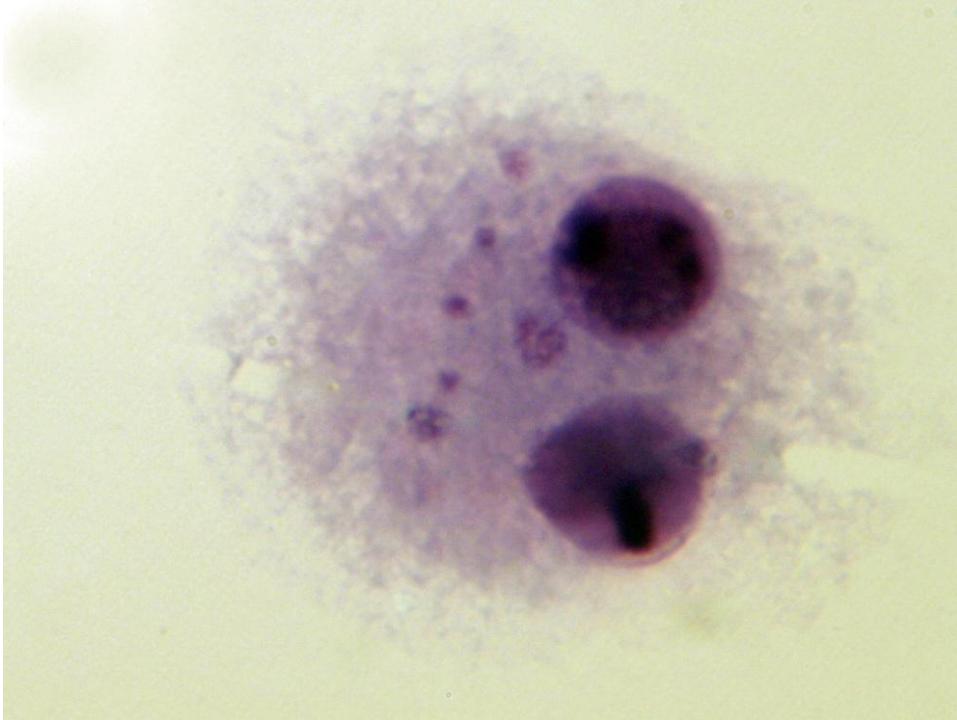
Şekil 3.19. Rosuvastatin uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan 1 mikronükleuslu binükleat hücre



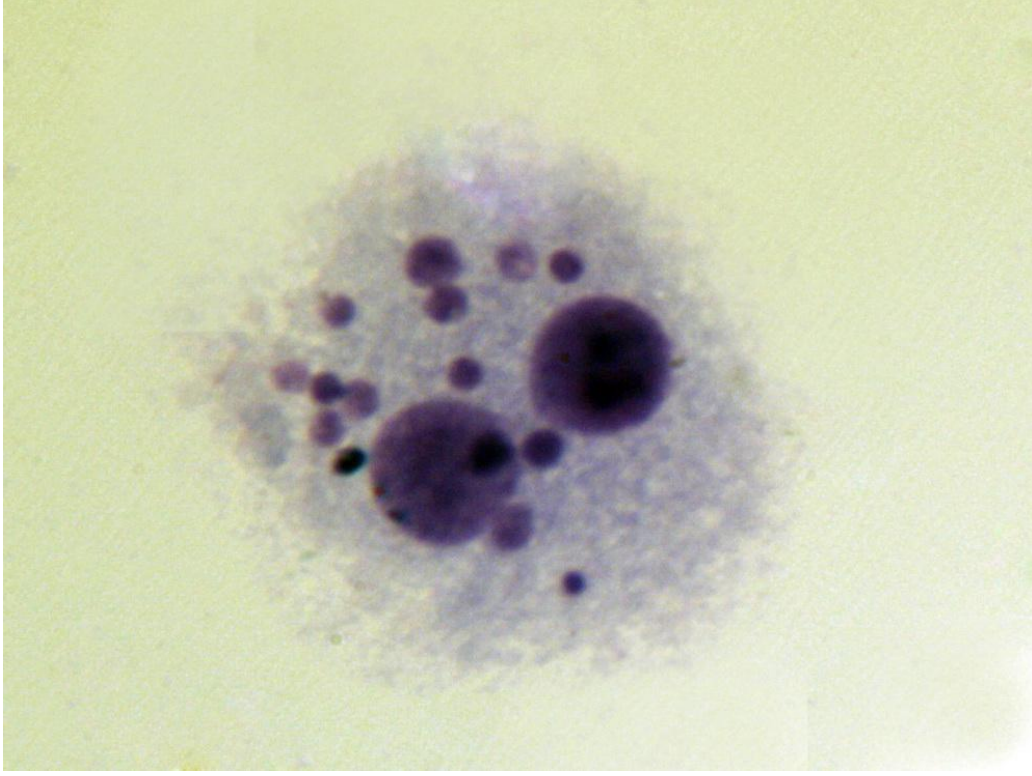
Şekil 3.20. Rosuvastatin uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan 2 mikronükleuslu binükleat hücre



Şekil 3.21. Rosuvastatin uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan 3 mikronükleuslu binükleat hücre



Şekil 3.22. Rosuvastatin uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan 6 mikronükleuslu binükleat hücre

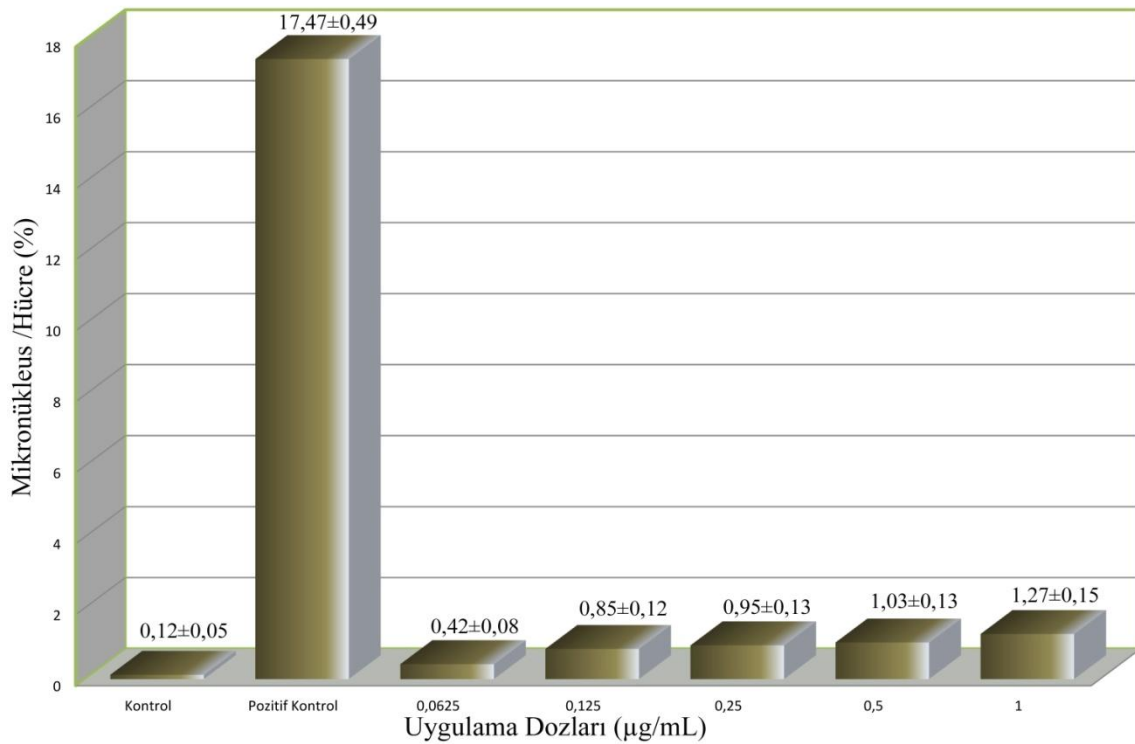


Şekil 3.23. Rosuvastatin uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan 14 mikronükleuslu binükleat hücre

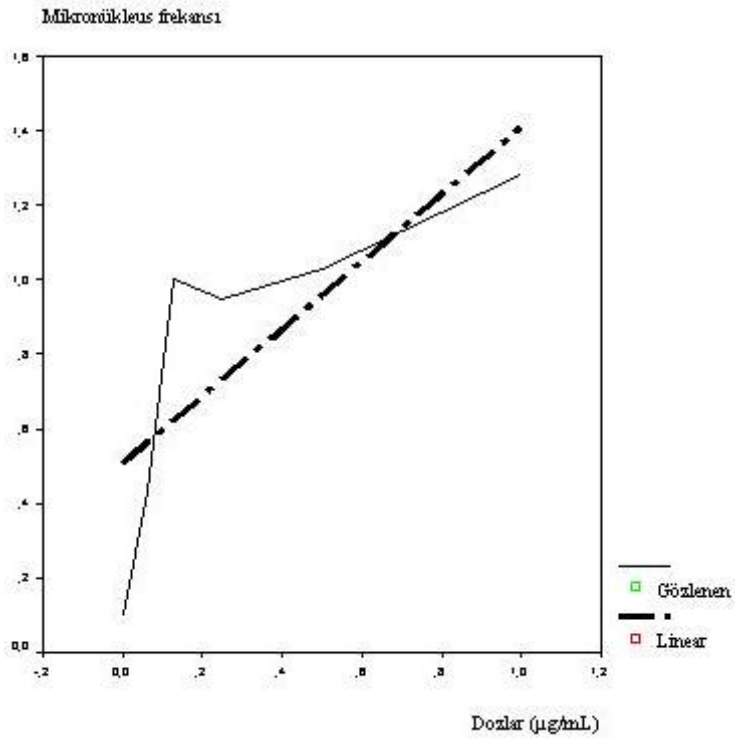


Şekil 3.24. Rosuvastatin uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan apoptotik hücre

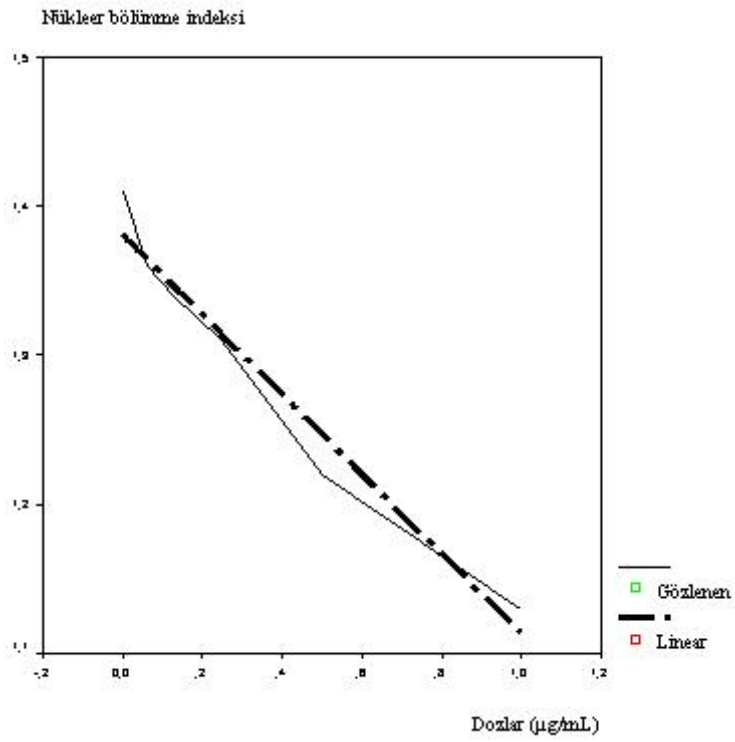
Rosuvastatin uygulaması ile elde edilen mikronükleus frekansları Şekil 3.25’de gösterilmiştir. 0,0625 $\mu\text{g/mL}$ ’lik dozda mikronükleus frekansı kontrole göre $p<0,01$ düzeyinde anlamlı bir artışa neden olurken diğer 4 dozda da kontrole göre $p<0,001$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa sebep olmuştur. Rosuvastatin mikronükleus frekansını doza bağlı olarak arttırırken ($r=0,77$), nükleer bölünme indeksini doza bağlı olarak azaltmıştır ($r=-0,98$) (Şekil 3.26-27).



Şekil 3.25. Rosuvastatin uygulamasıyla insan lenfositlerindeki mikronükleus frekansı



Şekil 3.26. Mikronükleus frekansının doza bağlı ilişkisi



Şekil 3.27. Nükleer bölünme indeksinin doza bağlı ilişkisi

3.3. Tek Hücre Jel Elektrofrezisi (KOMET)

Bu çalışmada rosuvastatin maruziyetinin insan lenfositlerinde yaptığı etkinin incelendiği diğer bir test metodu da tek hücre jel elektrofrezidir. Yapılan bu testte her doz için her bir bireyden 100 toplamda ise bir doz için 400 (4 birey) hücre incelenmiş ve genotoksik hasarın göstergesi olarak seçilen kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametreleri değerlendirilmiştir.

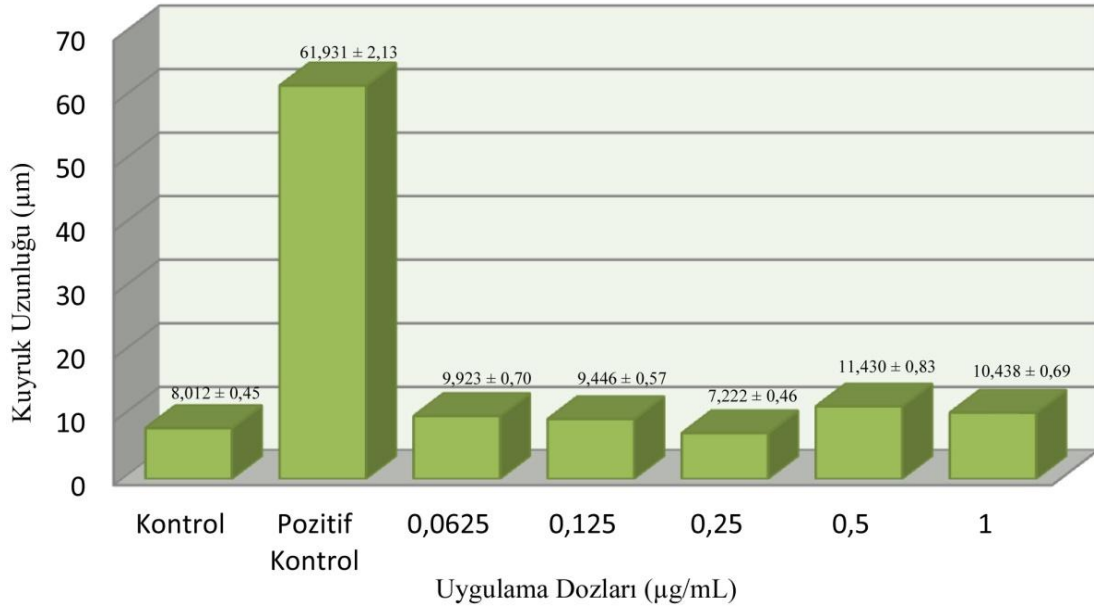
Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde izole edilmiş insan lenfositlerinde komet kuyruk uzunluğu 0,125 ve 0,25 µg/mL'lik dozlarda kontrole göre herhangi bir farklılık göstermemesine rağmen 0,0625, 0,5 ve 1 µg/mL'lik dozlarda kontrole göre anlamlı artışlar göstermiştir. Komet kuyruk yoğunluğu en düşük doz olan 0,0625 µg/mL'lik doz hariç hariç diğer tüm dozlarda (0,125, 0,25, 0,5 ve 1 µg/mL) istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olmuştur. Kuyruk momenti ise kuyruk uzunluğunda olduğu gibi 0,125 ve 0,25 µg/mL'lik dozlarda kontrole göre anlamlı bir farklılık göstermemiş olmasına rağmen 0,0625, 0,5 ve 1 µg/mL'lik dozlarda kontrole göre anlamlı artışlara neden olmuştur (Tablo 3.4, Şekil 3.28-30).

Rosuvastatin ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde hasarsız, az hasarlı, orta hasarlı ve çok hasarlı DNA'ların komet testi ile görünümü Şekil 3.31-34'de gösterilmiştir.

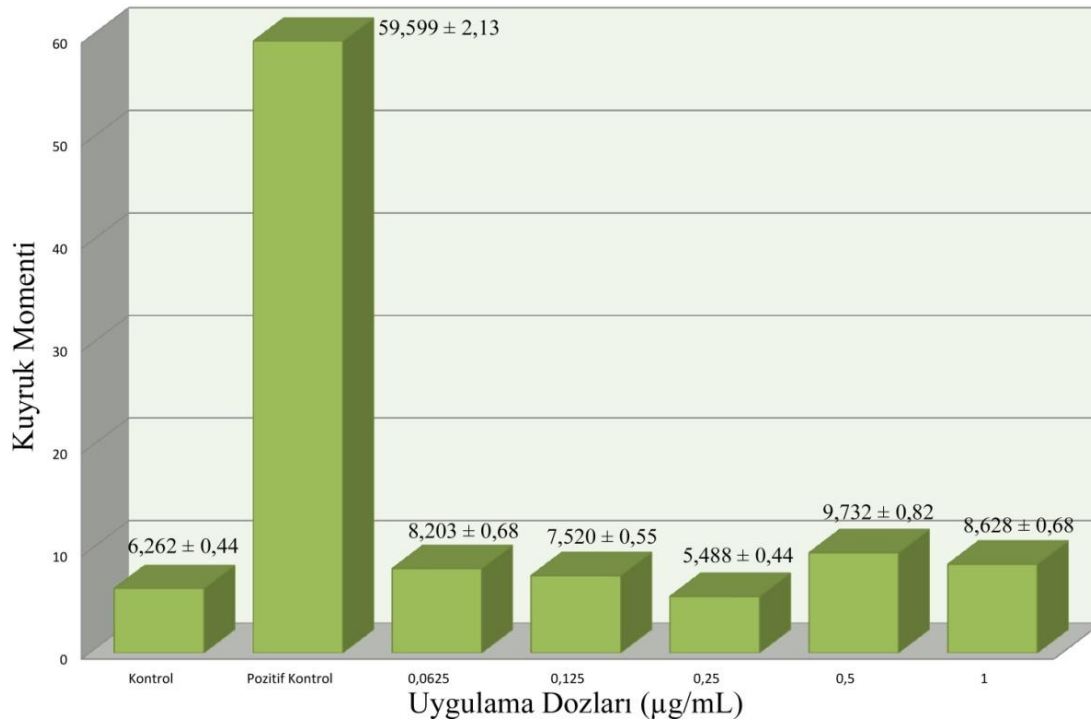
Tablo 3.4. Rosuvastatin ile 1 saat uygulama sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı

Dozlar (µg/mL)	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kuyruk Momenti	Kuyruk Yoğunluğu (%)
Kontrol	8,012 ± 0,45	6,262 ± 0,44	234,771 ± 0,23
0,0625	9,923 ± 0,70*	8,203 ± 0,68*	234,602 ± 0,27
0,125	9,446 ± 0,57	7,520 ± 0,55	236,375 ± 0,25*
0,250	7,222 ± 0,46	5,488 ± 0,44	236,096 ± 0,18*
0,50	11,430 ± 0,83*	9,732 ± 0,82*	236,113 ± 0,26*
1	10,438 ± 0,69*	8,628 ± 0,68*	237,187 ± 0,25*
H ₂ O ₂	61,931 ± 2,13	59,599 ± 2,13	244,239 ± 0,23

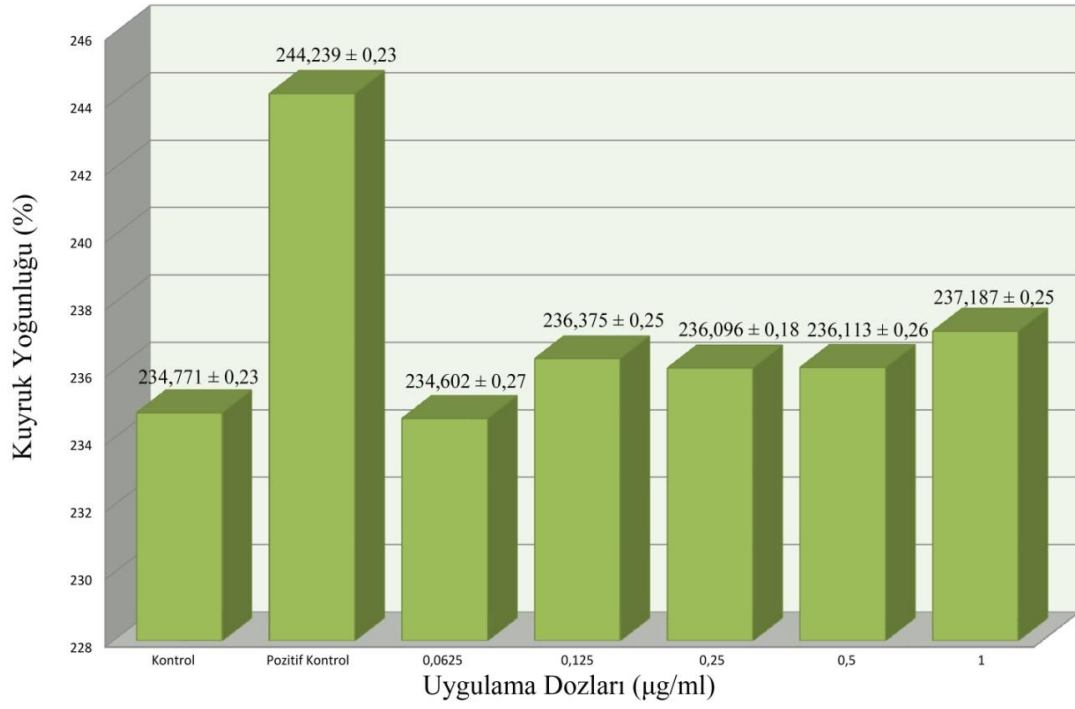
* Kontrole göre anlamlı fark vardır p<0,05



Şekil 3.28. Rosuvastatinin dozlara göre komet kuyruk uzunluğu değerleri



Şekil 3.29. Rosuvastatinin dozlara göre kuyruk momenti değerleri



Şekil 3.30. Rosuvastatinin dozlara göre kuyruk yoğunluğu değerleri



Şekil 3.31. Rosuvastatin ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde hasarsız DNA'nın komet testi ile görünümü



Şekil 3.32. Rosuvastatin ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde az hasarlı DNA'nın komet testi ile görünümü



Şekil 3.33. Rosuvastatin ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan orta hasarlı DNA'nın komet testi ile görünümü

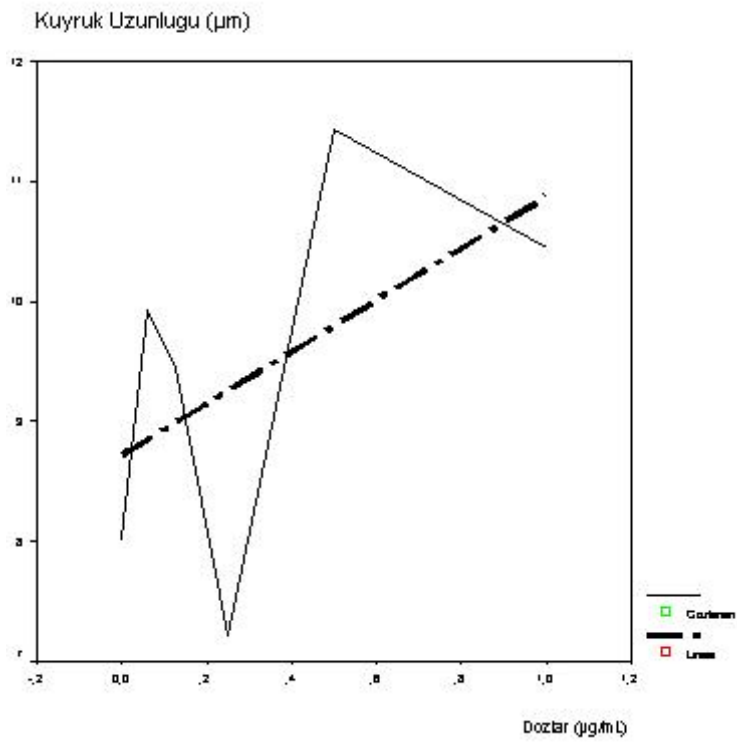


Şekil 3.34. Rosuvastatin ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan çok hasarlı DNA'nın komet testi ile görünümü

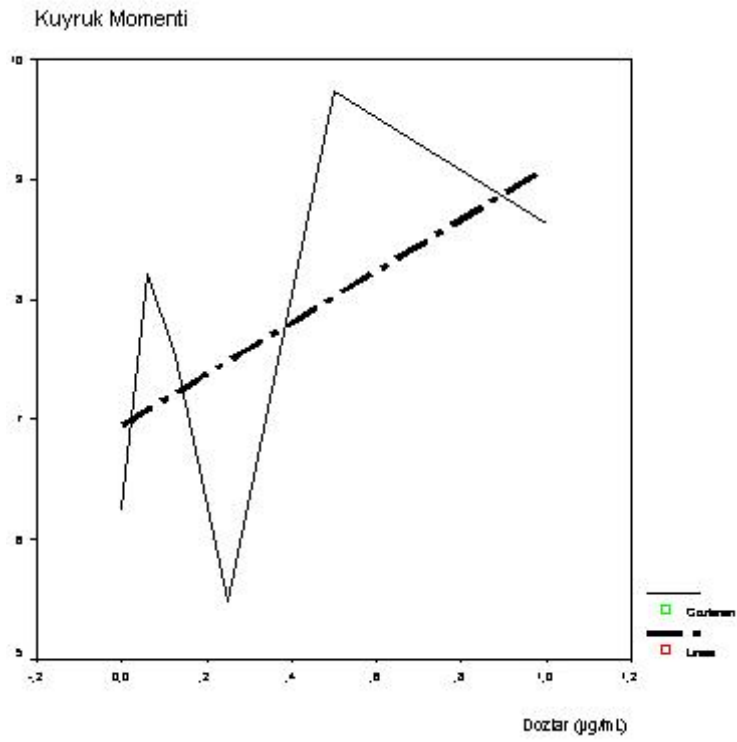
Rosuvastatinin doza bağlı olarak komet kuyruk uzunluğu incelendiğinde doz artışı ile kuyruk uzunluğu arasında çok yüksek olmamakla birlikte anlamlı bir ilişki belirlenmiştir ($r=0,52$) (Şekil 3.35)

Komet kuyruk momenti incelemelerinde de rosuvastatinin doza bağlı olarak kuyruk uzunluğuyla aynı değeri vermiştir ve doza bağlı bir korelasyon göstermiştir ($r=0,52$) (Şekil 3.36).

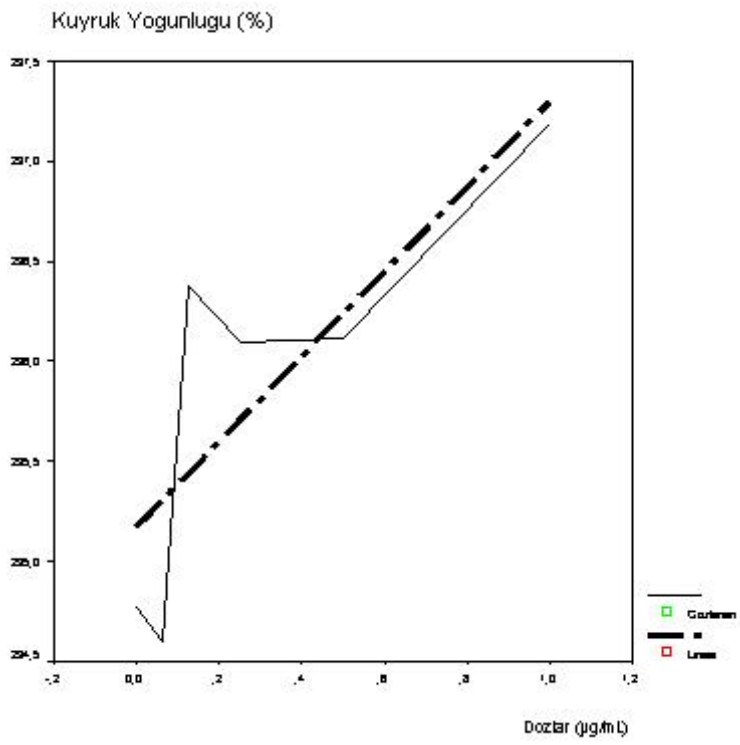
Rosuvastatinin doz artışına bağlı olarak kuyruk yoğunluğunda ise diğer iki parametreye göre daha kuvvetli bir korelasyon gösterdiği belirlenmiştir ($r= 0,81$) (Şekil 3.37).



Şekil 3.35. Kuyruk uzunluğunun doza bağlı ilişkisi



Şekil 3.36. Kuyruk momentinin doza bağlı ilişkisi



Şekil 3.37. Kuyruk yoğunluğunun doza bağlı ilişkisi

BÖLÜM 4. TARTIŞMA

Genotoksisite, fiziksel ya da kimyasal ajanlarla genetik materyalde oluşan hasardır. Bu hasarlar; tek zincir kırıkları (SSB), çift zincir kırıkları (DSB), alkali labil bölgeler (ALS) ve DNA adductlarıdır. Genetik materyalde oluşan hasarlar tamir edilemediğinde DNA sekans değişiklikleri, kromozom aberasyonları ile sonuçlanabilen tek veya birden fazla nükleotid değişiklikleri ve bunların sonucu olarak da rekombinasyon, mutasyon, doku hasarı, yaşlanma ve kanser oluşabilmektedir. Mutasyonlar sıklıkla gen fonksiyonlarında değişiklik ya da kayıpla sonuçlanabilmektedir (Kramer 1998).

Moleküler kanser genetiğindeki son gelişmeler, karsinogenlerin çoğunun genotoksik ve karsinogenezisin onkogenler ve antionkogenlerdeki mutasyonlarla ilişkili olduğunu göstermiştir. Genotoksisite testleri esas olarak kanserden korunmada, çevresel etkenlerin, endüstriyel kimyasalların etkisini araştırmada, ilaçların piyasaya sürülmeden önce toksik etkilerini ve güvenilirliğini araştırmada kullanılmaktadır. Bu testler 1970'lerden beri kullanılmaktadır ve o tarihten günümüze kadar birçok *in vivo* ve *in vitro* genotoksisite testi geliştirilmiştir. Work group of European Union (EU), OECD ve en son olarak Work group of the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) standart seri testler tanımlamışlardır (Kramer 1998, Jena ve ark 2002).

ICH çalışma grubu tarafından önerilen standart testlerden ilk kullanılanları Ames testi, timidin kinaz testi, mikronükleus testi ve daha sonra kullanılmaya başlanılan ve önemi giderek artmakta olan FADU (Fluorescence Analysis of DNA Unwinding), kromozomal translokasyonların gösterilmesinde FISH (fluorescent in situ hybridization), p53 mutasyon tayini, apoptosisin saptanması, antisentromer antikorlar ile anoploidi tayini ve komet yöntemleridir.

Genotoksisite çalışmalarında kullanılan yöntemin başka bir yöntemle desteklenmesi başka bir deyişle bir maddeye genotoksik denmesi için en az iki yöntemle çalışılması önerilmektedir (Kramer 1998).

Yaptığımız bu çalışmada kromozomal anormallik, mikronükleus ve tek hücre jel elektroforezi gibi uluslar arası kuruluşlar tarafından güvenilirliği onaylanmış ve geçerliliği halen devam eden üç farklı test metodu ile insan lenfositlerinde kolesterol düşürücü ilaçlardan statin grubu üyesi olan rosuvastatinin *in vitro* genotoksik etkileri araştırılmıştır.

Çalışmamızda 24 saatlik rosuvastatin uygulanan tüm konsantrasyonlarda kromozomal anormallik frekansı kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır. Rosuvastatin insan lenfositlerinde 6 tip anormalliğe neden olmuştur. Bunlar kromatit ve kromozom kırıkları, fragment, kromatid değişimi, kardeş kromatitlerde birleşme ve disentrik kromozomlardır. Bu anormalliklerden en sık rastlanılan kromatid kırıklarıdır.

48 saatlik rosuvastatin uygulamasında en küçük doz olan 0,0625 µg/mL hariç diğer tüm dozlarda kromozomal anormallik frekansının kontrole göre anlamlı oranda arttığı görülmüştür. 4 farklı kromozom anormalliğinin (kromatit ve kromozom kırıkları, fragment ve kromatid değişimi) tespit edildiği uygulamada en sık rastlanılan anormallik 24 saatlik uygulamada olduğu gibi kromatid kırıklarıdır.

Kromozomal aberasyonlar, genotoksisite çalışmalarının validasyonu için geliştirilmiş yöntemlerden birisidir. Kromozomal anormallikler tekniği tüm genomdaki hasarın izlenmesine imkan tanınması ve maruziyetin değerlendirilmesinde büyük ölçüde uluslararası geçerli standartlara erişmiş olması bakımından önemlidir. Karl Sax tarafından 1930 yılında somatik hücrelerdeki mutasyonun kansere neden olabileceği belirtilmiştir. Bu tespitin ardından mutajenlerin yol açtığı sorunlar ayrıntılı olarak araştırılmaya çalışılmıştır. Etkene maruziyetin kromozomal anomaliye yol açma riskinin saptanmasında, kimyasalların klastojenik aktivitesinin değerlendirilmesinde ve biyogösterge çalışmalarında kromozomlarda görülen değişiklikler oldukça

önemlidir (Tucker ve Preston 1996, Stephan ve Pressl 1999, Rossner ve ark 2005, Mateuca ve ark 2006, Norppa ve ark 2006). Zira hücrelerde ortaya çıkan kromozomal anormalliklerin kanser gelişiminde erken haberci rolü oynadığı bilinmektedir (Bonassi ve ark 1995, Hagmar ve ark 1998, Fenech 2000, Doak ve ark 2012). Benzer şekilde Hagmar ve ark (1994) yaptıkları çalışmada yüksek sıklıkta kromozomal aberasyonlu kişilerde kanser gelişme riskinin daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Bu sonuç kromozomal anormallik ve kanser arasındaki ilişkiyi doğrulamıştır.

Kromozomal anormallik testi kültüre alınmış periferik kan lenfositlerinde kromozomal anormallik frekansının belirlenmesi esasına dayanır. Mesleki olarak ya da çevresel olarak, bilinen ya da şüphelenilen genotoksik maddelere maruziyeti ya da maruziyetin biyolojik etkilerini değerlendirmede en fazla kullanılan yöntemdir. Genetik hasarın boyutunu saptar. Yapısal değişimler, kromozomal anormallik tekniği kullanılarak, mitotik metafaz kromozomlarında değerlendirilir (Çakmak 2000). Kromozom aberasyonları uzun zamandan beri, genotoksik maddelere maruz kalan insanların, bu maddelerden nasıl etkilendiklerinin sağlam bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. İnsan popülasyonları üzerine yapılan çalışmalar, periferik lenfositlerdeki spontan kromozom anormalliklerinin frekansı ile kanser oluşumu arasında doğru orantı (pozitif korelasyon) olduğunu ortaya koymaktadır (Natarajan 2002, Bolognesi 2003, Yüzbaşıoğlu ve ark 2006, Yılmaz ve ark 2008, Doak ve ark 2012). Kullanılan fiziksel veya kimyasal ajanların etkisine göre kromozom kırığı, kromatid kırığı, fragment, disentrik kromozom, kardeş kromatidlerde birleşme (sister union), halka kromozom, kromatidlerde değişim (triradial, quadriradial şekiller), gap, kromozom kontraksiyonu, poliploidi, endoreduplikasyon, translokasyon, inversiyon gibi kromozom aberasyonları meydana gelebilir (Çakmak, 2000; Çelik, 2003). Yakın kromozomlardaki basit kırıklarda, kırık uçlar tekrar birleşebilmekte ve ortaya yeniden düzenlenmiş kromozomlar çıkmaktadır. Bu olay onarıma şeklinde ya da disentrik kromozomlar, translokasyonlar, inversiyon biçiminde olabilmektedir. Daha karmaşık düzenlemeler ise halka şeklinde ortaya çıkabilmektedir. Asentrik fragmentlerin oluşumu ise kromozomlardaki basit kırıklar sonucudur. Kromatid açıklığı olan gap ise kromatid kolundaki soluk boyanmış açıklıklar olarak bilinir, bunlar kromatid koluyla aynı uzantıdadır ve genellikle kromatid koluyla arasındaki

uzaklık kol kalınlığına eşit ya da daha küçüktür (Çakmak 2000). Buna karşın Topaktaş ve Rencüzoğulları (2010) gap yapısının kromozomlardaki spiral çözünmeler olduğunu belirtmiştir.

Çalışma sırasında rosuvastatin uygulamasıyla en fazla görülen anormallikler kromatit kırıklarıdır. Kromatit kırıkları, DNA'da meydana gelen çift zincir kırıkları sonucunda oluşan ve tek bir kromatitte gözlenen kırıklardır. Kromatit kırıkları, uygulanan maddelerin çoğunlukla geç S veya G₂ aşamasında etkili olduğunu göstermektedir (Natarajan 2002).

Bu çalışmada kullanılan rosuvastatinin en fazla neden olduğu ikinci anormallik tipi kromozom kırıklarıdır. Kromozom kırıkları, kromozomların her iki kolunda da gözlenen tamir edilmemiş çift zincir kırıklarıdır (Savage 1993).

Çalışmada hem 24 saat hem de 48 saatlik rosuvastatin uygulamasının her ikisinde de tespit edilen anormallik tipinden biri fragment oluşumudur. Fragmentlerin kromozom ya da kromatitlerde meydana gelen kırılmalar ile genellikle terminal delesyonlar sonucunda oluştuğu bilinmektedir (Kayraldız ve Topaktaş 2001, Yılmaz ve ark 2008). Çalışmamızda meydana gelen fragmentlerin de rosuvastatinin direk veya dolaylı etkisinden dolayı oluştuğu düşünülmektedir.

Her iki uygulamada da görülen bir diğer anormallik tipi ise kromatid değişimidir. Homolog olmayan kromozomların birleşmesi sonucu oluşan bu anormallikte translokasyonlu bölgeler birbirlerine dik açı oluşturacak şekilde artı işaretine benzer bir şekil oluştururlar (Kuru ve Ergene 2011).

Sadece 24 saatlik uygulamada tespit edilen anormallik tiplerinden biri olan kardeş kromatitlerde birleşme, kromozom kolları arasında karşılıklı birleşme olarak gözlenir ve çoğunlukla kromozom uçlarında meydana gelen terminal delesyonlar sonucunda oluşabilir (Kayraldız ve Topaktaş 2001, Yüzbaşıoğlu ve ark 2006).

Disentrik kromozomlar bu çalışmada rosuvastatinin sadece 24 saatlik uygulamasında karşılaşılan anormallik tipidir. Disentrik kromozomlar, homolog olmayan kromozom

kolları arasındaki füzyon ile veya homolog kromozomların iki kısa ya da iki uzun kolu arasındaki füzyon ile gerçekleşebilmektedir (Andersen ve Pedersen-Bjergaard 2000).

DNA ve protein gibi biyolojik açıdan önemli materyallere zarar veren serbest radikallerin DNA üzerine etki ettiği bilinmektedir (Adey 1993). Serbest radikaller DNA ile reaksiyona girerek DNA'da kırıklar oluşturabilir ve bunun sonucunda translokasyonlar, çeşitli kromozomal anormallikler ve doğal olmayan şekilde düzenlenmiş DNA yapılarının ortaya çıkmasına neden olurlar (Lacy-Hulbert 1998). Serbest radikaller endojen kaynaklı olabildiği gibi eksojen olarak da ilaçlar, kirleticiler, metal iyonları ve radyasyon gibi dış etkenler sonucu oluşabilmektedir (Mercan 2004). Çalışmamızda rosuvastatinin insan lenfositlerinde yapısal kromozomal anormalliklerdeki bu artış, rosuvastatinin veya rosuvastatin metabolitlerinin DNA seviyesinde bir hasar oluşturduğunu göstermektedir. Bu etkileşim doğrudan rosuvastatin ve DNA arasında olabileceği gibi, rosuvastatinin metabolitleri ile DNA arasında bir reaksiyon sonucu da meydana gelebilir. Ayrıca rosuvastatin veya metabolitleri direk DNA ile reaksiyona girmenin haricinde haricinde serbest radikal oluşumunu indüklemiş ve DNA'da hasar oluşturmuş olabilir.

Mikronükleus testi *in vitro* ve *in vivo* olarak etki eden endojen ve eksojen ajanların etkilerinin gösterilmesinde kullanılan hassas bir yöntemdir. Çeşitli kimyasal ve fiziksel ajanların klastojenik ve anojenik etkilerini belirlemek için kullanılan yöntemlerden birisi olan mikronükleus testinde amaç sitokinezi bloklanmış hücrede mikronükleus (Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay=CBMN Assay) oluşumlarını gözlemektir (Yılmaz 2008). Mikronükleuslar (MN) hücrede mitoz bölünme sırasında ortaya çıkan, ana çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom parçalarından köken alan oluşumlardır.

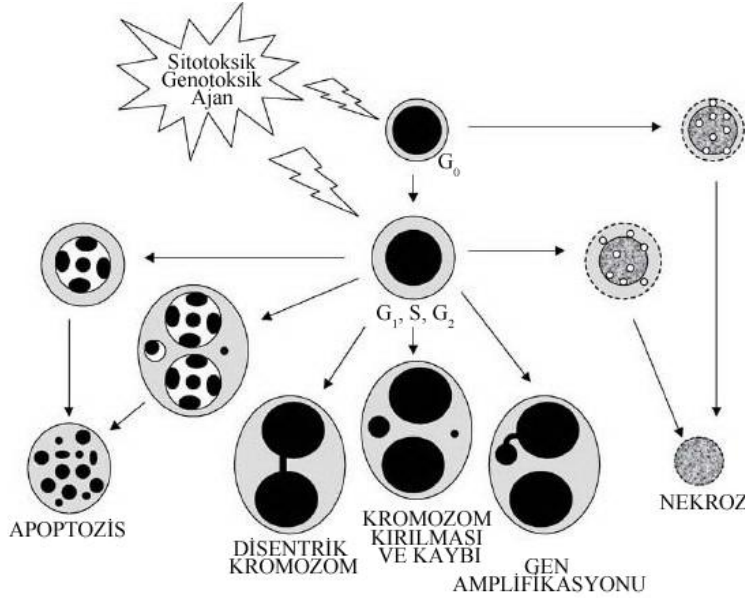
Mikronükleus (MN) yöntemi ilk olarak 1886 yılında anemik kedilerin kırmızı kan hücrelerinde Howell'ın gözlemleriyle ortaya çıkmıştır. 1907'de Jolly, mikronükleusların varlığını doğrulamıştır. Bu yüzden mikronükleuslar, hematolojide Howell-Jolly cisimleri olarak bilinirler (Çakmak 2000). 1950'lerde bitki hücrelerinde

kromozom hasarının ölçülmesinde, 1970'lerde hayvan hücrelerinde ve daha sonra 1976 yılında Haddle ve arkadaşları tarafından kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kimyasal kanserojenleri belirlemeye yönelik bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır (Çakmak 2000; Demirel ve Zamani 2002). Değerlendirmeye alınan hücrelerin bölünme geçirip geçirmediğinin saptanmasının zorluğundan dolayı yöntemin kabul görmesi uzun zaman almıştır. Fenech ve Morley (1985) tarafından mikronükleus yönteminde, sitokinezi durdurmak üzere sitokalsin B (Cyt B) adlı kimyasalın kullanılmasıyla ilk bölünmesini geçirmiş mitotik hücrelerin binükleer görüntülerinin tanınabilmesi bu zorluğun üstesinden gelinmesini sağlamıştır. Migliore ve ark (1989) *in vitro* çalışmalarda izole lenfositler yerine, tam kanın kültüre alınmasını, mikronükleus yönteminde daha iyi deneysel koşulları ve sonuçları sağlaması açısından önermişlerdir.

Cyt B etkisiyle, hücre çekirdeği bölünürken, sitoplâzma bölünmesi (sitokinez) durur ve binükleer hücreler ortaya çıkar. Mikronükleuslar, spontan olarak ya da genotoksik ajanlara maruziyet sonucunda, asentrik kromozomal fragmentlerin ya da tüm kromozomların hücre bölünmesi sırasında, ana çekirdek dışında yavru çekirdek şeklinde kalmasından oluşmaktadır. Mitozun anafazında sentrik elementler kutuplara çekilirken, genotoksik ve/veya anojenik etkiler sonucu ortaya çıkmış asentrik elementler ve iç ipliklerine bağlanamamış kromozomlar kutuplara gidemeyerek, hücre bölünmesi sonunda aynı sitoplâzma içinde, hücre çekirdeğinden ayrı olarak membranla çevrili bir yapı oluşturur (Şekil 4.1) (Çakmak 2000).

Bu çalışmada rosuvastatinin mikronükleus oluşumunu indüklediği belirlenmiştir. Rosuvastatin uygulamasıyla yapılan mikronükleus testinde elde edilen veriler değerlendirildiğinde mikronükleus içeren hücrelerin frekansında artışlar meydana geldiği ve bu artışların tüm dozlarda (0,0625, 0,125, 0,25, 0,5 ve 1 µg/mL) istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Binükleat hücreler içerisinde 1, 2 ve 3 mikronükleuslu hücrelere ek olarak 6 ve 14 mikronükleuslu hücreler de tespit edilmiştir. Ayrıca rosuvastatin uygulaması ile apoptoza uğrayan hücreler de gözlenmiştir. Nükleer bölünme indeksinin rosuvastatin uygulaması ile düştüğü fakat bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir.

Mikronükleuslar, asentrik fragment ve/veya mitozda kutuplara gidemeyen tam bir kromozomdan oluşurlar. Telofazda ayrı kalmış kromozomlar ve fragmentlerin etrafında çekirdek zarı teşekkül eder ve böylece ana nükleusdan daha küçük yapıda olan mikronükleuslar oluşur. Bu metod sadece bölünme özelliği gösterebilen hücrelerde kullanılabilir. Günümüzde mikronükleus metodu; genotoksisite ve



Şekil 4.1. Sitotoksik ve genotoksik ajanların etkisiyle mikronükleus oluşumu, apoptozis ve nekroz (Fenech 2006)

sitotoksisite çalışmalarında; kromozom kırığı, kromozom kaybı, kromozomların farklı şekillenmesi (nükleoplasmik köprüler), hücre bölünmesinin inhibe edilmesi, gen amplifikasyonu, nekrosis ve apoptosisin basit morfolojik ölçütler kullanılarak değerlendirilmesini sağlar (Fenech 2000 ve 2006).

Sitotoksisitenin göstergesi olan mitotik indeksteki düşüş 24 saatlik ve 48 saatlik uygulamalarda farklı derecelerde ortaya çıkmıştır. Rosuvastatin 24 saatlik uygulamada 0,5 ve 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik dozlarda mitotik indeksi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşmüştür. 48 saatlik uygulamada ise 0,125, 0,25, 0,5 ve 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik dozlarda anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Mitotik indeksteki düşüşün her iki uygulamada farklı olması, rosuvastatinin özellikle uygulama süresinin artmasına bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiğinin kanıtıdır. Bu çalışmada rosuvastatinin sitotoksik etkisinin G2 ve profaz evresini etkileyerek oluşturduğu düşünülmektedir. Fakat bu etki ATP seviyesinin düşüşüne bağlı olarak enerji üretim merkezlerinin baskılanmasından (Jain ve Andsorbhoy 1988, Epel 1963) ya da DNA polimeraz gibi

mitotik iğ ipliklerinde etkili olan çeşitli enzim yapılarının bozulmasından kaynaklanmış da olabilir (Hidalgo ve ark 1989, Yüzbaşıoğlu ve ark 2006).

DNA'da klastojenik etki ortaya çıkaran çeşitli kimyasal ajanların, bu etkilerini belirlemek için hızlı ve kolay test yöntemleri geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu geliştirilmeye çalışılan test tekniklerinden birisi de tek hücre jel elektroforezi veya komet testidir. Komet testi son yıllarda geliştirilen, oldukça güvenilir bir test yöntemidir. *In vitro* ve *in vivo* yöntemle birçok hücrede (Tablo 4.1), çeşitli maddelerin etkisi ile meydana gelen DNA hasarının belirlenmesinde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Yılmaz 2008).

Tablo 4.1. Komet tekniği kullanılarak incelenebilecek hücre tipleri (Ünal 1998)

Doku	
İnsan Dokuları	Hayvan Dokuları
Kan (Lenfositler, T hücreleri, Granülositler)	Lenfositler
Epitelyum (Lens, mukoza)	Splenositler
Fibroblastlar (Deri)	Timositler
Spermatositler	Kemik İliği
Adenokarsinoma	Beyin
Lenfoma	Böbrek
	Karaciğer
	Mide
	Pankreas
	İdrar kesesi
	Kolon
	Embriyo
	Akciğer
	Mukoza epiteli
	Testis
Kültür	
İnsan Hücre Kültürü	Hayvan Hücre Kültürü
Kan	Hamster (CHO, HIT , T15, V-79)
Karsinoma	Fare (FO, L5178Y)
Meme keratinositleri	
Melanoma	
Glioma	
Fibroblast	

Canlı hücrelerde DNA tek sarmal kırılmalarının tespiti ilk kez Rydberg ve Johanson (1978) tarafından gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu metod Ostling ve Johanson (1984) tarafından modifiye edilmiştir. Ostling ve Johanson (1984), agarozla süspanse edilen hücreleri lam üzerine yayarak, yüksek tuz ve deterjanla lize etmişler ve ardından elektroforeze tabi tuttuktan sonra akrinin oranla boyamışlardır. Eğer DNA kırık içeriyorsa, çekirdekte anoda doğru göç ederek kuyruklu yıldız görünümünü vermektedir. Bu nedenle hasarlı hücrelere komet yani kuyruklu yıldız adı verilmiştir. Fakat DNA çift sarmal kırıklarının tespitine izin veren nötral şartlar, tek sarmal kırıklarının belirlenmesine izin vermemektedir. Oysa, DNA'da hasar oluşturan çoğu ajan, DNA çift sarmalından çok, DNA tek sarmalında hasar meydana getirmektedir. Bunun yanında nötral şartlarda proteinler tam olarak uzaklaştırılmamaktadır. Bu nedenlerden dolayı, Singh ve ark (1988) tarafından alkali şartlar altında DNA tek zincir kırıklarının tespitine izin veren teknik geliştirilmiştir. Kullanılan daha güçlü lizis koşulları, proteinlerin %95'inden fazlasını çöktürebilmektedir (Ünal 1998).

DNA'da meydana gelen kırılmaların artmasıyla, DNA parçaları komet kuyruğu içine göç etmektedir. Daha hasarlı olan apoptotik hücrelerde ise baş ve kuyruk tamamen dağılmış ve hedgehog (kirpi) olarak isimlendirilmiştir (Fairbairn ve ark 1995). Bu tekniğin; az sayıda hücre gerektirmesi, değişik hücre ve dokulara uygulanabilmesi, hassas, hızlı ve güvenilir olması genotoksisite araştırmaları içerisinde oldukça fazla düzeyde kullanılmasına neden olmaktadır (Singh ve ark 1988; Ünal 1998; Tice ve ark 2000).

İnsan lenfositlerini kullanarak yaptığımız *in vitro* komet çalışmasında rosuvastatin kuyruk uzunluğunu ve kuyruk momentini 0,0625, 0,5 ve 1 µg/mL'lik dozlarda kontrole göre anlamlı bir şekilde arttırırken kuyruk yoğunluğunu ise 0,125, 0,25, 0,5 ve 1 µg/mL'lik dozlarda kontrole göre anlamlı bir şekilde arttırmıştır.

Komet testi DNA tek zincir kırıklarını ve tamamlanmamış DNA tamir bölgelerini gösteren hassas, basit ve hızlı bir genotoksisite testi olarak kabul görmektedir ve birçok sistemde doku veya kültüre edilmiş hücrelerde kullanılabilir (Tablo

4.1) (Ross ve ark 1995, Tice ve Vazquez 1998, Tice ve ark 2000, Sasaki ve ark 2002). Genetik toksikolojide, apoptosis ve DNA tamiri çalışmalarında sıklıkla kullanılan bu yöntem ile hemen hemen tüm hücrelerde DNA hasarı direkt olarak belirlenebilmektedir.

Önde gelen ve kabul gören tedavi kılavuzları, günümüzde özellikle kardiyovasküler hastalıkların tedavisi için çok yüksek risk grubundaki bireylere kolesterol seviyesi bakımından oldukça düşük hedef değerler getirmektedir (Grundy ve ark 2004). Statinler bu eşiklere ulaşmayı hedefleyen tedavi yaklaşımlarında da önceliklerini korumaktadır. Bu yaklaşımlar daha yüksek dozda statin kullanımı, statinlerin diğer lipid düşürücü ajanlarla kombinasyonu ve daha potent statinlerin kullanımı olarak özetlenebilir (Üresin ve Sabırlı 2007). Fakat statinlerin bu şekilde kullanımları beraberinde kuşkuları da getirmektedir. Süzen ve Uçkun (2010) yaptıkları çalışmada potent statin kullanımı veya kombinasyon tedavisinde statinlerin çok ciddi yan etkilerinin olabileceğini belirtmişlerdir. Aynı çalışmada araştırmacılar, statinlerin lipid düşürücü etkilerinin artırılması için doz yükseltilmesi veya bu ilaçlar ile etkileşime sahip ilaçların aynı anda kullanılmasının bugün için çok rastlanılan bir durum olduğunu belirtmişlerdir. Yüksek dozda statin uygulaması ile yapılan toksisite testlerinde statinlerin birçok toksik etki meydana getirdikleri bilinmektedir. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da rosuvastatin her üç deneyde toksik bir profil çizmiştir ve bu toksik profil dozların artışı ile doğru orantılıdır.

Kolesterol düşürülmesinin gerekliliği, statinlerin kolesterol düşürülmesindeki önemli rolü ve ayrıca statinlerin kolesterol haricinde birçok hastalık veya travmada yani pleotropik olarak çok faydalı olduğunu savunan birçok bilim insanına karşın, yüksek kolesterol miktarının zararlı olmadığını savunan, statinlerin gereksiz olduğunu düşünen bilim adamları da mevcuttur. Ravnskov (2012), yüksek kolesterol miktarının zararlı olmayacağını belirtmiştir. Araştırmacı aynı çalışmasında kolesterol yüksekliğinin kötü gösterilmesinin kolesterol düşürücü ilaçları pazarlayan şirketler için çalışan bilim adamlarının ortaya attığını ve bunun amacının şirketlerin kar marjını arttırmak olduğunu belirtmiştir.

Anitschkow ve Chaladow (1913) yaptıkları çalışmada yüksek kolesterol diyetiyle beslenen tavşanlarda hiperkolesterolemi oluştuğunu gözlemlemiş ve kolesterol ile ateroskleroz arasındaki ilişkiyi kuvvetlendirmişlerdir. Günümüzde de yüksek kolesterol daima kalp krizi başta olmak üzere kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Buna karşın Ravnskov (2012) tavşanlarda yapılan bu çalışmada tavşanların otobur oldukları ve vücutlarında kolesterol reseptörleri taşımadıkları için tavşanların atardamarlarının yapısının değişmesinin bu şartlar altında çok normal olabileceğini belirtmiştir. Aynı çalışmanın babunlarda veya sıçanlarda benzer sonuçlar vermeyeceğini ifade etmiş ve tavşanlar ile yapılan bu çalışmanın insanlarda kolesterol miktarı ile ateroskleroz arasındaki ilişkinin gösterilmesine katkıda bulunmayacağını söylemiştir. Nitekim Ridker ve ark (2008) yaptıkları çalışmada da kalp krizi geçiren insanların yaklaşık yarısının kolesterol değerlerinin son derece normal olduğunu belirtmişlerdir. Damar sertliğine bağlı kalp krizlerinin normal kolesterol seviyelerinde görülmesinin çok olağan bir durum olduğunu Haidari ve ark (2001) yaptıkları çalışmada belirtmişlerdir. Dolayısıyla kolesterolün yüksek ya da düşük seviyelerde olması, kişinin kalp krizi geçirip geçirmeyeceğini göstermesi açısından pek fazla anlam taşımamaktadır (Durmuş 2009).

Statinlere bağlı, klinik açıdan en önemli yan etkiler hepatotoksisite, rabdomiyoliz ve ilaç etkileşimleridir. Bunların dışında gastrointestinal bozukluklar, baş ağrısı, döküntü, periferik nöropati ve uyku bozuklukları da görülebilmektedir. Statin kullanan hastalarda kas güçsüzlüğü, miyalji (kas ağrısı) gibi spesifik olmayan semptomlardan, rabdomiyoliz sonucu gelişen akut böbrek yetmezliğine kadar uzanan bulgular görülebilmektedir. Statinlere bağlı miyalji gelişme riski %2-11, miyozit riski %0,5, rabdomiyoliz gelişme riski %0,1 civarındadır (Hansen ve ark 2005).

Statinlere bağlı rabdomiyoliz gelişiminde bazı ilaçların beraber kullanılması riski artırmaktadır. Hidroksimetil glutaril koenzim-A redüktaz inhibitörü olan statinlerin metabolizmasında sitokrom P 450 sisteminde yer alan CYP3A4 kullanılmaktadır. CYP3A4 inhibitörü olan siklosporin, gemfibrozil, niasin, makrolid antibiyotikler, digoksin, anti-fungal ilaçlar ve varfarin, statinlere bağlı rabdomiyoliz riskini artırmaktadır (Ballantyne ve ark 2003).

Statin ile ilgili yapılan çalışmaların sonuçları incelendiğinde kolesterol düşürücü etkinin önemli olmadığı, hatta bir dezavantaja sebep olduğu da savunulmaktadır. Üstelik statinlerin sağladığı yararların oldukça minimal ve önemsiz olduğu ve sadece küçük bir hasta grubunda faydalı olduğu da belirtilmiştir. Ayrıca araştırmacıların ve ilaç şirketlerinin bu faydaları abarttığı ve aynı zamanda statinlerin yan etkilerini önemsiz gösterdiklerini Ravnskov (2012) çalışmasında belirtmiştir. Araştırmacı yine aynı çalışmasında İskandinav simvastatin hayatta kalma çalışması (SSSS 1994) diğer adıyla 4S (Scandinavian simvastatin survival study) çalışmasının bu şekilde olduğunu ileri sürmüştür. SSSS (1994) çalışması toplam ölüm oranı ile ölümcül ve ölümcül olmayan kalp krizlerinin azaltılması konusunda başarı elde eden ilk kolesterol düşürme çalışmasıdır. Bu klinik çalışma yarısı placebo hapi verilen ve diğer yarısı ise simvastatin ilacı alan kişiler üzerinde yapılmıştır. Çalışma Merck laboratuvarlarında yapılmış ve 4444 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. 5 yıl sonra tedavi grubundaki %5'e karşılık kontrol grubunda kalp krizi nedeni ile ölüm oranının %8,5 olduğu tespit edilmiştir. Fakat bu oran sadece erkek hastalarda bu şekilde olmuştur. Kadın hastalarda her iki grupta da kalp krizi nedeniyle ölümlerde sayılar eşittir. Bir süre sonra daha kapsamlı bir şekilde yapılan başka bir çalışmada aynı tip katılımcılara, aynı ilaçlar aynı dozda verilmesine ve kolesterolün aynı oranda düşürülmesine karşılık sonuçların 4S çalışmasının ancak yarısı kadar başarılı olması bu grup ilaçlardaki şüpheleri arttırmıştır (Ravnskov 2012). Daha sonra yapılan diğer çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Shepherd ve ark 1995, Sacks ve ark 1996, LIPID 1998).

Bazı araştırmacılar statinlerin kolesterolü düşürme özelliğinin yanında pleotropik birçok özelliğinin olduğunu belirtmişlerdir. Alzheimer hastalığı, multipl sklerozis ve kronik böbrek hastalığında önleyici ve tedavi edici faydalarının olduğu çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (Sparks ve ark 2005, Agarwal ve Curley 2005). Statinlerin kolesterolü düşürme özelliğine ek olarak farklı faydalarının olduğunu açıklayan çalışmaların yanında statin tedavisi alan hastaların belleklerinde gerileme olduğunu açıklayan çalışmalar da mevcuttur (Muldoon ve ark 2000). Ayrıca yüksek kolesterole sahip olan kişilerde Parkinson hastalığı ve bunama olgularının, düşük kolesterolü olan kişilere oranla çok daha az meydana geldiği belirtilmektedir (Mielke ve ark 2005, de Lau ve ark 2006). Benzer şekilde FDA (2012)'nin raporlarına göre

statinlerin hafıza kaybı, unutkanlık ve buna benzer yan etkilere sebep olduğu belirtilmiştir. Ayrıca statinlerin Alzheimer hastalığını önlediğini açıklayan araştırmaların aksine yüksek kolesterol seviyelerine sahip insanlarda Alzheimer hastalığının çok daha az görüldüğü bildirilmiştir (Schalk ve ark 2004).

Kolesterol ile ilgili olarak önemli noktalardan biride kolesterol seviyesi değerleridir. Yüksek kolesterol insanda hastalık olarak görülmektedir. Üstelik kolesterol üst sınırıda sürekli aşağılara çekilmektedir (Ravnskov 2012). Kolesterol seviyesinin aşağılara çekilmesi dolayısıyla kolesterol hastası olma potansiyeli artmaktadır. Bu durum erken yaşlarda tedavi olma ve ileri yaşlarda daha fazla ilaç kullanma anlamına gelmektedir ki bu da birçok yan etkiye maruz kalma anlamını taşımaktadır.

Statinlerin kaslar üzerine yaptığı etkilerle ilgili çalışmalar mevcuttur. Garrett (2001) yaptığı çalışmada statin kullanımıyla miyositlerin hücre membranlarındaki kolesterolün azalmasının membran stabilitesini etkileyip miyopatiye sebep olabileceğini belirtmiştir. Bu da statinlerin masum olmadığını ve sağlığa zararlı olabileceğini düşündürmüş, bazı soruları gündeme getirmiştir. Benzer şekilde Smith ve ark (1991) HMG KoA redüktaz inhibitörlerinin terapi sonrasında özellikle erkeklerde iskelet kaslarında toksik bir etkiye sebep olduklarını belirtmişlerdir. Kaufmann ve ark (2006) rat iskelet kası hücre hatlarında yaptıkları mitokondriyal toksisite çalışmasında serivastatin, fluvastatin, atorvastatin ve simvastatinin toksisite değerlendirmesini yapmışlar ve 100 µmol/L'lik dozun bu hücre hatlarında hücrelerin %27-49'unun ölümünü indüklediği belirtmişlerdir. Serivastatin, fluvastatin ve atorvastatinin 100 µmol/L lik dozlarda mitokondriyal hücre membran potansiyelini %49-65 oranları arasında düşürdüğünü belirlemişlerdir. Nakahara ve ark (1998) yaptıkları çalışmada 4 hafta boyunca 50 mg/kg/gün şeklinde gavaj yoluyla tavşanlara verdikleri simvastatinin tavşanların kas dokusunda nekroza ve kanda yüksek seviyelerde kreatin kinaz seviyelerine neden olduklarını belirtmişlerdir. Westwood ve ark (2005) simvastatin ve serivastatinin HMG KoA redüktazı inhibe etmelerini takiben kaslarda nekrotik olguların oluşmasına neden olduklarını belirtmişlerdir.

Statinlere bağlı kas hasarının oluşum mekanizması tam bilinmemekle birlikte, kas hücre enerji üretiminde önemli rol oynayan koenzim Q10 (Ubikinon)'nun sentezinin

azalmasından sorumlu tutulmaktadır (Ghirlanda ve ark 1993). Koenzim Q10 yağda eridiğinden tüm hücre zarlarında bulunabilen ve yağları taşıyan proteinlerin yapısında bulunan, hücre içerisinde enerji sentezinde görev alan antioksidan özelliği olan vitamin benzeri doğal organik bir maddedir (Özata 2008). Ubikinon, kolesterol sentez yolunda asetil-CoA'dan mevalonat ve farnezilpirofosfat üzerinden sentez edilir. Koenzim Q10 canlı sistemler için önemli bir yere sahiptir. Navas ve ark (2007) koenzim Q10 maddesinin antioksidan özelliğinin olduğunu ve çeşitli hücre içi sinyal iletim yollarının düzenlenmesinde görev aldığını belirtmişlerdir. Koenzim Q10 sentezinin öncülü olan melavolatın sentezi çeşitli tansiyon ilaçları ve statinler tarafından bloke edilebilmektedir (Kishi ve ark 1977, Mortensen ve ark 1997). Statinler HMG KoA redüktaz inhibisyonu sonucu koenzim Q10'un serum seviyesini %40 oranında azaltmaktadır (Ghirlanda ve ark 1993). Satoh ve ark (1995) yaptıkları çalışmada bu azalmanın bazı hayvanlar üzerinde kardiyak hastalıkların oluşmasına neden olduğunu belirtmiştir. Bliznakov ve Wilkins (1998) statinler tarafından koenzim Q10 inhibisyonunun insanlarda da miyopatik problemlere neden olabileceğini belirtmişlerdir. Yalçın ve ark (2004) koroner arter hastaları üzerinde yaptıkları çalışmada bu hastalığa sahip insanlarda koenzim Q10 düzeyinin düştüğünü bildirmişlerdir. Rusciani ve ark (2006) yaptıkları çalışmada deri kanseri olan hastalarda ve hatta metastaz olgusu gösterenlerde koenzim Q10 seviyesinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğunu belirtmişlerdir. Bu açıklamalar ışığında statin kullanımının Koenzim Q10 serum seviyesini düşürdüğü düşünüldüğünde statin kullanımının kolesterol dışında daha birçok faktör göz önüne alınarak değerlendirilmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Statin grubu üyesi olan ilaçların toksisite profilini belirlemek üzere yapılan çalışmalarda mevcuttur. Vural ve Tuğlu (2011) tarafından yapılan bir çalışmada Nöroblastoma NB2a hücre hatları üzerinde statin grubu üyesi olan lovastatin, mevastatin ve atorvastatinin toksik profili değerlendirilmiş ve araştırmacılar lovastatinin 3 μ M'lık konsantrasyonda, mevastatin ve atorvastatinin 10 μ M ve üstü konsantrasyonlarda nörotoksik bir etkiye sebep olduklarını belirtmişlerdir.

Statinlerin apoptozisi indüklediğini belirten çalışmalar mevcuttur. Apoptoz ve statin ilişkisinin çalışıldığı hücre hatlarından birisi T hücreleridir. T hücrelerinin

apoptozisinin, ekstrinsik (hücre dışı) ve intrinsik (hücre içi, mitokondri bağımlı) hücre ölümü yolağının her ikisiyle de olabileceği belirtilmiştir (Krammer ve ark 2007). $CD4^+CD2^{null}$ T hücreleri IFN- γ ve sitolitik protein salgılayabilen $CD4^+$ T hücre ailesinin bir alt kümesidir. $CD4^+CD2^{null}$ lenfosit grubu ileri yaşlarda sayısı artmasına rağmen sağlıklı bireylerde nadir bulunan bir lenfosit grubudur. $CD4^+CD2^{null}$ hücrelerinin sayısının akut koroner sendrom, kronik infeksiyon gibi hastalıklara sahip bireylerde yüksek olduğu belirlenmiştir (Weyand ve ark 1998, Liuzzo ve ark 1999, Liuzzo ve ark 2000, Vallejo ve ark 2004). Bu hücreler ayrıca akut koroner olayların tekrarlanmasında, inme ve ölümlerde rol almaktadır (Liuzzo ve ark 2007, Nadareishvili ve ark 2004). Ayrıca sürekli bir şekilde bulunmaları kardiyovasküler ölümlerin artmasını sağlar (Gerli ve ark 2004). $CD4^+CD2^{null}$ hücreleri $CD4^+CD2^+$ hücrelerine göre daha fazla süre yaşarlar. Bunun nedenini (10) yaptıkları çalışmada $CD4^+CD2^{null}$ hücrelerinde anti-apoptotik bir molekül olan FLIP'in (Fas inhibe edici protein, ekstrinsik yolda görev alır) yüksek miktarlarda bulunması ve dolayısıyla bu durumun apoptozise karşı bir dayanıklılık oluşturduğunu belirtmişlerdir.

Link ve ark (2011) yaptıkları çalışmada akut koroner sendromlu hastalarda rosuvastatin uygulamasıyla $CD4^+CD2^{null}$ hücrelerinde apoptozisi değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada $CD4^+CD2^{null}$ T hücrelerinde rosuvastatin uygulamasıyla bir gerileme olduğu belirtilmiştir. Bu redüksiyonun da rosuvastatinle yapılan tedavi sonucu apoptotik yolağın indüklenmesinden kaynaklandığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar akut koroner sendromlu hastalarda rosuvastatin tedavisinin $CD4^+CD2^{null}$ hücrelerinde, intrinsik yolda görev alan anti-apoptotik bir molekül olan Bcl2'nin ekspresyonunu inhibe ettiği ve bu inhibisyon sonucu apoptozisin indüklendiğini belirtmişlerdir.

Statinlerin intrinsik yolda apoptozisi indüklediklerine dair başka çalışmalar da vardır. Bu çalışmalarda statinlerinin Rho proteinlerini (RhoA) inhibe ettikleri ve bu inhibisyon sonucu anti-apoptotik Bcl2'nin de inhibe edildiği ve apoptozisin indüklendiği belirtilmiştir. (Butterick ve ark 2010, Schmidt-Lucke ve ark 2010, Zhou ve Liao 2010). Bizde çalışmamızda MN ve Komet testlerinde *in vitro* insan lenfositlerinde apoptozise uğrayan hücreler tespit ettik. Tespit ettiğimiz apoptotik

hücrelerin kontrol gruplarında gözlenmemesi bu hücrelerdeki apoptozisin rosuvastatin maruziyetinden kaynaklanabileceğini göstermektedir. Rosuvastatin daha önce belirtilen çalışmalarda olduğu gibi apoptozisi hem ekstrinsik hem de intrinsik kaynaklı apoptozis yolağına sokmuş olabilir.

Statin grubu ilaçlar ile ilgili yapılan literatür taramasında bu ilaçların genotoksisitesi üzerine çok az sayıda genotoksisite çalışmasına rastlanmıştır. Rosuvastatin ile ilgili olarak da genotoksisite ve sitotoksisite çalışmalarına rastlanamamıştır. Statin grubu üyesi ilaçların genotoksisitesi ile ilgili olarak Robinson ve ark (1994) tarafından yapılan bir çalışmada fluvastatinin mutajenik ve karsinojenik potansiyeli araştırılmıştır. Bunun için *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, Çin hamster hücrelerinde gen mutasyonları, kromozomal anormallikler, rat hepatositlerinde DNA hasar düzenlemesi, *in vivo* fare kemik iliğinde klastojenik/anojenik ve sitogenetik analizlerini yapmışlardır. Bahsi geçen tüm bu test yöntemlerinde statin grubu üyesi olan fluvastatinin herhangi bir genotoksik etkisinin olmadığı ve karsinojeniteye de sebep vermediği belirtilmiştir. Bu çalışmanın aksine aynı grupta yer alan rosuvastatin ile yaptığımız çalışmada rosuvastatinin genotoksik ve sitotoksik etkili olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde Ciaravino ve ark (1995) yaptıkları çalışmada atorvastatinin genotoksik değerlendirmesini birçok test yöntemi kullanarak belirlemeye çalışmışlardır. Bakteriyel mutajenik testlerde *E. coli* WP2(uvrA) zinciri, *S. Typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 ve TA1538 suşları kullanılmıştır. Araştırmacılar çalışma sonucunda atorvastatinin bu her iki mikroorganizma için 5000 µg/plate dozlarında mutajenik bir etki göstermediğini açıklamıştır. Yine aynı çalışmada Çin hamster karaciğer V79 hücre kültürleri atorvastatinin 50-300 µg/mL (S9-), 100-300 µg/mL (S9+) konsantrasyonlarına maruz bırakılmış ve kromozomal anormallikler bakımından değerlendirilmiştir. Bunun yanında araştırmacılar *in vivo* fare kemik iliği hücrelerinde 1, 2500 ve 5000 mg/kg'lık atorvastatin dozları uygulanarak polikromatik mikronükleuslu hücrelerin frekansını incelemişlerdir. Araştırmacılar çalışmanın sonucunda atorvastatinin bu testlerde mutajenik ya da klastojenik bir etki göstermediğini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise statin grubu ilaçlardan rosuvastatinin klastojenik ve sitotoksik bir aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

FDA (2007) raporlarına göre atorvastatinin genotoksik etkisinin negatif olduğu belirtilirken, Gajski ve Garaj-Vrhovac (2008) yaptıkları bir çalışmada atorvastatinin genotoksik potansiyelini incelemişlerdir. Bu çalışmada genotoksik değerlendirmeyi yapmak için insan lenfositlerinde *in vitro* komet assay, kromozom anormalliği (KA), kardeş kromozom değişimi (KKD) tekniği kullanmışlardır. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada atorvastatinin 30,21 ng/mL dozunda 3, 20 ve 48 saatlik uygulama süreleriyle maruz bırakılan lenfositlerde atorvastatinin çeşitli kromozom anormalliklerinin oluşumunun indüklediğini tespit etmişler fakat bu durumun istatistiksel olarak anlamlı olmadığını belirtmişlerdir. Kardeş kromatid değişimi testinde de aynı dozda ve aynı uygulama sürelerinde atorvastatinin hem 20 saatlik hem de 48 saatlik uygulamalarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış yaptığını tespit etmişlerdir. Alkali komet testi ile yaptıkları çalışmada da 30 ng/ml oranında kullanılan dozun komet kuyruk uzunluğu parametresi açısından değerlendirilmesi yapıldığında 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalarda anlamlı bir şekilde artışın olduğunu, kuyruk momenti açısından da sadece 48 saatlik uygulamada anlamlı bir artışın olduğunu ve mutajenik bir etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da aynı grup ilaçlardan olan rosuvastatinin kromozomal anormallik testinde 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5 ve 1 µg/mL'lik dozları kullanılmış ve tüm dozların hem 24 saatlik hem de 48 saatlik uygulamada kromozomal anormallikleri indüklediği tespit edilmiştir. Bu artışların 24 saatlik uygulamada tüm dozlarda, 48 saatlik uygulamada ise 0,0625 µg/mL hariç tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde çalışmamızda komet testi uygulanmış ve 1 saatlik rosuvastatin uygulamasında 0,0625, 0,125, 0,5 ve 1 µg/mL'lik dozların Gajski ve Garaj-Vrhovac (2008) çalışmasına benzer şekilde kuyruk uzunluğunu arttırdığı tespit edilmiştir. Bu artışlardan 0,125 µg/mL'lik doz hariç diğer üç dozda anlamlı olduğu belirlenmiştir. Bunların haricinde çalışmamızda yapılan mikronükleus testinde mikronükleus frekansının belirtilen tüm dozlarda anlamlı artışlar gösterdiği tespit edilmiştir.

Kromozomal anormallik, mikronükleus ve komet testlerinde genotoksik ve sitotoksik bir profil gösteren rosuvastatin kolesterol seviyesini düşürmek için kullanılan bir ilaçtır. Dünyada en fazla kullanılan kolesterol ilaçlarından birisidir. Dolayısıyla kolesterol seviyesi normal değerlerden biraz fazla olan insanlarda kolesterol

düşürülmesi için başlanacak ilaçların başında rosuvastatin etken maddesine sahip ilaçlar gelmektedir. Rosuvastatin çok fazla metabolize olabilen bir ilaç değildir bu nedenle bazı lipid düşürücü tedaviler gibi karaciğerin biyokimyasal fonksiyonlarında anormallikler meydana getirdiği bulunmuştur (FDA 2005). Famularo ve ark (2007) yaptıkları çalışma ile tedavi amaçlı normal dozlarda bile, hastalara verilen rosuvastatinin karaciğer toksisitesinde klinik olarak anlamlı artışlar yaptığını rapor etmişlerdir. Rosuvastatinin klinik dozlarında yapılan çalışmada diğer statinlere (atorvastatin, simvastatin ve pravastatin) göre daha etkili bir LDL kolesterol düşürücüsü olduğu belirtilmiş ve rosuvastatinin ekstrahepatik dokulara girişinin zayıf olduğu ve düşük miktarda da olsa kaslar için toksik olduğu belirtilmiştir (Calza 2009).

Rosuvastatin ile yapılan karsinojenite testlerinde gavaj yöntemi ile 2, 20, 60 ve 80 mg/kg/gün dozlara maruz bırakılan ratlarda, 80 mg/kg/gün'lük dozda uterus duvarlarında stromal polipleri anlamlı bir şekilde artmıştır. Daha düşük dozlarda poliplerin insidansında herhangi bir artış gözlemlenmemiştir (PDR 2005). Yapığımız çalışmada da bu çalışmayı destekler nitelikte sonuçlar bulunmuştur fakat çalışmamızda sadece 80 µg/mL'lik dozda değil daha düşük dozlarda da genotoksik ve sitotoksik etkiler gözlemlenmiştir.

Farelerde yapılan karsinojenite testlerinde ise 10, 60, 200 mg/kg/gün şeklinde 107 haftalık maruziyette gavajla beslenen farelerden yüksek doz olan 200 mg/kg/gün'de hepatoselüler adenom ve karsinomlarda istatistiksel olarak belirli bir artışın olduğu belirlenmiştir. Daha düşük dozlarda herhangi bir adenom veya karsinoma rastlanılmamıştır (PDR 2005).

Statinlerin kanser tedavisindeki olumlu etkilerini yüksek dozda (2-45 mg/kg/gün) ve uzun süreli (aylık periyodlarla 7 günlük) kullanımda ortaya çıkardıkları bildirilmektedir (Hindler 2006, Rutishauser 2006). Ayrıca bugün gelinen noktaya baktığımızda koroner arter hastalığı veya risk eşdeğeri bulunan hastalarda hedef LDL düzeyi <100 mg/dL, opsiyonel hedef ise <70 mg/dL olarak önerilmektedir (Grundy ve ark 2004). Bu şekilde statinlerin kanser tedavisinde yüksek dozlarda uzun süreli kullanımının ve hedef LDL düzeyinin düşürülmesi için alınan yüksek dozlarının

muhtemel yan etkilerinin daha kapsamlı bir şekilde araştırılmasını gerektirmektedir. Uyanık (2007) yaptığı çalışmada yüksek dozda (50 mg/kg) atorvastatinin, indometazin (antiinflamatuvar bir ilaç) tedavisi uygulanan sıçanlarda ülser lezyonlarını şiddetlendirici bir etkisinin olduğunu göstermesi, statinlerin yüksek doz ve uzun süreli kullanımıyla ilgili çalışmalarda dikkat edilmesi gerektiğini göstermektedir.

Rosuvastatinin gelişim ve üreme üzerine toksik bir etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla gavaj yöntemiyle erkek ratlara çiftleşmeden 9 hafta öncesinden dişi ratlara ise çiftleşme süresinden 2 hafta önce başlayarak gebeliğin 7. Gününe kadar 5, 15, 50 mg/kg/gün'lük rosuvastatin dozları uygulanmış ve sonuç olarak en yüksek doz olan 50 mg'de fertilité ve üreme bakımından herhangi bir yan etkinin olmadığı tespit edilmiştir (PDR 2005). Benzer şekilde köpek testislerinde yapılan çalışmada üreme ve gelişim toksikolojisi çalışılmış ve bunun için bir ay boyunca köpeklere her gün 30 mg/kg olacak şekilde rosuvastatin verilmiştir. Uygulamadan sonra yapılan analizlerde köpek spermelerinin yapısı bozulmuş dev hücreler gözlemlenmiştir. Benzer şekilde 30 mg/kg/gün'lük dozlarda 6 hafta boyunca rosuvastatin muamelesi yapılmış maymunlarda sperm dev hücrelerinin oluşumunun yanı sıra seminifer tübülleri epitellerinde meydana gelen vakuolizasyonlar dikkati çekmiştir (PDR 2005).

Dişi ratlar ile yapılan üreme toksikolojisinde de çiftleşmeden önce ve çiftleşmeden sonraki 7 gün 5, 15, 50 mg/kg/gün'lük dozlarda verilen rosuvastatin uygulamasında fetal vücut ağırlıklarında (dişi yavru) azalmanın olduğunu ve kemik dokularında değişiklikler bulunduğu belirtilmiştir (PDR 2005).

Hamile ratlarda ise 2, 20, 50 mg/kg/gün'lük dozlarda gebeliğin 7. Gününden laktasyonun 21. Gününe kadar uygulanan rosuvastatin muamelesinde 50 mg/kg/gün'lük dozda yavrularda hayatta kalma oranı azalma göstermiştir. Günümüzde klinik olarak verilen rosuvastatin dozuyla eşdeğer şekilde olan benzer bir çalışmada 0,3 mg/kg/gün, 1 mg/kg/gün ve 3 mg/kg/gün'lük dozlar hamile ratlara oral yolla verilmiştir. Çalışma sonucuna göre canlı doğum oranında azalma gözlenmiş ve maternal mortalite rapor edilmiştir (PDR 2005).

Rosuvastatinin Ames testi ile *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli* üzerinde, Çin hamster akciğer hücrelerinde kromozomal anormallikleri üzerinde herhangi bir mutajenik ve klastojenik etkiye sahip olmadığı belirtilmiştir. FDA (2005) raporuna göre mikronükleus testleri için *in vivo* fare çalışmalarında negatif sonuçlar alındığı belirtilmiştir.

Kolesterol düşürmek için statin tedavisine başlanmasına ilişkin rehber niteliği taşıyan klavuzlar kimlerin statinlere ihtiyaç duyabileceğini belirtmektedir. Bu klavuzlar ışığında statin tedavisine başlanmadan önce yaklaşık 9-12 saatlik açlığı takiben tam bir lipid profili istenmelidir. Ayrıca istenen tetkikler arasında serum kreatinin seviyesi ve karaciğer transaminazlarının da (AST ve ALT) bulunmasında yarar olduğu belirtilmiştir. Hastada koroner kalp hastalığı ya da bu hastalık için risk eşdeğerlerinin olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmalıdır. Hastada LDL dışı majör risk faktörleri sorgulanmalı ve araştırılmalıdır. Eğer risk faktör sayısı ikiyi aşıyorsa Framingham risk faktör cetvelinden hastanın 10 yıllık KKH riski hesaplanmalıdır. Elde edilen bu kadar veri kişinin risk grubunun belirlenmesine ve bu risk grubuna özgü hedef LDL değerler ile tedavinin nasıl olması gerektiği belirtilmektedir. Bu değerlendirme aynı zamanda hastanın tedaviye gereksiniminin olup olmadığı ve gerekiyorsa nasıl olacağını da yönlendirir. Görüldüğü gibi ilaç tedavisi sadece hastanın bazal LDL seviyesine bağlı olmayıp kişinin taşıdığı risk ile de korele olup, risk artışı ile paralel olarak yaşam biçimi değişikliğini takiben ya da eş zamanlı olarak ilaç tedavisine başlanması tavsiye edilmektedir (Ertaş 2009).

Yukarıda da belirtildiği gibi statin tedavisinde doz ve etki süresi ilaçların yan etki oluşturmasında en büyük etkenlerden birisidir. Özellikle statin grubu ilaçlarda yüksek dozların ve maruziyet sürelerinin artmasıyla çalışmalarda da görüldüğü gibi karsinojenik ve toksik etkilerinin arttığı bilinmektedir. Nitekim Ferenczi ve ark (2010)'nın statinler ile ilgili olarak yaptıkları çıkarımlarda statin kullanımının ne kadar kolaylaştırılması gerektiğini ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar statinlerin yüksek diyetle beslenme sonucu meydana gelen kardiyovasküler hastalıkları nötralize ettiğini ve bu özelliklerinden dolayı da fast food olarak tabir edilen ve günümüzde oldukça yaygınlaşan ve özellikle çocukların aşırı tükettiği hamburgerlere

ve çeşitli içeceklere katılarak pazarlanmasının kardiyovasküler hastalık riskinin bu beslenme tarzına sahip olan kişilerde düşürülmesine katkı sağlayacağını belirtmişlerdir. Statin tedavisinin klavuzlarda belirtildiği gibi birçok parametreye dayanarak ve birçok analiz yapıldıktan sonra başlanması gerektiği belirtilirken insanların özellikle de çocukların çok tercih ettiği hamburger ve milkshake gibi gıdalara statin koyularak pazarlanmasının önerilmesi durumun ne kadar pazarlama amaçlı ve sadece ticari zihniyetle olduğunu açığa çıkarmaktadır.

Günlük kullanım dozu göz önüne alınarak *in vitro* şartlarda uyguladığımız üç ayrı test sisteminde de (kromozomal anormallik, mikronükleus ve Komet test) rosuvastatinin genotoksik ve sitotoksik bir etki göstermesi bu ilaçların kullanımında dikkat edilmesi gerekliliğini ortaya çıkartmaktadır. Kolesterol seviyelerinin klinik uygulamalarda aşağıya çekilmesi ile artan kolesterol ilacı kullanımı ve gün geçtikçe bu ilaçların yan etkilerine karşı daha farklı ilaçların kullanılması bireylerde beklenmedik sonuçların ortaya çıkmasına sebebiyet verebilir. Bu ilaçlara maruz kalmamak için primer koruma çatısı altında kişinin gerekli önlemleri alması ve bu tip ilaçları kullanmaya sebebiyet veren olumsuzluklar hakkında bilgilendirilmesi gerekmektedir. Kolesterolün başlıca sebepleri genetik eğilim, stres, yanlış beslenme ve bundan kaynaklanan fazla kilolar ve hareketsizliktir. Bununla beraber çeşitli hastalıklar da kolesterolün yükselmesine neden olabilir. Yüksek tansiyon, şeker hastalığı, böbrek, karaciğer ve tiroid hastalıkları, sigara ve alkol kolesterol yükselmesine neden olan faktörlerdendir. Kolesterolün başlıca sebeplerinden olan genetik eğilimin bireyler tarafından farkına varılması ve ona göre hekimden alacağı bilgiler ışığında uygun beslenme, düzenli yaşam ve spor yapma gibi faaliyetlerle yüksek kolesterol riskini modifiye etmek ilaç kullanımının önüne geçmeye neden olabilir. İlaç tedavisi veren hekimlerin kolesterol ilacını hastaya vermeden önce çok daha dikkatli davranması gerekmektedir.

Çalışmamızda *in vitro* test sistemleri sonucunda genotoksik ve sitotoksik bir etki gösteren rosuvastatinin bu çalışmaya ilave olarak özellikle *in vivo* test sistemleriyle farklı canlılar üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkisinin incelenmesi, sitotoksik ve genotoksik profillerinin tam olarak anlaşılması açısından faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

ABE, K., NAKAYAMA, M., YOSHIMURA, M., Increase in the transcriptional activity of the endothelial nitric oxide synthase gene with fluvastatin: a relation with the -786T > C polymorphism. *Pharmacogenet Genom.* 15(5): 329-336, 2005.

ADEY, W. R., Biological effects of electromagnetic field, *J. of Cell. Biochem.*, 51: 410-416, 1993.

AGARWAL, B., BHENDWAL, S., HALMOS, B., MOSS, S.F., RAMEY, W.G., HOLT, P.R., Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. *Clin Cancer Res.* 5: 2223-2229, 1999.

AGARWAL, R., CURLEY, T.M., The role of statins in chronic kidney disease. *Am J Med Sci.* 330:69-81, 2005.

AJITH, T.A., SOJA, M., A comparative study on the antimutagenicity of atorvastatin and lovastatin against directly acting mutagens. *Cell Biol Toxicol.* 22(4):269-74, 2006.

AKSOY H., Elektromanyetik Alanların İnsan Lenfosit Kültürü ve Bazı Bitkiler Üzerine Genetik Etkileri, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2006.

ALBERTS, A.W., CHEN, J., KURON, G., HUNT, V., HUFF, J., HOFFMAN, C., ve ark. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxy methylglutaryl coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci.* 77:3957-61, 1980.

AN, Y., XIN, H., YAN, W., ZHOU, X., Amelioration of cisplatin-induced nephrotoxicity by pravastatin in mice. *Exp Toxicol Pathol.* 63 (3), 215-219, 2011.

ANDERSEN, M.K., PEDERSEN-BJAGAARD, J., Increased frequency of dicentric chromosomes in therapy-related MDS and AML compared to de novo disease is significantly related to previous treatment with alkylating agents and suggests a specific susceptibility to chromosome breakage at the centromere. *Leukemia.* 14 (1): 105-111, 2000.

ANDERSON, J.M., DIETSCHY, J.M., Regulation of sterol synthesis in adrenal gland of the rat by both high and low density human plasma lipoproteins *J. Biol. Chem.* 252: 3652-3659, 1977.

ANITSCHKOW, N., CHALATOW, S., Ueber experimentelle Cholester-insteatose und ihre Bedeutung fuer die Entstehung einiger pathologischer Prozesse. Zentrbl Allg Pathol Pathol Anat. 24:1-9, 1913.

ANSELL, B.J., WATSON, K.E., WEISS, R.E., FONAROW, G.C., HsCRP and HDL effects of statins trial (CHEST): Rapid effect of statin therapy on C-reactive protein and high-density lipoprotein levels a clinical investigation. Heart Dis. 5:2-7, 2003.

ARIKAN, İ., METİNTAŞ, S., KALYONCU, C., YILDIZ, Z., The Cardiovascular Disease Risk Factors Knowledge Level (CARRF-KL) Scale: a validity and reliability study. Arch. Turk. Soc. Cardiol. 37:35-40, 2009.

ARSLAN, E., Sıçanlarda oluşturulan deneysel Peritoneal adezyon modelinde seprafilm ve lovastatin'in karşılaştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Kayseri, 2009.

ATEŞ, J., VELİOĞLU, S., Kolesterolle karşı yeni silahımız: Bitki sterollerini. Gıda Mühendisliği Dergisi. 55-58, 2005.

AYDIN, M., ONUK, T., DOĞAN, S.M., ve ark., Metabolik sendromlu hastalarda statin tedavisinin inflamasyon üzerine etkisi. Arch Turk Soc Cardiol, 37(1):26-34, 2009.

AYDIN, Ş., Yüksek doz atorvastatin'in kırık iyileşmesi üzerine etkisinin Radyolojik, histopatolojik ve biyomekanik yönden araştırılması. Uzmanlık Tezi, Gaziantep Üniversitesi, Tıp fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Gaziantep, 2009.

AYTEKİN, S., AYTEKİN, V., ORBAY, B., ve ark Hiperkolesterolemi'li Hastalarda Uzun Süreli Lovastatin Tedavisi Sonuçları. Arch Turk Soc Cardiol. 20:245-248, 1992.

BADER, T., FAZILI, J., MADHOUN, M., ve ark. Fluvastatin Inhibits Hepatitis C Replication in Humans. Am. J. Gastroenterol. 103 (6):1383-9, 2008.

BALLANTYNE, C.M., CORSINI, A., DAVIDSON, M.H., Risk for myopathy with statin therapy in high-risk patients. Arch Intern Med. 163:553-64, 2003.

BEISIEGEL, U., Lipoprotein metabolism. Eur. Heart J. 19(A): A20-3, 1998.

BERG J.M., TYMOCZKO J.L., Stryer, L., Biochemistry. W. H. Freeman and Company, 5th Edition, Chaps 12, 26, 2002.

BEŞOLUK, Ş., Cinsiyet hormonları lipoproteinler ve kardiovasküler risk. Uzmanlık Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 1999.

BETTE, C.S., DIETSCHY, J.M., Characterization of the sinusoidal transport process responsible for uptake of chylomicrons by the liver. *J. Biol. Chem.* 253(8):1859-1867, 1978.

BLIZNAKOV, E.G., WILKINS, D.J., Biochemical and clinical consequences of inhibiting coenzyme Q10 biosynthesis by lipid lowering HMG-CoA reductase inhibitors (statins): a critical overview. *Adv Therapy.* 15, 218-228, 1998.

BOLOGNESI, C., Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 543: 251-272, 2003.

BONASSI, S., ABBONDANDOLO, A., CAMURRI, L., ve ark., Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? *Cancer Genet. Cytogenet.* 79 (2): 133-135, 1995.

BOZINA, N., BRADAMANTE, V., LOVRIÓ, M. Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk, *Arh Hig Rada Toksikol.* 60:217-24, 2009.

BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.S., How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *Sci Am.* 251: 57–66, 1984.

BURTIS, C.A., ASHWOOD, E.R., Fundamentals of clinical chemistry. In: Stein E.A., Myers G.L., eds. *Lipids, Apolipoproteins and lipoproteins.* 4th ed. Saunders Company, Philadelphia. 375–401, 1996.

BUTTERICK, T.A., IGBAVBOA, U., ECKERT, G.P., SUN, G.Y., WEISMAN, G.A., MULLER, W.E., WOOD, W.G., Simvastatin stimulates production of the antiapoptotic protein Bcl-2 via endothelin-1 and NFATc3 in SH-SY5Y cells. *Mol Neurobiol* 41:384–391, 2010.

CAFFORIO, P., DAMMACCO, F., GERNONE, A., SILVESTRIS, F., Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis.* 26: 883–891, 2005.

CALZA, L., Long-term use of rosuvastatin: a critical risk benefit appraisal and comparison with other antihyperlipidemics. *Drug, Healthcare and Patient Safety.* 1: 25–33. 2009.

CHAMPE, P.C., HARVEY, R.A., Lippincott's Biochemistry. J.B.Lippincott Co., Philadelphia, 1994.

CIARAVINO, V., KROPKO, M.L., ROTHWELL, C.E., HOVEY, C.A., THEISS, J.C., The genotoxicity profile of atorvastatin, a new drug in the treatment of hypercholesterolemia. *Mutat Res.* 343(2-3):95-107, 1995.

CONFORTI, A., MAGRO, L., MORETTI, U., ve ark. Fluvastatin and hepatic reactions – A signal from spontaneous reporting in Italy. *Drug Safety.* 29(12): 1163-1172, 2006.

COOPER, G.M., *The Cell – A Molecular Approach*. Sinauer Associates, Inc; Chap 12, Sunderland (MA), 2000.

CORMIER-DAIRE, V., WOLF, C., MUNNICH, A., ve ark. Abnormal cholesterol biosynthesis in the Smith-Lemli-Opitz and the lethal acrodysgenital syndromes. *Eur J Pediatr*. 155:656-9, 1996.

CORSINI, A., BERNINI, F., QUARATO, P., ve ark. Non-lipid-related effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Cardiology*. 87:458-468, 1996.

CORSINI, A., RAITERI, M., SOMA, M.R., ve ark. Pathogenesis of atherosclerosis and the role of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Am J Cardiol*. 76:21A, 1995.

COSMAN, F., NIEVES, J., ZION, M., ve ark. Effects of short-term cerivastatin on bone turnover. *J Bone Miner Res*. 16:29, 2001.

ÇAKMAK, G., Trafik Polisi ve taksi sürücülerini hava kirliliği maruziyetine yönelik idrarda 1- Hidroksipiren değerlerinin, periferik lenfositlerde kromozomal aberasyon ve MÇ sıklığının araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2000.

ÇALIŞKAN, S., HMG CoA redüktaz inhibitörleri ile Kolesterol düşürülmesinin kan ve doku ATP düzeyleri ve eritrosit membran yüzeyleri üzerine etkilerinin araştırılması. Uzmanlık Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir, 1998.

ÇELİK, M., Dinocap fungusunun *Allium cepa L.* Kök ucu hücreleri ve insan periferik lenfositlerinde sitogenetik etkileri, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2003.

ÇELİK, T., YÜKSEL, U.Ç., IŞIK, E., Statinlerin birincil ve ikincil korumadaki yeri: Hedef LDL kolesterol değeri ne olmalıdır? *Türk Kardiyol. Dern. Arş.* 34: 246-254, 2006.

DAMROT J, NUBEL T, EPE B, ROOS WP, KAINA B, FRITZ G. Lovastatin protects human endothelial cells from the genotoxic and cytotoxic effects of the anticancer drugs doxorubicin and etoposide. *Br J Pharmacol*. 149: 988–997, 2006 .

DAVIDSON, M.H., Rosuvastatin: a highly efficacious statin 114ort he treatment of dyslipidaemia. *Expert Opin Invest Drugs*. 11:125–41, 2002.

DE ANGELIS, G., The influence of statin characteristics on their safety and tolerability. *Int J Clin Pract*. 58(10):945-55, 2004.

DE LAU, L.M.L., KOUDESTAAL, P.J., HOFMAN, A., BRETELER, M.M.B., Serum cholesterol levels and the risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol.* 164 (10), 998-1002, 2006.

DEMİREL, S., ZAMANI, A.G., Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları, *Genel Tıp Dergisi*, 12 (3):123-127, 2002.

DESPRES, J.P., The Atherogenic Triad of New Metabolic Risk Factors: Importance of Waist and Fasting Triglycerides as Screening Tools. *Visceral Adipose Tissue and Cardiometabolic Risk: Does It Really Matter? Part 2*, 2009.

DİKEÇ, M., Hiperlipidemik hastalarda atorvastatin kullanımının lipoprotein (a) ve diğer lipid parametreleri üzerine etkileri. *Uzmanlık Tezi, Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Dahiliye Kliniği, İstanbul*, 2006.

DOAK, H.S., LIU, Y., CHEN, C., Genotoxicity and cancer. *Advers Effect of Engineered Nanomaterials*. Ed: Fadeel, B., Pietroiusti, A., Shvedova, A. ISBN: 9780123869401, Academic Press. 243-461, 2012.

DOSTAL L.A., SCHARDEIN, J.L., ANDERSON, J.A., Developmental toxicity of the HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, in rats and rabbits. *Teratology*. 50(6):387-94, 1994.

DOWNS, J.R., CLEARFIELD, M., WEIS, S., ve ark., Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. *Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. JAMA*. 279: 1615-22, 1998.

DUITS, N., BOS, F.M., Psychiatric disorders with use of simvastatin. *Ned Tijdschr Geneesk.* 137(26):1312-5, 1993.

DURMUŞ, M., Kolesterol ve akıl oyunları, *Hayykitap, İstanbul*, 2009.

DUSTING, G.J., Nitric oxide in coronary artery disease, roles in atherosclerosis, myocardial infarction and heart failure. *EXS*. 76: 33-35, 1996.

EGASHIRA, K., HIROOKA, Y., KAI H., ve ark. Reduction in serum cholesterol with pravastatin improves endothelium-dependent coronary vasomotion in patients with hypercholesterolemia. *Circulation*. 89:2519-24, 1994.

ENDO A, KURODA M, TSUJITA Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by *Penicillium citrinum*. *J. Antibiot.* 29:1346-48, 1976.

ENDO, A., The origin of the statins. *Atheroscler.* 5:125-30, 2004.

EPEL, D., The effects of carbonmonoxide inhibition of ATP level and the date of mitosis in sea urching egg. *J. Cell. Biol.* 17: 315-319, 1963.

ERDOĞMUŞ, E., Dişi Sıçanlarda Simvastatinin Anksiyete Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Trabzon, 2009.

EREN, M., Kalp yetersizliği tedavisinde statinlerin yeri. Arch Turk Soc Cardiol. 37(7):501-511, 2009.

ERTAŞ, F.S., Yaşam boyu tedavi perspektifinde statinler. Turk Kardiyol Dern Arş. 37(2), 29-36, 2009.

ESPENSHADE, P.J., HUGHES, A.L., Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. Annu. Rev. Genet. 41: 401-27, 2007.

FAIRBAIRN, D.W., OLIVE, P.L., O'NEILL, K.L., The comet assay: a comprehensive review, Mutat. Res. 339: 37-59, 1995.

FAMULARO, G., MIELE, L., MINISOLA, G., GRIECO, A. Liver toxicity of rosuvastatin therapy, World J Gastroentero. 13(8): 1286-1288, 2007.

FASEB, Federation of American Societies for Experimental Biology, breakthroughs in science: Cholesterol: From Biochemical Riddle to Blockbuster Drug for Heart Disease, Rockville, 2005.

FDA, 2005. (Food and Drug Administration), http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2005/21366slr005lbl.pdf. Erişim tarihi: 15.05.2011.

FDA, 2007. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2007/020702s050lbl.pdf. Erişim tarihi: 20.05.2011

FDA, 2010. (Food and Drug Administration), <http://www.fda.gov>. Erişim tarihi: 26.12.2012.

FDA, 2011. <http://www.fda.gov/Drugs/Drugsafety/postmarketdrugsafetyforpatientsandproviders/ucm00102.htm>. Erişim tarihi: 15.05.2011.

FENECH, M., The in vitro micronucleus technique, Mutat. Res. 455 (1-2): 81-95, 2000.

FENECH, M., Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a cytome assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death, Mutat. Res., 600: 58-66, 2006.

FENECH, M., MORLEY, A.A., Solutions to the kinetic problems in the micronucleus assay, Cytobios. 43: 233-46, 1985.

FERENCZI, E.A., ASARIA, P., HUGHES, A. D., CHATURVEDI, N., FRANCIS, D.P., Can a Statin Neutralize the Cardiovascular Risk of Unhealthy Dietary Choices? Am J Cardiol. 106, 587-592, 2010.

FERRIER, K.E., MUHLMANN, M.H., BAGUET, J.P., ve ark., Intensive cholesterol reduction lowers blood pressure and large artery stiffness in isolated systolic hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 39:1020-5, 2002.

FRITZ, G., Targeting the mevalonate pathway for improved anticancer therapy. *Curr Cancer Drug Tar.* 9: 626–638, 2009.

FUJIEDA, M., MORITA, T., NARUSE, K., ve ark Effect of pravastatin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Hum Exp Toxicol.* 30(7): 603-615, 2011.

FURBERG, C.D., PITT, B., Withdrawal of cerivastatin from the world market. *Curr Control Trials Cardiovasc Med.* 2: 205-07, 2001.

GAJSKI, G., GARAJ-VRHOVAC, V., Application of cytogenetic endpoints and comet assay on human lymphocytes treated with atorvastatin in vitro, *Journal of Environmental Science and Health.* 43, 78–85, 2008.

GARRETT, I.R., GUTIERREZ, G., MUNDY, G.R., Statins and Bone Formation. *Curr Pharm Des.* 7(8): 715-736, 2001.

GARRETT, R. H., GRISHAM, C. M., *Biochemistry* fourth edition. Isbn: 13:978-0-495-10935-8, Boston, USA, 2010.

GERLI, R., SCHILLACI, G., GIORDANO, A., BARTOLONI, BOCCI, E., BISTONI, O., VAUDO, G., MARCHESI, S., PIRRO, M., RAGNI, F., SHOENFELD, Y., MANNARINO, E., CD4+ CD28-T lymphocytes contribute to early atherosclerotic damage in rheumatoid arthritis patients. *Circulation* 109:2744–2748, 2004.

GHIRLANDA, G., ORADEI, A., MANTO, A., Evidence of plasma CoQ10-lowering effect by HMG-CoA reductase inhibitors: a doubleblind, placebo-controlled study. *J Clin Pharmacol.* 33:226-9, 1993.

GLIEMROTH, J., ZULEWSKI H., ARNOLD, H., TERZIS, A.J., Migration, proliferation, and invasion of human glioma cells following treatment with simvastatin. *Neurosurg Rev.* 26(2):117-24, 2003.

GLORIOSO N, TROFFA C., Effect of the HMG-CoA reductase inhibitors on blood pressure with essential hypertension and primary hypercholesterolemia. *Hypertension.* 34:1281-6, 1999.

GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S., Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem,* 249: 5153-62, 1974.

GORDON, T., CASTELLI, W.P., HJORTLAND, M.C., KANNEL, W.B., DAWBER, T.R., High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: The Framingham study. *Am J Med.* 62(5): 707-714, 1977.

GRUNDY, S. M., CLEEMAN J.I., ve ark. Implications of recent clinical trials 118ort he National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation*. 110: 227–39, 2004.

GRUNDY, S.M., HMG-CoA reductase inhibitors for treatment of hypercholesterolemia. *N Engl J Med*. 319: 24–33, 1988.

HERGENÇ, G., Lipoprotein fiziyojisi. *Türkiye Klinikleri Dahili Tıp Bilimleri Endokrinoloji Dergisi*. 1(20): 7-8, 2005.

GÜLEÇ, S., Statinlerin etkinliği. *Arch Turk Soc Cardiol*. 35(1):8-14, 2007.

HABEOS, I.G., ZIROS, P.G., CHARTOUMPEKİS, D., PSYROGIANNIS, A., KYRIAZOPOULOU, V., PAPA VASSILIOU, A.G., Simvastatin activates Keap1/Nrf2 signaling in rat liver. *JMM*. 86(11): 1279-1285, 2008.

HAGMAR, L., BONASSI, S., STROMBERG, U., BROGGER, A., KNUDSEN, L.E., NORPPA, H., REUTERWALL, C., Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH), *Cancer Res*. 58 (18): 4117-4121, 1998.

HAGMAR, L., BROGGER, A., HANSTEEN, I.L., ve ark., Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic Study Group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res*. 54(11): 2919-22, 1994.

H Aidari, M., MOGHADAM, M., CHINICAR, M., ve ark., Apolipoprotein B as the best predictor of coronary artery disease in Iranian normolipidemic patients. *Clin. Biochem*. 34 (2), 149- 155, 2001.

HAMİT, T., Endotel fonksiyon bozukluğu saptanan 118ort h hastalarında atorvastatin ve lisinoprilin endotel fonksiyonları üzerine etkisi. *Tıpta Uzmanlık Tezi*, Erciyes Üniversitesi, Tıp fakültesi, Kardiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, 2008.

HANSEN, K.E., HILDEBRAND, J.P., FERGUSON, E.E., STEIN, J.H., Outcomes in 45 patients with statin-associated myopathy. *Arch Intern Med*. 165:2671-6, 2005.

HEART, 2013, http://www.heart.org/HEARTORG/Conditions/Cholesterol/AboutCholesterol/Good-vs-Bad-Cholesterol_UCM_305561_Article.jsp. Erişim Tarihi:13.02.2013.

HIDALGO, A., GONZALES-REYES, J.A. NAVAS, P., GARCIA-HERDUGO, G., Abnormal mitosis and growth imhibition in *Allium cepa* roots induced by prophan and chloroprophan. *Cytobios*. 57: 7–14, 1989.

HINDLER, K., CLEELAND, C.S., RIVERA, E., COLLARD, C.D., The role of statins in cancer therapy, *Oncologist*. 11 (3), 306-315, 2006.

HUELSSENBECK, J., HENNINGER, C., SCHAD, A., LACKNER, K. J., KAINA, B., FRITZ, G., Inhibition of Rac1 signaling by lovastatin protects against anthracycline-induced cardiac toxicity. *Cell Death and Disease*. 2: e190, 2011.

HUSSAIN, M.M., A proposed model for the assembly of chylomicrons, *Arteriosclerosis*, 148,1-15, 2000.

IP, J.H., FUSTER, V., BADIMON, L., ve ark. Syndromes of accelerated atherosclerosis: Role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *J Am Coll Cardiol*. 15:1667, 1990.

JAIN, A.K., ANDSORBHOY, R.K. Cytogenetical studies on the effects of some chlorinated pesticides III. Concluding Remarks, *Cytologia*, 53: 427-436, 1988.

JENA, B., KAUL, C.L., RAMARAO, P., Genotoxicity Testing, a Regulatory Requirement For drug Discovery and Development: Impact of ICH Guidelines. *Indian J Pharmacol*. 34: 86-99, 2002.

JOHN, S., SCLAICH, M., LANGENFELD, M., ve ark., Increased bioavailability of nitric oxide after lipid-lowering therapy in hypercholesterolemic patients. *Circulation*. 87:211, 1998.

JONES, P., KAFONEK, S., LAURORA, I., HUNNINGHAKE, D., Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study). *Am J Cardiol*. 81:582-7, 1998.

JORGE, P.A.R., OZAKI, M.R., METZE, K., Effects of Simvastatin and Pravastatin on Endothelium-Dependent Relaxation in Hypercholesterolemic Rabbits. *Exp Toxicol Pathol*. 46 (6), 465-469, 1994.

KAMIGAKI, M., SASAKI, T., SERIKAWA, M., Statins induce apoptosis and inhibit proliferation in cholangiocarcinoma cells. *Int J Oncol*. 39: 561-568, 2011.

KANNEL, W.B., DAWBER, T.R., FRIEDMAN, G.D., GLENNON, W.E., MCNAMARA, P.M., Risk factors in coronary heart disease, An evaluation of several serum lipids as predictors of coronary heart disease; the Framingham study, *Ann Intern Med*. 61: 888-99, 1964.

KAUFMANN, P., TÖRÖK, M., ZAHNO, A., WALDHAUSER, K.M., BRECHT, K., KRÄHENBÜHL S., Toxicity of statins on rat skeletal muscle mitochondria. *Cell Mol Life Sci*. 63 (19-20):2415-25, 2006.

KAYAALP, O., Tıbbi Farmakoloji, 11. Baskı, Hacettepe Taş Kitapçılık Ltd. Şti., Ankara, 2005.

KAYRALDIZ, A., TOPAKTAŞ, M., Indirect genotoxic effect of gamma rays in human peripheral lymphocytes. *Cytologia*. 66: 25-31, 2001.

KEYS, A., ARAVANIS, C., BLACKBURN, ve ark., Epidemiological studies related to coronary heart disease: characteristics of men aged 40-59 in seven countries. *Acta Med Scand Suppl.* 460: 1-392, 1966.

KEYS, A., PARLIN, R.W., Serum cholesterol response to changes in dietary lipids. *Am. J. Clin. Nutr.* 19: 175-81, 1966.

KINLAY, S., TIMMS, T., CLARK, M., ve ark., Comparison of effect of intensive lipid lowering with atorvastatin to less intensive lowering with lovastatin on Creactive protein in patients with stable angina pectoris and inducible myocardial ischemia. *Am J Cardiol.* 89:1205-7, 2002.

KISHI, T., WATANABE, T., FOLKERS, K., Bioenergetics in clinical medicine XV. Inhibition of coenzyme Q10-enzymes by clinically used adrenergic blockers of beta-receptors. *Res Commun Chem Path.* 17(1), 157-64, 1977.

KOBASHIGAWA, J.A., KATZNELSON, S., LAKS, H., ve ark. Effect of Pravastatin on outcomes after cardiac transplantation. *N Engl J Med.* 333:621-7, 1995.

KOH, KK., Effects of HMG-CoA inhibitor on hemostasis. *Int J Cardiol.* 76:23-32, 2000.

KOMŞUOĞLU, B., Hipertrigliseridemilerin riski ve tedavisi. *Türk Kardiyol Dern Arş.* 20: 264-272, 1992.

KONSTANTINOV, I. E., MEJEVOI, N., ANICHKOV, N. M., Nikolai N. Anichkov and his theory of atherosclerosis. *Tex Heart Inst J.* 33(4): 417-423, 2006.

KORNBRUST, D.J., MACDONALD, J.S., PETER, C.P., DUCHAI, D.M., STUBBS, R.J., GERMERSHAUSEN, J.I., ALBERTS, A.W., Toxicity of the HMG-coenzyme A reductase inhibitor, lovastatin, to rabbits. *J Phar Exp Therap.* 248(2): 498-505, 1989.

KRAMER, P.J., Genetic Toxicology. *J Pharm Pharmacol.* 50: 395-405, 1998.

KRAMMER, P.H., ARNOLD, R., LARVIK, I.N., Life and death in peripheral T cells. *Nat Immunol.* 7:532-542, 2007.

KRAUSS, R.M., DECKELBAUM, R.J., ERNST, N., ve ark. Dietary guidelines for healthy American adults. A statement for health professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. *Circulation.* 94: 1795-800, 1996.

KREISBERG, R.A., OBERMAN, A., Medical management of hyperlipidemia/dyslipidemia. *J Clin Endocr Metab.* 88: 2445-61, 2003.

KURU, M., ERGENE, S., Genetik, Örnek Problemlerle, Palme Yayınevi, Ankara, 2011.

KURTZ, J.C., KOHEN, A., Cost analysis methodology and protocol estimates: OECD minimum pre-market data test protocols, Office of regulatory analysis Office of toxic substances, Washington D.C., 1981.

LACY-HULBERT, A., METCALFE, J. C, HESKETH, R., Biological responses to electromagnetic fields, *Faseb.* 12: 395-420, 1998.

LINK, A., SELEJAN, S., HEWERA, L., WALTER, F., NICKENIG, G., BÖHM, M., Rosuvastatin induces apoptosis in CD4+CD28null T cells in patients with acute coronary syndromes. *Clin Res Cardiol.* 100:147-158, 2011.

LIPID, Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. *N Engl J Med.* 339(19):1349-57, 1998.

LI, X., LIU, C., CUI, J., et al. Effects of Pravastatin on the Function of Dendritic Cells in Patients with Coronary Heart Disease. *Basic Clin Pharmacol.* 104 (2), 101-106, 2009.

LIAO, J.K., LAUFS, U., Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 45: 89-118, 2005 .

LIAO, J.K., Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection. *Int J Cardiol.* 86(1): 5-18, 2002.

LIUZZO, G., BIASUCCI, L.M., TROTTA, G., BRUGALETTA, S., PINNELLI, M., DIQIANUARIO, G., RIZZELLO, V., REBUZZI, A.G., RUMI, C., MASERI, A., CREA, F., Unusual CD4⁺ CD28null T lymphocytes and recurrence of acute coronary events. *J Am Coll Cardiol.* 50:1450-1458, 2007.

LIUZZO, G., GORONZY, J.J., YANG, H., KOPECKY, S.L., HOLMES, D.R., FRYE, R.L., WEYAND, C.M., Monoclonal cell proliferation and plaque instability in acute coronary syndromes. *Circulation.* 101:2883-2888, 2000.

LIUZZO, G., KOPECKY, S.L., FRYE, R.L., O'FALLON, W.M., MASERI, A., GORONZY, J.J., WEYAND, C.M., Perturbation of the T-cell repertoire in patients with unstable angina. *Circulation.* 100:2135-2139, 1999.

LOPRIENO, N., BARALE, R., VON HALLE, E. S. AND VON BORSTEL, R. C., Testing of chemical for mutagenic activity with *Scizosaccharomyces pombe*, US EPA, Gene-Tox Program, *Mutat. Res.*, 115: 215-233, 1983.

MACDONALD, J.S., HALLECK, M.M., The Toxicology of HMG-CoA Reductase Inhibitors: Prediction of Human Risk, *Toxicol Pathol.* 32(2):26-41, 2004.

MAHLEY R.W., WEISGRABER K.H., FARESE R.V., JR WILLIAMS., *Textbook of Endocrinology ECTION VIII: Chap 34.* 2003.

MARTIROSYAN, A., CLENDENING, J.W., GOARD C.A., PENN, L.Z., Lovastatin induces apoptosis of ovarian cancer cells and synergizes with doxorubicin: potential therapeutic relevance. *BMC Cancer*. 10:103, 2010.

MATEUCA, R., LOMBAERT, N., AKA, P.V., DECORDIER, I., KIRSCH-VOLDERS, M., Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*. 88(11): 1515-31, 2006.

MCGIRT, M.J., LYNCH, J.R., PARRA, A., SHENG, H., PEARLSTEIN, R.D., LASKOWITZ, D.T., PELLIGRINO, D.A., WARNER, D.S., Simvastatin increases endothelial nitric oxide synthase and ameliorates cerebral vasospasm resulting from subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 33: 2950-2956, 2002.

MCTAGGART, F., BUCKETT, L., DAVIDSON, R., HOLDGATE, G., MCCORMICK, A., SCHNECK, D., SMITH, G., WARWICK, M., Preclinical and clinical pharmacology of rosuvastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. *Am J Cardiol*. 87: 28B–32B, 2001.

MEDCHROME, 2012, <http://tube.medchrome.com/2011/05/lipoprotein-metabolism-animation-video.html>). Erişim Tarihi: 01.02.2013.

MERCAN, U., Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYU Vet Fak Derg*. 15 (1-2):91-96, 2004.

MIELKE, M.M., ZANDI, P.P., SJÖGREN, M., GUSTAFSON, D., OSTLING, S., STEEN, B., SKOOG, I., High total cholesterol levels in late life associated with a reduced risk of dementia. *Neurology*. 64(10):1689-95, 2005.

MIETTINEN, T.A., Diurnal variation of cholesterol precursors skulaene and methyl sterols in human plasma lipoproteins. *J Lipid Res*. 23 (3): 466–73, 1982.

MIGLIORE, L., NIERI, M., AMODIO, S., LOPRIENO, N., The Human Lymphocyte Micronucleus assay: A Comparison Between Whole-Blood and Separated-Lymphocyte Culture, *Mutat. Res.*, 227: 167-162, 1989.

MILLS EJ, RACHLIS B, WU P, DEVEREAUX PJ, ARORA P, PERRI D. Primary prevention of cardiovascular mortality and events with statin treatments: a network meta-analysis involving more than 65,000 patients. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 52:1769-81.

MORTENSEN, S.A., LETH, A., AGNER, E., ROHDE, MÇ, Dose-related decrease of serum coenzyme Q10 during treatment with HMG-CoA reductase inhibitors. *Molecular aspects of medicine*. 18: S137–44, 1997.

MULDOON, M., BARGER, S., RYAN, C., FLORY, J., LEHOCZKY, J., MATTHEWS, K., MANUCK, S., Effects of Lovastatin on cognitive function and psychological wellbeing. *Am J Med*. 108:538-547, 2000.

NABEL, E.G., Genomic medicine: Cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine*. 72: 349–60, 2003.

NADAREISHVILI, Z.G., LI, H., WRIGHT, V., MARIC, D., WARACH, S., HALLENBECK, J.M., DAMBROSIA, J., BACKER, J.L., BAURD, A.E., Elevated pro-inflammatory CD4+ Cd28-lymphocytes and stroke recurrence and death. *Neurology* 63:1446–1451, 2004.

NAKAHARA, K., KURIYAMA, M., SONODA, Y., ve ark., Myopathy induced by HMG-CoA reductase inhibitors in rabbits: a pathological, electrophysiological, and biochemical study. *Toxicol Appl Pharmacol*. 152 (1):99-106, 1998.

NARLA, V., BLAHA, M.J., BLUMENTHAL, R.S., MICHOS, E.D., The JUPITER and AURORA clinical trials for rosuvastatin in special primary prevention populations: perspectives, outcomes, and consequences. *Vasc. Health Risk Manag.* 5:1033-42, 2009.

NATARAJAN, A.T., Chromosome aberrations: past, present and future, *Mutat. Res.* 504: 3-16, 2002.

NAVAS, P., VILLALBA, J.M., DE CABO, R., The importance of plasma membrane coenzyme Q in aging and 123ort responses. *Mitochondrion*. 7: S34-40, 2007.

NELSON, D. L., COX, M. M., Lehninger, *Biyokimyanın İlkeleri*. Cilt no: 313, Necdet Kılıç (çev. ed.), Palme Yayıncılık, Ankara, 2005.

NERVI, F.O., DIETSCHY, J.M., The Mechanisms of and the Interrelationship between Bile Acid and Chylomicron-Mediated Regulation of Hepatic Cholesterol Synthesis in the Liver of the Rat. *J. Biol. Chem.* 250: 8704-8711, 1975.

NEZASA, K., HIGAKI, K., MATSUMURA, T., INAZAWA, K., HASEGAWA, H., NAKANO, M. AND KOIKE, M., Liver-specific distribution of rosuvastatin in rats: comparison with pravastatin and simvastatin. *Drug Metab Dispos.* 30: 1158–1163, 2002.

NISSEN, S.E., NICHOLLS, S.J., SIPAHI I, ve ark., Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. *JAMA*. 295 (13): 1556–65, 2006.

NISSINEN, A., BERRIOS, X., PUSKA, P., Community-based noncommunicable disease interventions: lessons from developed countries for developing ones. *Bull. World. Health. Organ.* 79: 963-70, 2001.

NORPPA, H., BONASSI, S., HANSTEEN, I.L., ve ark., Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res.* 600(1-2), 37-45, 2006.

NOWACZYK, M.J., ZEESMAN, S., WAYE, J.S., DOUKETIS, J.D., Incidence of Smith-Lemli-Opitz syndrome in Canada: results of three-year population surveillance. *J Pediatr.* 145:530-5, 2004.

NUEBEL T, DAMROT J, ROOS WP, KAINA B, FRITZ G. Lovastatin protects human endothelial cells from killing by ionizing radiation without impairing induction and repair of DNA double-strand breaks. *Clin Cancer Res.* 12: 933–939, 2006.

OLSON, R.E., Discovery of the lipoproteins, their role in fat transport and their significance as risk factors. *J. Nutr.* 128(2): 439S–443S, 1998.

OLSSON, A. G., MCTAGGART, F., RAZA, A., Rosuvastatin: A Highly Effective New HMG-CoA Reductase Inhibitor. *Cardiovasc Drug Rev.* 20(4): 303–328, 2002.

OLSSON, A. G., PEARS, J., MCKELLAR, J., MIZAN, J. AND RAZA, A., Effect of rosuvastatin on lowdensity lipoprotein cholesterol in patients with hypercholesterolemia. *Am J Cardiol.* 88: 504-8, 2001.

ONAT, A., MERCANOĞLU, F., ÖRNEK E., ve ark., Lovastatin'in 31 Primer Hiperkolesterolemili Kişideki Etkileri. *Türk Kardiyol Dern Arş.* 18:4, 1990.

ONAT, A., UĞUR, M., TUNCER, M., AYHAN, E., KAYA, Z., KÜÇÜKDURMAZ, Z., ve ark. Age at death in the Turkish Adult Risk Factor Study: temporal trend and regional distribution at 56,700 person-years' follow-up. [Article in Turkish] *Türk Kardiyol. Dern. Arş.* 37: 155-60, 2009.

ONAT, A., TOKGÖZOĞLU, L., SOYDAN, İ., ve ark., Higher Efficacy of 10 mg/day of Simvastatin in Turkish Patients with Hyperlipidemia. *Arch Turk Soc Cardiol.* 28:635-642, 2000.

ORSI ,A., SHERMAN, O., WOLDESELASSIE, Z., Simvastatin-associated memory loss. *Pharmacotherapy.* 21(6):767-9, 2001.

OSBORNE, T.F., GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S., 5' end of hmg CoA reductase gene contains sequences responsible for cholesterol-mediated inhibition of transcription. *Cell.* 42(1): 203-212, 1985.

OSTLING, O., JOHANSON, K.J., Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123: 291-298, 1984.

ÖZATA, M., Vitamin Mineral ve Bitkisel Ürün Rehberi, Güner yayınları, İstanbul, 2008.

PAOLETTI, R., FAHMY, M., MAHLA, G., MIZAN, J. AND SOUTHWORTH, H., ZD4522 is superior to pravastatin and simvastatin in reducing low density lipoprotein cholesterol, enabling more hypercholesterolemic patients to achieve target low density lipoprotein cholesterol guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 37(A); 1261–74, 2001.

PAOLISSO, G., BARBAGALLO, M., PETRELLA, G., ve ark., Effects of simvastatin and atorvastatin administration on insulin resistance and respiratory quotient in aged dyslipidemic non- insulin dependent diabetic patient. *Atherosclerosis.* 150:121-7, 2000.

PDR, Physicians' Desk Reference, 59th ed., Thomson PDR, Montvale, NJ, USA, 2005.

PERK, J., BACKER, G.D., ve ark. Avrupa Klinik Uygulamada Kardiyovasküler Hastalıklardan Korunma Kılavuzu (İngilizceden çeviri). *Türk Kardiyol. Dern. Arş.* 40:1-76, 2012.

PIERCE, L.R., WYSOWSKI, D.K., GROSS, T.P., Myopathy and rhabdomyolysis associated with lovastatin-gemfibrozil combination therapy. *Jama.* 264:71-5, 1990.

PSATY, B.M., FURBERG, C.D., RAY, W.A., WEISS, N.S., Potential for conflict of interest in the evaluation of suspected adverse drug reactions: use of cerivastatin and risk of rhabdomyolysis. *JAMA.* 292 (21): 2622–31, 2004.

RAINWATER, D.L., MARTIN, L.J., COMUZZIE, A.G., Genetic control of coordinated changes in HDL and LDL size phenotypes. *Clin Exp Med.* 1: 121-125, 2001.

RAINWATER DL, MOORE OH, SHELEDY WR, DYER TD, SLIFER SH. Characterisation of composite gradient gel 125ort he electrophoretic separation of lipoproteins. *J Lipid Res.* 38: 1261-1266, 1997.

RAVNSKOV, U., Kolesterol Gerçeği. Hayy Kitap. İstanbul, 2012.

REED, D., YANO, K., KAGAN, A., Lipids and lipoproteins as predictors of coronary heart disease, stroke, and cancer in the Honolulu Heart Program. *Am J Med* 80: 871-8, 1986.

RIDKER, P.M., RIFAI, N., ve ark., Inflammation, pravastatin and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation.* 98: 839-44, 1998.

RIDKER, P.M., ve ark., Rosuvastatin to preventvascular events in men and women with elevated c reaktive protein. *N. Engl J. Med.* 359: 2195-2207, 2008.

ROBINSON, R.L., SUTER, W., COX, R.H., Carcinogenicity and Mutagenicity Studies with Fluvastatin, a New, Entirely Synthetic Hmg-Coa Reductase Inhibitor. *Fund App Toxicol.* 23 (1), 9-20, 1994.

ROSENSON RS, TANGNEY CC., Antithrombotic properties of statins. Implications for cardiovascular event reduction. *JAMA.* 1643-50, 1998.

ROSS, G.M., MCNILLAN, T.J., WILCOX, P., COLLINS, A.R., The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay) technical aspects and application. Report of the Fifth LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer research, *Mutat. Res.* 337: 57-60, 1995.

ROSS, R., Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 340:115. 1999.

ROSSNER, P., BOFFETTA, P., CEPPI, M., BONASSI, S., SMERHOVSKY, Z., LANDA, K., JUZOVA, D., SRÁM, R.J., Chromosomal aberrations in lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer. *Environ Health Perspect.* 113(5): 517-20, 2005.

RUBIN, E., FARBER J.L., (Eds.) *Pathology.* 3rd ed. Pp. 491–509, 520- 522, Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999.

RUBINS, H. B. ve ark., Gemfibrozil 126ort he Secondary Prevention of Coronary Heart Disease in Men with Low Levels of High-Density Lipoprotein Cholesterol. *N Engl J Med.* 341:410-418, 1999.

RUSCIANI, L., PROIETTI, I., PARADISI, A., ve ark., Low plasma coenzyme Q10 levels as an independent prognostic factor for melanoma progression. *J Am Acad Dermatol.* 54(2): 234-41, 2006.

RUSSELL, D.W., Cholesterol biosynthesis and metabolism. *Cardiovasc. Drugs. Ther.* 6: 103–10, 1992.

RUTISHAUSER, J., The role of statins in clinical medicine LDL cholesterol lowering and beyond. *Swiss Med Wkly.* 136(3-4): 41-9, 2006.

RYDBERG, B., JOHANSON, K. J., DNA repair Mechanism, Academic Press, Newyork, 465-468, 1978.

SACKS, F.M., ve ark., The Effect of Pravastatin on Coronary Events after Myocardial Infarction in Patients with Average Cholesterol Levels. *N Engl J Med.* 335(14): 1001-9, 1996.

SARIDOĞAN, M.E., Statinlerin Kemik Üzerine Etkileri. *Türk Osteoporoz Dergisi.* 9 (3): 114-119, 2003.

SARIKAYA, R., “Sodyum Nitrit, Sodyum Nitrat, Potasyum Nitrit ve Potasyum Nitrat’ın Genotoksik Etkisinin Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile Araştırılması”, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri, Ankara, 2005.

SASAKI, Y.F., KAWAGUCHI, S., KAMAYA, A., OHSHITA, M., KABASAWA, K., IWAMA, K., TANIGUCHI, K., TSUDA, S., The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives, *Mutat. Res.* 519 (1-2): 103-119, 2002.

SATOH, K., YAMATO, A., NAKAI, T., HOSHI, K., ICHIHARA, K., Effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on mitochondrial respiration in ischaemic dog hearts. *Br J Pharmacol.* 116, 1894-1898, 1995.

SATTAR, N., PREISS, D., MURRAY, H.M., ve ark., Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of 127ort he127ed statin trials. *Lancet.* 375: 735-742, 2010.

SAVAGE, J.R.K., Update on target theory as applied to chromosomal aberrations. *Environ. Mol. Mutagen.* 22: 198-207, 1993.

SAYGI, Ş., Deneysel toksikolojide toksisite testleri ve test sonuçlarının önemi. *Gulhane Med J.* 45 (3): 291-298, 2003.

SCHACHTER, M., Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol.* 19(1), 117-25, 2005.

SCHALK, B.W.M., VISSER, M., DEEG, D.J.H., BOUTER, L.M., Lower levels of serum albumin and total cholesterol and future decline in functional performance in older persons: the Longitudinal Aging Study Amsterdam. *Age Ageing.* 33(3): 266-272, 2004.

SCHMIDT-LUCKE, C., FICHTLSCHERER, S., ROSSIG, L., KAMPER, U., DIMMELER S., Improvement of endothelial damage and regeneration indexes in patients with coronary artery disease after 4 weeks of statin therapy. *Atherosclerosis.* 211:249-254, 2010.

SCHWARTZ, G.G., OLSSON, A.G., ve ark., Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) Study Investigators. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic event in acute coronary syndromes: The MIRACL Study: A randomised controlled trial. *JAMA.* 285:1711-8, 2001.

SEVEN (Seven Countries Study Group), The diet and all-causes death rate in the Seven Countries Study. *Lancet.* 2: 58-61, 1981.

SHEPHERD, J., The statin era: in search of the ideal lipid regulating agent. *Heart.* 85:259-64, 2001.

SHEPHERD, M.D., STUART, M., COBBE, M.D., FORD, I., ve ark. Prevention of Coronary Heart Disease with Pravastatin in Men with Hypercholesterolemia. *N Engl J Med.* 333, 1301-1308, 1995.

SHITARA, Y., SUGIYAMA, Y., Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drugdrug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharmacol Ther.* 112(1), 71-105, 2006.

SIEBERLINK, H.M.J., VAN BOVEN A. Cholesterol lowering in primary prevention improves coronary flow reserve and coronary vascular resistance. 71st Scientific Sessions of the American Heart Association, Dallas, TX, November. 1998.

SINGH, N.P., MCCOY, M.T., TICE, R.R., SCHNEIDER, E.L., A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175: 184-191, 1988.

SIRTORI, C.R., HDL and the progression of atherosclerosis: new insights. *Eur Heart J Suppl*, (F): F4-F9, 2006.

SMITH, P.F., EYDELLOTH, R.S., GROSSMAN, S.J., ve ark., HMG-CoA reductase inhibitor-induced myopathy in the rat: cyclosporine A interaction and mechanism studies. *J Pharmacol Exp Ther.* 257 (3):1225-35, 1991.

SNYDER, R.D., Lovastatin enhances the genotoxicity of doxorubicin in Chinese hamster V79 cells via noncovalent DNA binding. *Drug Chem Toxicol.* 32(1):17-20, 2009.

SPARKS, D.L., SABBAGH, M.N., CONNOR, D.J., ve ark., Atorvastatin for threat of mild to moderate Alzheimer disease: preliminary results. *Arch Neurol.* 62:753-7, 2005.

SSSS, The Scandinavian Simvastatin Survival Study Group: Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet.* 344:1383-8, 1994.

STAMLER, J., SHEKELLE, R., Dietary cholesterol and human coronary heart disease. The epidemiologic evidence. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 112:1032-40, 1988.

STARCK, L., LOVGREN-SANDBLOM, A., BJORKHEM, I., Simvastatin treatment in the SLO syndrome: A safe approach? *Am J Med Genet.* 113 (2); 183-189, 2002.

STEPHAN, G., PRESSL, S., Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes from healthy subjects as detected in first cell division. *Mutat Res.* 446(2), 231-7, 1999.

STREJA, D., Combination therapy for the treatment of dyslipidemia. *Curr Opin Investig Drugs* 5: 306-12, 2004.

SÜZEN, S., UÇKUN, Z., Doğal farmasötiklerden statinlerin toksisitesi. *Modern Fitofarmakoterapi ve Doğal Farmasötikler.* 1, 14-21, 2010.

TAN, K.C.B., CHOW, W.S., HAM, S.C.F., ve ark., Atorvastatin lowers C-reactive protein and improves endothelium-dependent vasodilatation in Type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 87:563-8, 2002.

TATA, F., HENRY, I., MARKHAM, A.F., WALLIS, S.C., WEIL, D., GRZESCHIK, K.H., JUNIEN, C., WILLIAMSON, R., HUMPHRIES, S.E., Isolation and characterisation of a cDNA clone for human apolipoprotein CI and assignment of the gene to chromosome 19. *Hum. Genet.* 69(4): 345-9, 1985.

TICE, R.R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, J.C., SASAKI, Y.F., Single cell gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35: 206-221, 2000.

TICE, R.R., VAZQUEZ, M., Protocol for the application of the pH>13 alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells, *ILS.* 1998; 1-9, 1998.

TOBERT, J.A., Efficacy and long-term adverse effect pattern of lovastatin. *Am J Cardiol.*; 62: 28J-34J, 1988.

TOPAKTAŞ, M., RENCÜZOĞULLARI, E., *Sitogenetik (2. baskı)*, Ankara. Nobel Yayın, 2010.

TOTH, P., The Good Cholesterol High-Density Lipoprotein. *Circulation* 111(5): e89–e91, 2005.

TUCKER, J.D., PRESTON, R.J., Chromosome aberrations, mikronuklei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment. *Mutat Res.* 365: 147-159, 1996.

TULENKO, T.N., SUMNER, A.E., The physiology of lipoproteins. *J Nucl Cardiol.* 9(6): 638-49, 2002.

TYMOCZKO J.L., BERG, J.M., STRYER, L., *Biochemistry (sixth edition)*, New York: W.H. Freeman and Co., 2007.

UYANIK, Ö., Sıçanlarda indometazinle oluşturulan mide ülseri üzerine atorvastatinin etkisinin incelenmesi. *Uzmanlık Tezi*, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2007.

UYAR, B., Rosuvastatin kalsiyumun elektrokimyasal Davranışlarının incelenmesi ve farmasötik Preparatlardan miktar tayini, Yüksek Lisans. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2009.

UYYSAL, H.B., Atorvastatinin lenfosit alt grupları ve monositler ile inflamatuvar belirteçler üzerine etkisi. *Uzmanlık Tezi*, Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Aydın, 2008.

ÜNAL, Y., Radyoterapi gören kanserli hastalara ait kan lenfositlerinde DNA hasarının comet assay tekniği ile araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara,1998.

ÜRESİN, Y., SABIRLI, S., Statinlerin güvenliliği, Türk Kardiyol Dern. 35(1): 15-23, 2007.

ÜYÜKLÜ, M., Atorvastatin tedavisiyle plazma kolesterol konsantrasyonunun düşürülmesinin eritrosit mekaniğine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı, Antalya, 2006.

VANCE, D.E., VANCE, J.E., Biochemistry of Lipids and Membranes. The Benjamin Cummings publishing Company, Menlo Park, CA, 1985.

VALLEJO, A.N., WEYAND, C.M., GORONZY, J.J., T-cell senescence: a culprit of immune abnormalities in chronic inflammation and persistent infection. Trends Mol Med. 10:119–124, 2004.

VIOLA, G., GROBELNY, P., LINARDI, M.A., SALVADOR, A., ve ark., The Phototoxicity of Fluvastatin, an HMG-CoA Reductase Inhibitor, Is Mediated by the formation of a Benzocarbazole-Like Photoproduct. Toxicol Sci. 118(1): 236-250, 2010.

VURAL, K., TUĞLU, M.I., Neurotoxic effect of statins on mouse neuroblastoma NB2a cell line. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 15 (9):985-91, 2011.

WAGSTAFF, L.R., MITTON, M.W., ARVIK, B.M., DORAISWAMY, P.M., Statinassociated memory loss: analysis of 60 case reports and review of the literature. Pharmacotherapy. 23: 871-880, 2003.

WALKER, K.H., HALL, D.W., HURST, W.J., Clinical Methods, The History, Physical, and Laboratory Examinations, Stoneham (MA): Butterworth Publishers Third ed., Chap 31; 1990.

WANG, Q., TANG, X.N., WANG, L., YENARI, M.A., YING, W., GOH, B.C., Effects of high dose of simvastatin on levels of dopamine and its reuptake in prefrontal cortex and striatum among SD rats. Neurosci. Lett., 408, 189-193, 2006.

WARWICK, M.J., DANE, A.L., RAZA, A., SCHNECK, D.W., Single- and multiple-dose pharmacokinetics and safety of the new HMG-CoA reductase inhibitor ZD4522. Atherosclerosis 151:39, 2000.

WB, The World Bank. World development indicators 2002. Washington DC: The World Bank; 2002. İnternet erişimi: <http://econ.worldbank.org>, Erişim tarihi: 01.02.2013.

WEIS, H. J., DIETSCHY, J. M. Failure of bile acids to control hepatic cholesterologenesis: Evidence for endogenous cholesterol feedback. *J. Clin. Invest.* 48: 2398-2408, 1969.

WESTWOOD, F.R., BIGLEY, A., RANDALL, K., MARSDEN, A.M., SCOTT, R.C., Statin-induced muscle necrosis in the rat: distribution, development, and fibre selectivity. *Toxicol Pathol.* 33(2):246-57, 2005.

WEYAND, C.M., BRANDES, J.C., SCHMIDT, D., FULBRIGHT, J.W., GORONZY, J.J., Functional properties of CD4+ CD28-T cells in the aging immune system. *Mech Ageing Dev* 102:131–141, 1998.

WHO, World Health Organisation, World Health Statics 2012, WHO Press, France, 2012.

WHO, World Health Organization, Joint WHO/FAO Expert Consultation on Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. Report No: 916. 2002.

WITZTUM, J.L., Drugs used in the treatment of hyperdyslipidemias. In: Hardman J.G., Limbird L.E., Molinof P.B., Ruddon R.W., Gilman A.G., eds. *Goodman and Gilman's the pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th ed. New York : McGraw-Hill International Book Co; chap 36 : 875- 97, 1996.

WONG, W.W., DİMİTROULAKOS, J., MİNDEN, M.D., PENN, L.Z., HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell:the statin family of drugs as trrggers of tumorspecific apoptosis. *Leukemia.* 16:508-19, 2002.

YALÇIN, A., KILINÇ, E., SAGCAN, A., KÜLTÜRSAY, H., Coenzyme Q10 concentrations in coronary artery disease. *Clin Biochem.* 37(8), 706-9, 2004.

YILMAZ, S., AKSOY, H., ÜNAL, F., ÇELİK, M., YÜZBAŞIOĞLU, D., Genotoxic action of fungicide Conan 5FL on mammalian cells in vivo and in vitro”, *Russ J Genet.* 44 (3): 273-278, 2008.

YILMAZ, S., Bazı Gıda Katkı Maddelerinin Genotoksik Etkileri, (Doktora Tezi), Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2008.

YÜZBAŞIOĞLU, D., ÇELİK, M., YILMAZ, S., ÜNAL, F., AKSOY, H., Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes, *Mutat. Res.* 604 (1-2): 53-59, 2006.

ZEITLINGER, M., MÜLLER, M., Clinico-pharmacologic explanation models of cerivastatin associated rhabdomyolysis. *Wien Med Wochenschr.* 153 (11–12): 250–4, 2003.

ZHOU, Q., LIAO, J.K., Pleiotropic effects of statins - Basic research and clinical perspectives. *Circ J.* 74: 818–826, 2010.

ZIMMERMANN, F. K., VAN BORSTEL, R. C., PARRY, J. M., STIEBERT, D., ZETTERBERG, G., VON HALLE, E. S., BARAK, R. AND LOPRIENO, N., Testing of chemicals for genetic activity with *Saccharomyces cerevisiae*, US EPA Gene-Tox Program, *Mutat. Res.* 133: 199-244, 1984.

ÖZGEÇMİŞ

Ahmet Ali BERBER 27.05.1982 tarihinde Sakarya'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Sakarya'da tamamladı. 2005 yılında Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden Biyolog ünvanı ile mezun oldu. 2006 yılında başladığı SAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansını tamamladı. 2008 yılında aynı enstitüde doktora programına başladı ve halen devam etmektedir. Evli ve bir çocuk babasıdır.