

70339

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA VE KLİNİK BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI

**HMG CoA REDÜKTAZ İNHİBİTÖRLERİ İLE KOLESTEROL
DÜŞÜRÜLMESİNİN KAN VE DOKU ATP DÜZEYLERİ VE
ERİTROSİT MEMBRAN LİPİDLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DR. SEZER ÇALIŞKAN

UZMANLIK TEZİ

PROF. DR. BANU ÖNVURAL

TEZ YÖNETİCİSİ

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**İNCİRALTI - İZMİR
1998**

TEŐEKKÜR

Biyokimya ve Klinik Biyokimya uzmanlık öğrenimim boyunca destek ve yardımlarını gördüğüm Anabilim Dalı Başkanımız ve tez danışmanım Prof. Dr. Banu Önvural'a,

deneysel çalışmamın cerrahi kısmını gerçekleştiren Vet. Hek. Çetin Pekçetin'e, deney hayvanları laboratuvarında çalışmamıza olanak sağlayan Prof. Dr. Ataman Güre'ye, çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen Öğr. Gör. Uzm. Dr. Filiz Kuralay'a ve eşim Dr. Mehmet Çalışkan'a, istatistiksel analizlerimi yapan Okay Saydam'a, tezimin yazımı sırasında bana tecrübelerinden yararlanma imkanı veren Prof. Dr. Sinan Taş'a,

ayrıca dört yıl boyunca birlikte çalıştığım bölümümüz tüm öğretim üyelerine ve diğer çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Sezer Çalışkan

KISALTMALAR

ADP	: adenozin difosfat
AST	: aspartat aminotransferaz
ATP	: adenozin trifosfat
CK	: kreatin kinaz
ETF	: elektron transfer eden protein
FAD	: flavin adenin dinükleotid
FMN	: flavin mononükleotid
HDL	: high density lipoprotein (yüksek dansiteli lipoprotein)
IDL	: intermediate density lipoprotein (orta dansiteli lipoprotein)
LPL	: lipoprotein lipaz
NAD	: nikotinamid adenin dinükleotid
NCEP	: National Cholesterol Education Program
Pi	: inorganik fosfor
SOD	: süperoksit dismutaz
TG	: trigliserid
UQ	: ubikinon
UQH ₂	: ubikinol
LDL	: low density lipoprotein (düşük dansiteli lipoprotein)
VLDL	: very low density lipoprotein (çok düşük dansiteli lipoprotein)

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. KOLESTEROL SENTEZİ	2
2.2. KOLESTEROL SENTEZİNİN DÜZENLENMESİ	4
2.2.1. Mevalonat sentezindeki iki enzimin regülasyonu	4
2.2.2. LDL reseptörlerinin “feed-back” regülasyonu	4
2.2.3. Hormonal düzenlenme	5
2.2.4. Transkripsiyonun sterol aracılı regülasyonu	5
2.3. KOLESTEROLÜN ÖNCÜLÜ OLDUĞU BİLEŞİKLER	5
2.4. KOLESTEROLÜN HÜCRE MEMBRANLARINDAKİ ROLÜ	5
2.5. KOLESTEROL SENTEZİNİN ARA ÜRÜNLERİ	7
2.6. UBİKİNON	9
2.6.1. Ubikinonun elektron transport zinciri ve ATP oluşumundaki rolü	9
2.6.2. Ubikinonun serbest radikal üretimindeki rolü	12
2.6.3. Ubikinonun antioksidan rolü	13
2.7. KOLESTEROL DÜŞÜRÜLMESİNİN GEREKLİLİĞİ	14
2.8. KOLESTEROL DÜŞÜRÜCÜ TEDAVİLER	16
2.8.1. Diyet	16
2.8.2. İlaçla tedavi	16
2.9. DÜŞÜK KOLESTEROLÜN VE/VEYA KOLESTEROL DÜŞÜRÜLMESİNİN ZARARLI ETKİLERİ	21
2.9.1. Düşük kolesterol ve kanser	21
2.9.2. Düşük kolesterol ve depresyon	22
2.9.3. Düşük kolesterol ve intihar	22
2.9.4. Düşük kolesterol ve serotonin düzeyleri	22
2.9.5. HMG CoA redüktaz inhibitörleri ve rabdomiyoliz	23

3. MATERYAL VE METOD	25
3.1. KULLANILAN ALETLER	25
3.2. KULLANILAN KİTLER VE REAKTİFLER	25
3.3. DENEYSEL ÇALIŞMA	26
3.4. KAN ATP ANALİZİ	26
3.5. PLAZMA ANALİZLERİ	27
3.5.1. AST ölçüm yöntemi	27
3.5.2. CK ölçüm yöntemi	27
3.5.3. TG ölçüm yöntemi	27
3.5.4. Kolesterol ölçüm yöntemi	27
3.6. DOKU ATP ANALİZLERİ	28
3.6.1. Deproteinizasyon	28
3.6.2. Spektrofotometrik ölçüm	28
3.7. ERİTROSİT MEMBRANLARINDA YAPILAN ANALİZLER	28
3.7.1. Eritrosit membranlarının elde edilmesi	28
3.7.2. Membran protein içeriğinin belirlenmesi	29
3.7.3. Eritrosit membranı lipid ekstraksiyonu	29
3.7.4. Membran fosfolipid düzeylerinin belirlenmesi	29
3.7.5. Membran kolesterol düzeylerinin belirlenmesi	29
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	29
4. SONUÇLAR	30
5. TARTIŞMA	35
6. ÖZET	38
7. KAYNAKLAR	39

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kan kolesterol düzeyi ile mortalite arasında "U" şeklinde bir ilişkinin varlığı son 20 yılda birçok çalışmada belirtilmiştir (1). "U"nun sağ kolu, yüksek kolesterol düzeylerinde koroner kalp hastalığına bağlı yüksek ölüm riskini yansıtır ve iyi bilinmektedir. Bu neden-sonuç ilişkisi geri dönüşebilir olup kolesterol düşürücü tedavilerle önlenmeye çalışılır. "U"nun sol kolu ise düşük kolesterol düzeylerinde nonkardiyovasküler nedenlere bağlı ölümlerdeki artmış riski yansıtır. Bu ilişkinin nedenleri henüz tam olarak anlaşılammıştır. Kadın ve erkeklerde 160 mg/dl'nin altındaki değerlerde nonkardiyovasküler nedenlere bağlı ölümlerin belirgin olarak arttığı saptanmıştır. Bu nedenler arasında kanser, intihar, kazalar ve respiratuar sisteme bağlı ölümler sayılabilir (2).

Kolesterol düzeyleri yüksek olan hastalardaki kardiyovasküler hastalık riskini azaltmak amacıyla kullanılan kolesterol düşürücü ajanlardan bir tanesi de HMG CoA redüktaz inhibitörleridir. HMG CoA redüktaz inhibitörleri güçlü kolesterol düşürücü ajanlardır. Kompetitif olarak HMG CoA redüktazı inhibe ederler. Bu enzim bilindiği gibi, kolesterol sentezinde hız sınırlayıcı enzimdir ve HMG CoA'nın mevalonata dönüşümünü katalizler. Mevalonat, kolesterolün olduğu gibi, diğer bazı izopren bileşiklerinin de prekürsördür (dolikal, ubikinon gibi). Ubikinonun başlıca fonksiyonu mitokondriyal elektron transport zincirinde, dolayısıyla, ATP üretiminde rol almasıdır. Bazı araştırmacılar HMG CoA redüktaz inhibitörleri ile tedavi sırasında serum ubikinon düzeylerinin düşmesinin ubikinona bağlı fonksiyonlarda azalmaya yol açacağını ve sellüler hasarın meydana geleceğini öne sürmüşlerdir (3).

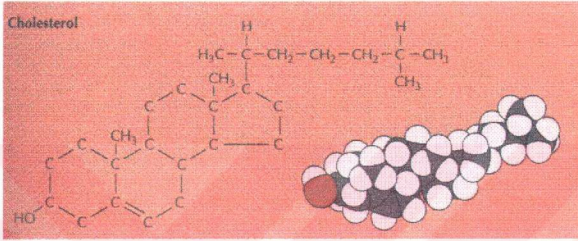
Ratlarda yapılan çalışmalar ubikinonun intrasellüler yerleşimi nedeniyle serum ubikinon düzeylerinin doku ubikinon düzeylerini yansıtmadığını göstermektedir. Ubikinonun elektron transport zincirindeki görevini gözönüne alarak dokulardaki ATP konsantrasyonunun HMG CoA redüktaz inhibitörü ilaçlar tarafından etkilenme olasılığını düşündük. Bu çalışmada HMG CoA redüktaz inhibitörleri ile kolesterol düşürülmesinin membran lipidlerinde nasıl bir değişiklik yaptığını, ayrıca kan ve doku ATP düzeylerine yansıyan bir etkisi olup olmadığını araştırmak amacıyla ratlarda eksperimental bir çalışma yürüttük.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KOLESTEROL SENTEZİ

İnsanlarda total vücut kolesterolünün yaklaşık %66'sı endojen sentezlenir. Kolesterol sentezi hemen hemen tüm dokularda gerçekleşir. Bunların başında karaciğer, barsak, adrenal korteks, overler, testisler ve plasenta gelir.

Kolesterolün 27 karbonlu yapısı kompleks bir sentez düşündürse de bütün karbon atomları tek bir prekürsörden, asetatdan gelir (Şekil 2.1) (4).



Şekil 2.1. Kolesterolün yapısı

Kolesterol sentezi dört basamakta özetlenebilir (Şekil 2.2):

1- Üç Asetat Ünitesinin Altı Karbonlu Ara Ürün, Mevalonat'ı Oluşturmak Üzere Kondanze Olması:

İki molekül asetil koenzim A'nın kondenzasyonu asetoasetil koenzim A'yı ve bu yapının üçüncü bir asetil koenzim A ile kondenzasyonu 6 karbonlu β -hidroksi- β -metilglutaril-koenzim A (HMG CoA)'yı oluşturur. Bu ilk iki reaksiyon sırasıyla tiolaz ve HMG CoA sentaz enzimleri tarafından katalizlenir ve reverzibldir.

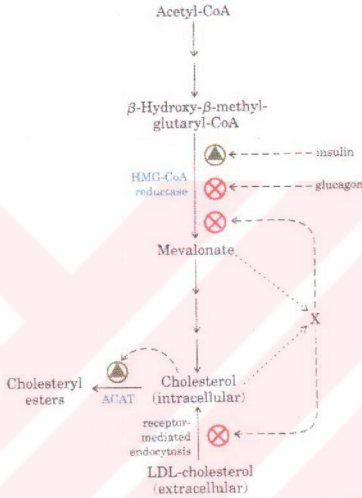
Üçüncü reaksiyon bağlayıcı basamaktır: HMG CoA'nın mevalonat'a redüksiyonu. Bu reaksiyonda elektron verici olarak NADPH kullanılır. Bu reaksiyonu katalizleyen HMG CoA redüktaz enzimi (EC 1.1.1.88) düz endoplazmik retikulumun bir integral membran proteinidir ve kolesterol sentezinin hız sınırlayıcı basamağıdır. 97 kilodalton ağırlığındadır ve bu enzimi kodlayan gen, kromozom 5'de bulunur.

2- Mevalonat'ın Aktif İzopren Ünitelerine Dönüşümü:

Bu evrede 3 ATP molekülünden 3 fosfat grubu mevalonat'a transfer olur. Fosfat, mevalonat'ın üçüncü karbonundaki hidroksil grubuyla birlesir, 3-fosfo-5-piropofomevalonat meydana gelir. Bir sonraki basamakta fosfat ve yakınındaki karboksil grubu ayrılır ve 5 karbonlu üründe çift bağ oluşturulur. Δ^3 İzopropenil piropofosfat, ilk aktif izopren meydana gelir. Bu yapının izomerizasyonu ile dimetil allil piropofosfat, ikinci aktif izopren oluşur.

2.2. KOLESTEROL SENTEZİNİN DÜZENLENMESİ

İnsan hücreleri mevalonat sentezinin düzenlenmesinde kompleks bir problemle karşılaşılır çünkü mevalonat metabolizmasının son ürünü olan kolesterol hücrede sentezlenebildiği gibi reseptör bağımlı endositoz ile hücreye giren LDL'den de köken alır. Her hücre sterolün aşırı birikimini önlemek için bu eksternal ve internal kaynaklar arasında bir denge kurmalıdır. Bu denge çeşitli yollarla sağlanır (Şekil 2.3.) (5).



Şekil 2.3. Kolesterol sentezinin düzenlenmesi.

2.2.1. Mevalonat Sentezindeki İki Enzimin Regülasyonu

LDL yokluğunda hücreler mevalonat sentezinde görev alan HMG CoA sentaz ve HMG CoA redüktaz enzimlerinin yüksek aktivitelerini korur. LDL varlığında her iki enzimin aktiviteleri %90'dan fazla azalır ve hücreler sadece kolesterol ara ürünlerinin sentezi için gereken miktarda mevalonat üretir. Eğer LDL ile sağlanan eksternal kolesterol çok fazla ise HMG CoA redüktaz aktivitesi ve dolayısıyla mevalonat üretimi durdurulur.

2.2.2. LDL Reseptörlerinin “feed-back” Regülasyonu

Hücre yüzeylerindeki LDL reseptörleri Apo B₁₀₀ ve Apo E'yi tanıyarak şilomikron kalıntıları ve LDL'leri bağlarlar. Bağlanmış LDL hücre yüzeyinde “clathrin” kaplı çukurcuklardan türeyen endositik kesecikler içinde

hücrelere girer. Daha sonra kabuklarından ayrılan endositik kesecikler, içinde LDL'nin reseptörlerinden ayrıldığı endosomları oluşturmak üzere birleşirler. Reseptörlerin ayrılmasını Apo B'nin parçalanması ve kolesterol esterlerinin hidrolizi izler. Açığa çıkan serbest kolesterol, LDL reseptörlerinin sentez hızını negatif "feedback" ile düzenler .

2.2.3. Hormonal Düzenleme

HMG CoA redüktaz enzimi inaktif (fosforillenmiş) ve aktif (fosforillenmemiş) formlarda bulunur. Glukagon,enzimin fosforilasyonunu stimüle eder ve kolesterol sentez hızını azaltır. İnsülin ise defosforilasyonu stimüle eder ve enzimi kolesterol oluşturmak üzere aktifleştirir.

2.2.4. Transkripsiyonun Sterol Aracılı Regülasyonu

Karaciğer hücreleri tarafından alınan şilomikron kalıntıları ve hem karaciğer, hem de periferik dokuların hücreleri tarafından alınan LDL partikülleri kolesterol sağlarlar. Bu durum HMG CoA redüktaz geninin transkripsiyonunun azalmasına neden olur .

2.3. KOLESTEROLÜN ÖNCÜLÜ OLDUĞU BİLEŞİKLER

İnsandaki bütün steroid hormonlar kolesterolden köken alır. Böbrekten inorganik iyonların reabsorpsiyonunu kontrol eden mineralokortikoidler ve glukoneojenezi düzenleyen, inflamatuvar cevabi azaltan glukokortikoidler adrenal kortekste sentezlenir. Seks hormonları ise erkek ve dişi gonadlar ile plasentada sentezlenir. Bu hormonlar, kadın ve erkeklerde sekonder seksüel karakterlerin gelişimini sağlayan östrojenler ve androjenler ile, kadınlarda reproduktif siklusu düzenleyen progesterondur. Bu hormonların sentezi kolesterolün D halkasının 17. karbonundaki yan zincirden çeşitli sayıda karbonların uzaklaşması ile mitokondride meydana gelir .

Safra asitleri karaciğerde kolesterolden sentezlenirler. Bu sentez çok basamaklı bir yoldur. Steroid halkasına hidroksil gruplarının katılması, B halkasının çift bağının indirgenmesi ve hidrokarbon zincirinin 3 karbon kısalması gerekir.

Kolesterolden sentezlenen diğer bir bileşik ise D vitamindir. Kolekalsiferol olarak adlandırılan vitamin D₃ biyolojik olarak aktif değildir, fakat kalsiyum ve fosfat metabolizması için esansiyel olan 1,25- dihidroksikolekalsiferolün prekürsürüdür .

2.4. KOLESTEROLÜN HÜCRE MEMBRANLARINDAKİ ROLÜ

Hücrelerin yapı ve fonksiyonları büyük oranda membranlara bağlıdır. Membranlar sadece hücre içini çevreden ayırmakla kalmaz,nukleus gibi sitoplazmik organelleri de çevreler. Biyolojik membranların yapısı lipidlerin çeşitli oranlarda birleşmesinden oluşur. Bütün hücre membranlarında proteinlerle ilişkili fosfolipid tabakalarından oluşan ortak bir yapı vardır (Tablo 2.1.) (6).

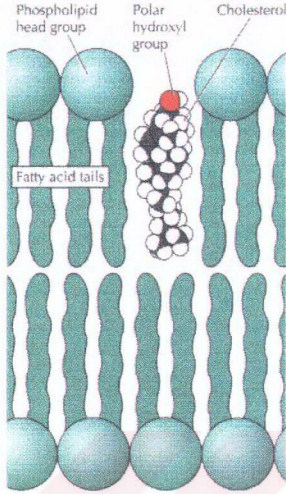
Lipid	Plazma membranı		Düz endoplazmik Retikulum	Dış mitokondriyal Membranlar
	E.Coli	eritrosit		
Fosfatidilkolin	0	17	55	50
Fosfatidilserin	0	6	3	2
Fosfatidiletanolamin	80	16	16	23
Sfingomyelin	0	17	3	5
Glikolipidler	0	2	0	0
Kolesterol	0	45	6	<5
Diğer	20	0	7	15

Tablo 2.1.: Hücre membranlarının lipid kompozisyonu

Membran proteinlerinin çok çeşitli fonksiyonları vardır; bazıları hücrenin eksternal sinyallere cevap vermesini sağlayan reseptörler olarak çalışırken bazıları moleküllerin membrandan transportunu sağlar ve diğerleri elektron transportu ile oksidatif fosforilasyonda görev alırlar. Bunun yanında membran proteinleri hücrelerin diğer hücrelerle ve multisellüler organizmalarla ilişkilerini kontrol eder.

Hücre membranlarının asıl yapı taşı fosfolipidlerdir. Fosfolipidler amfipatik moleküllerdir ve fosfat içeren hidrofilik baş grubu ile iki hidrofobik yağ asidinden oluşurlar. Yağ asidi kuyrukları suda çözünmediği için membranın iç kısmında yer alırken yüklü baş grupları her iki tarafta suyla temastadır. Fosfolipid tabakası iki kompartıman arasında stabil bir bariyer oluşturduğu için bütün biyolojik membranların esas yapısına katılır. Kısa zincirli yağ asitleri arasındaki etkileşimler uzun olanlardan daha zayıftır ve membranların düşük sıcaklıklarda akışkan kalmasını sağlar. Ansütüre yağ asitlerini içeren lipidler de çift bağlarının oluşturduğu bükülmeler nedeniyle membran akışkanlığını artırır.

Kolesterol hidrokarbon halka yapısı nedeniyle, membran akışkanlığının belirlenmesinde önemli bir rol oynar. Kolesterol molekülleri polar hidroksil gruplarıyla membranın içine girer ve fosfolipidlerin hidrofilik baş gruplarıyla kaplanır. Kolesterolün rijit hidrokarbon halkası, yağ asidi zincirinin fosfolipid baş gruplarıyla komşu olan bölgesiyle etkileşir. Bu etkileşim yağ asidi zincirinin o bölgesini diğer bölgelerinden daha rijit yapar ve mobilitesini azaltır. Ayrıca düşük sıcaklıklarda membran akışkanlığını korur (Şekil 2.4.).

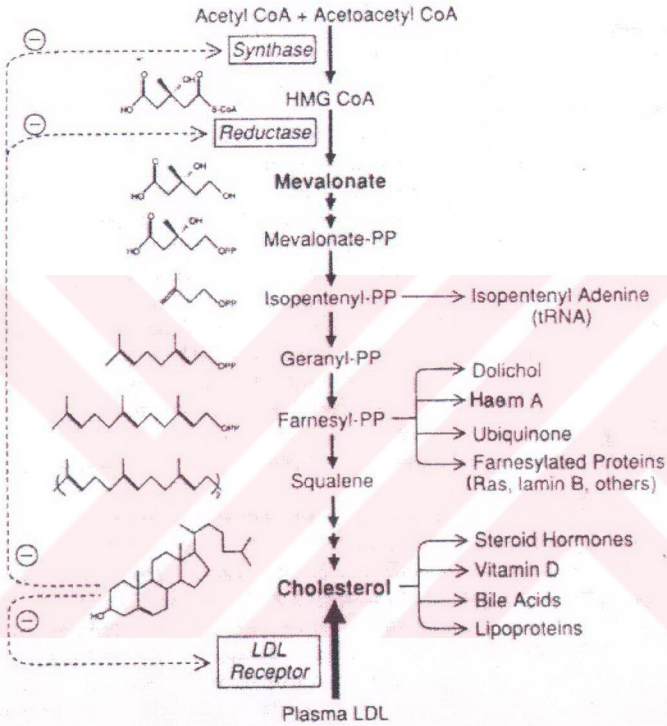


Şekil 2.4. Membran lipid kompozisyonu

2.5. KOLESTEROL SENTEZİNİN ARA ÜRÜNLERİ

İzopentenil pirofosfat, kolesterol sentezindeki rolünün yanısıra, değişik biyolojik görevleri olan birçok molekülün aktif prekürsürüdür. Bu moleküllerin içinde A, E ve K vitaminleri, karoten gibi bitki pigmentleri, klorofilin fitol zinciri, birçok esansiyel yağlar (limon yağı, ökalptus), metamorfozu kontrol eden insekt juvenil hormon, kompleks polisakkarit sentezinde taşıyıcı olarak görev alan dolikoller sayılabilir. İç mitokondriyal membrandaki elektron transport sisteminin üyeleri olan ubiquinonun polliizopren yan zincirinin ve sitokromların yapısında bulunan Hem A'nın farnezil rezidüsünün prekürsörü de izopentenil pirofosfattır.

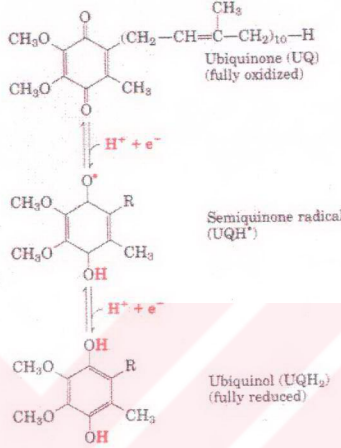
İzoprenil ara ürünlerinin diğer bir rolü son yıllarda gösterilmiştir. GTP bağlayıcı proteinlerden olan ras proteinini kodlayan genin mutasyonu birçok kanser hastasında bulunmuştur ve aktif (mutant) Ras proteini, kanser hücrelerindeki kontrol edilemeyen hücre bölünmesine katkıda bulunan faktörlerdendir. Protein sentezlendikten sonra karboksil ucundaki sistein kalıntısının farnezil alkolü ile tioeter bağı ile bağlanmasıyla kovalent olarak değişikliğe uğrar ve plazma membranının iç yüzüyle birleşir. Bu prenilasyon reaksiyonundaki farnezil vericisi farnezil pirofosfattır. Ras proteininin kansere neden olan aktivitesinin farnezil grubunun varlığına bağlı olduğu ve prenilasyon önlenirse kontrol edilemeyen hücre bölünmesine neden olamayacağı bildirilmiştir (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. Kolesterol sentezinin ara ürünleri

2.6. UBİKİNON

Ubikinin, çok uzun yan zincirli, yağda eriyebilen bir benzokinondur. Bir elektron alarak semikinin radikaline ve iki elektron alarak ubikinole dönüşür (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Ubikinin yapısı

Ubikinin birçok farklı, fakat birbiriyle ilişkili hücreyel olayda fonksiyonel olarak rol alan, çok yönlü bir moleküldür. Açık formülü 2,3 -dimetoksi - 5 - metil - 6 - multiprenil -1,4 - benzokinon olan ubikinin, mitokinin, koenzim Q 10 veya Q₂₇₅ olarak adlandırılır. İlk olarak 1957'de Crane ve ark. tarafından mitokondriyal süksinoksidaz sistemindeki elektron transport zincirinin zorunlu bir komponenti olarak tanımlanmıştır (7).

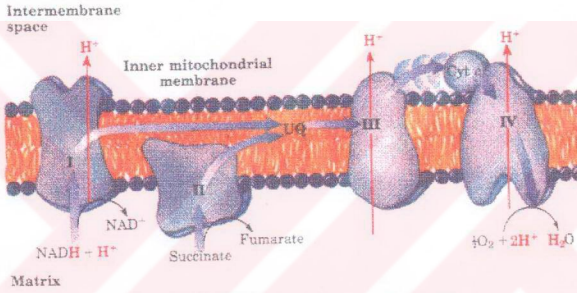
Ubikinin küçük ve hidrofobik bir molekül olduğu için iç mitokondriyal membranın lipid bariyerinden rahatça difüze olur ve indirgeyici ekivalanlarla membrandaki daha az mobil diğer elektron taşıyıcıları arasında bir mekik oluşturur. İndirgenmiş formunda süksinat dehidrojenaz, NADH dehidrojenaz ve sitokrom b-c₁ aktivitelerini düzenleyerek elektron transport zincirinden enerji serbest bırakılma hızını etkiler. İç mitokondriyal membran protonmotif gradientinin bir elemanı olarak rol alır, elektron transport zincirinin oksidoredüksiyon reaksiyonlarında açığa çıkan enerjinin korunmasını sağlar. Ek olarak hem hasar veren serbest radikallerin üretiminde, hem de membran komponentlerini peroksidatif hasarlardan koruyan bir antioksidan olarak görev yapar.

2.6.1. Ubikinin'un Elektron Transport Zinciri ve ATP Oluşumundaki Rolü

Oksidatif fosforilasyon, aerobik organizmalardaki enerji veren metabolizmaların sonucudur. Aerobik hücrelerde karbohidratlar, lipidler ve amino asitlerin oksidatif yıkılımindaki bütün enzimatik basamaklar hücreyel solunumun aynı final evresinde

buluşur: elektronlar katabolik ara ürünlerden moleküler oksijene akarken, oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarıyla sağlanan enerji, ADP ve inorganik fosfordan ATP sentezlenmesi için kullanılır. Oksidatif fosforilasyon mitokondride meydana gelir, iç mitokondriyal membran solunum zinciri komponentlerini ve ATP sentezi için gereken enzim kompleksini taşır. Dehidrojenazlar pirüvat dehidrojenaz kompleksi, sitrik asid siklusu, β oksidasyon ve amino asidlerin katabolizmasındaki oksidatif basamaklarda ortaya çıkan elektronları toplar ve solunum zincirine ulaştırır (8).

İç mitokondriyal membranın deterjanlarla muamelesiyle her biri solunum zincirinin bir fraksiyonunu temsil eden beş elektron taşıyıcı kompleks tanımlanmıştır. Kompleks I ve II, elektronların farklı elektron donörlerinden ubikinona transferini katalizler. Kompleks I' in donörü NADH, kompleks II nin ise süksinatır. Kompleks III, elektronları ubikinondan sitokrom c'ye taşır, kompleks IV, elektronları sitokrom c'den moleküler oksijene transfer eder. Kompleks V ise ATP sentezini katalize eder (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. Elektron transport zinciri

2.6.1.1. Kompleks I

NADH dehidrojenaz kompleksi olarak da adlandırılır. Yaklaşık 40 polipeptid zinciri içeren bir flavoprotein kompleksidir. İç mitokondriyal membrana gömülüdür, NADH bağlayıcı bölgesi matrikse yönelir ve çeşitli matriks dehidrojenazlarınca oluşturulan NADH'larla etkileşir. Enzim kompleksi, indirgeyici ekivalanları ilk olarak prostetik grubu olan flavin mononükleotid (FMN)'e transfer eder. Kompleksde 7 tane demir-sülfür (Fe-S) bölgesi vardır, elektronlar bu yolla FMN'den ubikinona geçer.

2.6.1.2. Kompleks II

Sitrik asid siklusundaki tek membrana bağlı enzim olan süksinat dehidrojenaz kompleksi olarak da adlandırılır. Kompleks I'den daha küçük ve daha basittir, dört polipeptid zinciri ve iki tip prostetik grubu vardır. Elektronlar süksinatdan FAD'a, sonra Fe-S boyunca ubikinona ulaşır.

Ayrıca β oksidasyonun birinci basamağında açıl CoA dehidrojenazlarca ortaya çıkarılan elektronlar FAD'dan elektron transfer eden flavoprotein (ETF) 'e ve ETF-ubikinon oksidoredüktaz'a geçer ve ubikinonu ubikinole indirger.

Gliserolün dihidroksiasetonfosfata dönüşümü gliserol-3-fosfat dehidrojenaz enzimi tarafından katalizlenir. Bu enzim iç mitokondriyal membranın dış yüzeyinde yerleşen bir flavoproteindir ve ubikinonu indirgeyerek elektronları respiratuar zincire ulaştırır.

2.6.1.3. Kompleks III

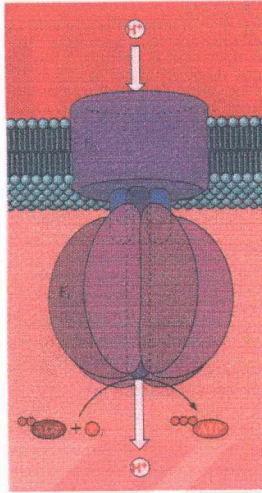
Sitokrom b-c₁ kompleksi veya ubikinon-sitokrom c oksidoredüktaz olarak adlandırılır. Sitokrom b₅₆₂, b₅₆₆, c₁, bir demir-sülfür proteini ve altı protein subünitesi içerir. Sitokrom b membranı kateder, c₁ ve Fe-S protein dış yüzeyde yerleşir. "Q siklusu" denilen bir seri reaksiyonla ubikinol ubikiona okside olur ve sitokrom c, demir atomunun geri dönüşümlü olarak Fe⁺³ şeklinden Fe⁺² şekline dönüşmesiyle indirgenir.

2.6.1.4. Kompleks IV

Sitokrom oksidaz olarak adlandırılır. Sitokrom aa₃'ü içerir. Sitokrom aa₃ büyük bir proteinin farklı bölgelerine bağlı 2 hem grubundan oluşur. İki bakır iyonu içerir: Cu_A ve Cu_B. Bu sitokrom, hem halkasının moleküler oksijen ile direkt olarak reaksiyona girebileceği bir serbest bağ yapısına sahip olan tek elektron taşıyıcısıdır. Kompleks IV boyunca 4 elektron sitokrom c'den moleküler oksijene aktarılarak H₂O'ya indirgenir. Kompleks I ve II transfer ettikleri her çift elektron için 4 protonu, kompleks IV ise transfer ettiği her çift elektron için 2 protonu matriksten membranlar arası bölgeye pompalar. Toplam olarak NADH'dan gelen her çift elektron için 10, FADH₂'den gelen her çift elektron için 6 proton pompalanmış olur. Protonlar pozitif yüklü partiküller oldukları için iç mitokondriyal membranın iki tarafı arasında bir voltaj farkı meydana gelir (mitokondri matriksi negatif, iç membranın sitozolik kısmı ise pozitif) (9).

Mitokondri matriksi ile membranlar arası bölgenin pH farkının 1 ünite olması, matriksde proton konsantrasyonunun 10 kat az olması ve voltaj farkı nedeniyle bir elektrokimyasal gradient meydana gelir ve protonlar membranlar arası boşluktan matrikse göç eder. İç mitokondriyal membran protonlara geçirgen değildir, protonlar membranı ancak proton spesifik kanallarla geçebilirler. Bu sınırlama elektrokimyasal gradientteki enerjinin ATP sentezi için kullanılmasını sağlar.

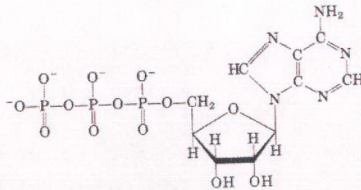
ATP sentezi, bir iç membran protein kompleksi olan ve kompleks V olarak da adlandırılan ATP sentaz (F₀F₁ ATPaz) tarafından yapılır. ATP sentaz iki majör komponent içerir: protonları ileten F₀ ve ATP sentezleyen F₁. F₁ izole halde iken ATP'yi ADP ve Pi'ye hidroliz eder. Bu nedenle, F₁ ATPaz olarak adlandırılır. Ancak F₀ ile kompleks halde iken ADP ve Pi'den ATP sentezleyebilir (Şekil 2.8.).



Şekil 2.8. ATP Sentaz

ATP sentezi için gereken serbest enerji yaklaşık 3 protonun pompalanmasıyla elde edilir. NADH'dan gelen her çift elektron için 10 proton pompalanır ve 1 NADH molekülünün oksidasyonu ile 3 ATP meydana gelir. FADH_2 'nin oksidasyonu 6 protonun transferiyle sonuçlandığı için 1 FADH_2 molekülünün oksidasyonu ile 2 ATP meydana gelir.

ATP bütün hücrelerde kimyasal enerjinin başlıca taşıyıcısıdır, enerjiyi ekzergonik reaksiyonlardan endergonik reaksiyonlara taşır, ve hücrelerdeki katabolik ve anabolik reaksiyonlar arasındaki bağı sağlar. ATP'nin terminal fosfat grubu birçok akseptör moleküle transfer edilebilir ve bu sırada oluşan ADP tekrar ATP sentezi için kullanılır (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. ATP'nin yapısı

2.6.2. Ubikinonun Serbest Radikal Üretimindeki Rolü

Serbest radikaller mitokondriyal elektron zinciri aktivitesi sırasında üretilir ve süperoksit radikal oluşumu mitokondriyal oksijen kullanım hızı ile doğru orantılıdır.

$O_2^{\bullet-}$ 'den güçlü oksidan ajanların oluşumu çeşitli formlarda demirin varlığında lipid peroksidasyonunu uyarır ve iletir, membran fonksiyonunu değiştirir ve böylece sellüler homeostaz için sürekli bir tehdit oluşturur.

Ubikinonun semikinon formu ($CoQ^{\bullet-}$), süperoksid radikali veren, mitokondriyal okside olabilen komponentidir. Ubikinon, iskemi epizodlarını izleyen serbest radikal hasarı etiyojisinde ve insan nötrofillerinin bir nonmitokondriyal NADH oksidaz sistemiyle süperoksid anyon üretiminde rol oynar. Fakat ubikinonun herhangi bir formda süperoksid oluşumundan direkt sorumlu olduğuna dair bir kanıt yoktur. Ubikinon analogları tarafından hem O_2 hem de süperoksid radikal üretiminin stimülasyonu ve her ikisinin de ubikinon antagonistleri tarafından inhibisyonu, endojen ubikinonun O_2 metabolizması ve nötrofillerdeki mikrobisidal reaksiyonlar için gerekli olduğunu gösterir (7).

2.6.3. Ubikinonun Antioksidan Rolü

Ubikinon (UQ) ve ubikinol (UQH_2), α tokoferolün lipid peroksidasyonuna karşı antioksidan aktivitesinin %20'sini gösterir. Ubikinol okside formdan yaklaşık 4 kat daha etkilidir. Mitokondriyal lipidlerin fotooksidasyonuna antioksidan etkileri incelendiğinde, oksidasyonu ubikinonun %76, ubikinolün %95, α tokoferolün ise %100 inhibe ettiği gözlenmiştir.

Oluşmuş oksijen radikallerinin süperoksid dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz ile elimine edilmelerinin dışında başka bir mekanizma, radikal oluşumunun engellenmesidir. Ubikinon, 2 elektron transferiyle daha stabil olan ubikinole çevrilir, böylece semikinon oluşumu ve serbest radikal oluşumu önlenir.

2.7. KOLESTEROL DÜŞÜRÜLMESİNİN GEREKLİLİĞİ

Koroner kalp hastalığı, koroner arterlerin lümenini daraltarak miyokarda oksijen sağlanmasını azaltan aterosklerotik plaklarla ilişkilidir. Bu olay, anjina pectoris, iskemiye bağlı aritmiler veya ani ölümlerle sonuçlanabilir. Koroner kalp hastalığının risk faktörleri arasında yaş, seks, total veya LDL kolesterolün yüksek düzeyleri, HDL kolesterolün düşük düzeyleri, hipertansiyon, sigara içimi, diyabet hastalığı, oklüzif periferel arter hastalığı hikayesi ve prematür koroner kalp hastalığı hikayesi sayılabilir (10).

Epidemiyolojik çalışmalar total kolesterol düzeyi ile bütün nedenlere bağlı mortalite arasında "U" şeklinde bir ilişki olduğunu belirtirler. Yüksek kolesterol düzeyleri özellikle koroner kalp hastalığına bağlı ölümlerde belirgin bir artışa bağlı olarak total mortaliteyi artırır (11).

Plazmadaki majör lipid bileşiklerinden ikisi olan kolesterol ve trigliseridler suda çözünemedikleri için dokulara lipoprotein partikülleri olarak taşınırlar. Dolaşımdaki lipoprotein partiküllerinin özellikleri Tablo 2.2.'de gösterilmiştir (12).

	Şilomikron	VLDL	IDL	LDL	HDL
Orijin	barsak	KC.	VLDL	VLDL, IDL	KC, barsak intravas.
Dansite	0,95	0,95-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,21
Elektroforetik mobilite	orijin	pre-beta	beta, pre-beta	beta	alfa
Partikül büyüklüğü(nm)	75-1,2	30-80	25-35	18-25	5-12
Apolipoprotein	B-48,A,C,E	B-100,C,E	B-100,E	B-100	A,C,E
Protein (%)	1	10	15	20	50
Majör lipid (%)	TG	TG	kol.	kol.	fosfolipid kolesterol

Tablo 2.2.: majör lipoproteinlerin kompozisyonları ve özellikleri

Lipoprotein bozukluklarının çok çeşitli sınıflandırmaları yapılmıştır. Tablo 2.3.'de familial dislipidemilerde Fredrickson Lewy sınıflandırmasının özeti görülmektedir .

Genetik bozukluk	Fenotip	Defekt	Klinik görünüm	Plazma kolesterol	Plazma TG
LPL eksikliği	I	LPL aktivitesi yokluğu	pankreatit ksantoma HSM	↑	↑
apo c-II eksikliği	I veya IV	apo c-II yok, eksik	pankreatit	↑	↑
hiperkolesterolemi	Ila veya IIb	LDL reseptör ve/veya apoB100 mutant	ksantoma ateroskleroz	↑	N,↑
disbeta lipoproteinemi	III	anormal apo E	ksantoma ateroskleroz	↑	↑
kombine hiperlipidemi	Ila, IIb,IV	bilinmiyor	ateroskleroz	N,↑	N,↑
hiperkolesterolemi	IV V	apoCIII artmış LPL'da defekt	ksantoma pankreatit	N,↑	↑

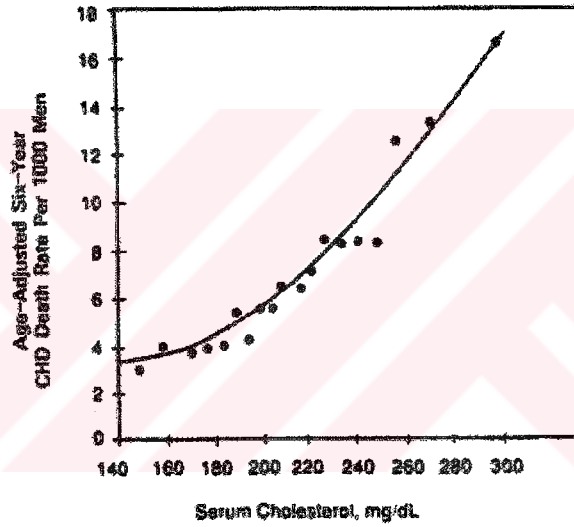
Tablo 2.3.: Familial dislipidemiler

Hiperlipidemi ayrıca çeşitli hormonal bozukluklara, ilaçlara veya çeşitli hastalıklara bağlı olarak da gelişebilir. Tablo 2.4.'de sekonder hiperlipidemilerin nedenleri görülmektedir .

Başlıca hipertrigliseridemi	Başlıca hiperkolesterolemi
obesite gebelik diyabet alkolizm renal yetmezlik östrojen tedavisi steroid tedavisi β-bloker tedavisi lipodistrofi disglobulinemi	hipotiroidizm nefrotik sendrom kolestaz diüretik kullanımı siklosporin kullanımı hepatoma

Tablo 2.4.: Sekonder hiperlipidemi nedenleri

LaRosa JC ve ark. serum kolesterol düzeylerinde %10'luk bir artışın koroner kalp hastalığı riskinde %20 artışla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (13)(Şekil 2.10.).



Şekil 2.10. Koroner kalp hastalığı ile kolesterolün ilişkisi

Farklı çalışmalarda LDL kolesterol/HDL kolesterol oranı 5'in üzerinde olan ve trigliseridi 200 mg/dl'den yüksek olan kişilerde koroner arter hastalığı riskinin arttığı (14,15) (Tablo 2.5.), ayrıca HDL kolesterolün 35 mg/dl'nin altında olmasının da koroner arter hastalığı için risk faktörü olduğu belirtilmiştir (16).

<200mg/dl	normal
200-400	sınır
400-1000	yüksek
1000<	çok yüksek

Tablo 2.5. : Trigliserid düzeylerinin sınıflandırılması

Kolesterol düzeyinin 180 mg/dl'den yüksek olmasıyla koroner kalp hastalığına bağlı mortalitenin direkt ilişkili olduğu ve total kolesterolde %10'luk bir düşüşün miyokard enfarktüsü riskini %15 azalttığı bildirilmiştir (17).

Koroner kalp hastalıklarına bağlı ölümlerle kolesterol düzeyi arasındaki ilişki, kişilerde kan kolesterolünün düşürülmesi yoluna gidilmesine neden olmuştur.

2.8. Kolesterol Düşürücü Tedaviler

2.8.1. Diyet

National Cholesterol Education Program (NCEP) ve American Heart Association, kolesterol düşürülmesi için Step 1 ve daha kısıtlayıcı Step 2 diyetlerini önermişlerdir (18). Her iki diyetinde de yağ alımı total kalori alımının %30'undan azı ile sınırlanır (%10'undan azı poliansatüre ve %10-15'i monoansatüre olmak üzere). Satüre yağlar step 1 diyetinde total kalorisinin %10'undan azı ve step 2 diyetinde %7'sinden azıdır. Kalori alımı ise istenilen vücut ağırlığını sağlamak üzere ayarlanır .

2.8.2. İlaçla tedavi

Eğer diyet ve diğer nonfarmakolojik önlemler (egzersiz, sigaranın bırakılması gibi) lipid düzeyini düşürmeye yetersiz kalırsa, ilaçla tedaviye başvurulur. Lipid düşürücü ilaçları başlıca beş grupta inceleyebiliriz:

2.8.2.1. Anyon Değiştirici Reçineler

İntestinal lümeninde safra asitlerini bağlayarak ve böylece reabsorbsiyonlarını bozup, fekal atımlarını arttırarak etki eden insolubl bileşiklerdir. Sonuçta safra asidi sentezi stimüle olur ve karaciğerde kolesterole olan gereksinim artar. Bu gereksinim kısmen hepatik LDL reseptörlerinin regülasyonu ile, kısmen de plazmadan LDL'nin temizlenme hızının artışı ile karşılanır. Bu grupta Kolestiramin ve Kolestipol bulunur.

2.8.2.2. Nikotinik Asid

Primer etkisi, lipolizin geçici inhibisyonuna bağlı olarak serbest yağ asitlerinin karaciğere sunumundaki azalma ve dolayısıyla trigliserid sentezi ve VLDL transportunun azalmasıdır. Ayrıca lipoprotein lipazın artmış aktivitesine bağlı VLDL klirensi artışı ve prekürsörü azaldığı için LDL sentezinde düşme görülür. Ayrıca ApoA₁'in klirensinde azalma ile HDL kolesterolün artışına neden olur. Kolesterol sentez hızını etkilemez.

2.8.2.3. Fibratlar

Bu ilaç grubunun prototipi Klofibrat'tır. Özellikle kas dokusunda olmak üzere, lipoprotein lipaz aktivitesinde artışa ve buna bağlı olarak VLDL katabolizmasında artışa neden olur. Ayrıca lipoprotein lipazın inhibitörü olan ApoC III'ün karaciğerde sentezini azaltır. Yağ asidi sentezini inhibe ederek ve peroksizomal proliferasyonla β -oksidasyonu arttırarak hepatik trigliserid sentezini azaltırlar. VLDL katabolizmasındaki artışa bağlı olarak LDL sentezinde istenmeyen bir artış meydana gelir fakat LDL klirensinin artışı ve HDL sentezinin artmasıyla kompanze edilir.

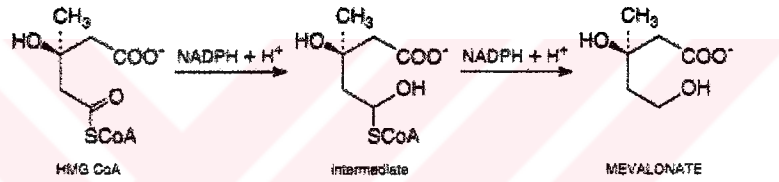
Bunun dışında doku kolesterolünün mobilizasyonunda artışa, kolesterolün biliyer sekresyonu ve fekal steroid atılımında artışa neden olur.

2.8.2.4. Probukol

Probukol, reseptör bağımlı mekanizmalarla LDL klirensini artırır. Ayrıca ApoA₁ sentezini azaltarak HDL düzeyinde de düşüğe neden olur. Trigliserid düzeyleri üzerine etkisi yoktur. Probukol ayrıca lipid peroksidasyonunu engelleyerek makrofajlar tarafından LDL alınmasını inhibe eder ve antioksidan etki gösterir.

2.8.2.5. HMG CoA Redüktaz İnhibitörleri

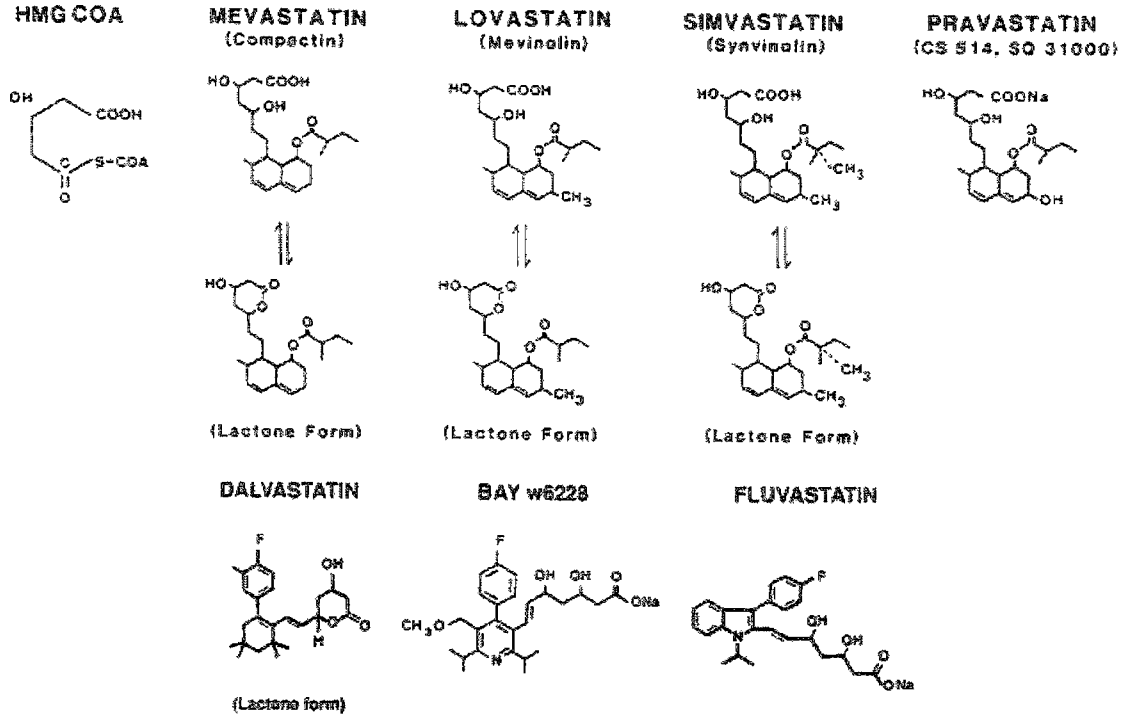
Hiperkolesterolemi tedavisinde önemli bir rol oynamaktadırlar. Bu ilaçlar HMG CoA'nın mevalonata dönüşümünü katalizleyen HMG CoA redüktazın kompetitif inhibitörleridirler. Kolesterol sentezindeki bu hız sınırlayıcı basamağı inhibe ederek intrasellüler kolesterol depolarını azaltırlar. Artmış miktarda LDL reseptörleri meydana gelir, intrasellüler kolesterol dengesi yeniden düzenlenir ve LDL'nin plazmadan uzaklaştırılışı hızlandırılır (Şekil 2.11.).



Şekil 2.11. HMG CoA redüktaz inhibitörlerinin etki yeri

2.8.2.5.1. HMG CoA Redüktaz İnhibitörlerinin Kimyasal Yapısı

İlk tanımlanan mevastatin (Kompaktin) dir. Daha sonra birçok HMG CoA redüktaz inhibitörleri üretilmiştir fakat klinikte çok azı kullanılır: lovastatin, simvastatin, pravastatin ve fluvastatin. Lovastatin aspergillus terreusun bir ürünüdür, simvastatin ve pravastatin lovastatinin kimyasal modifikasyonlarıyla üretilirler. Bu üç bileşik HMG CoA redüktazın CoA'yı tanıyan bölgesiyle etkileşen hidronaftalen halkası içerirler, ayrıca mevalonatı taklit eden hidroksi asid yan zincirleri vardır. Fluvastatin tamamen sentetik olan ilk HMG CoA redüktaz inhibitörüdür ve yapısı diğer fungal ürünlerden farklıdır. Fluvastatin florofenil eklenmiş indol halkasının mevalonolakton türevidir. Florofenil indol kısmı CoA'ya benzediği için HMG CoA redüktazı, yan zincir ise mevalonatı taklit eder (Şekil 2.12.) (19).



Şekil 2.12. HMG CoA redüktaz inhibitörlerinin yapısı

Lovastatin ve simvastatin inaktif laktonlar şeklindedir, farmakolojik aktivite için karşılık gelen β hidroksi asidine hidroliz olmalıdır, yani ilaç öncülüdürler. Bu hidroliz insanlarda karaciğerde meydana gelir. Pravastatin ve fluvastatin ise aktif hidroksi asid formlarında bulunurlar. Fluvastatin rasemiktir, eşit miktarlarda yüksek aktif (3R,5S) ve düşük aktif (5R, 3S) enantiomerler içerir. Yüksek aktif olan 30 kat daha güçlüdür. Fungal metabolitler ise sadece aktif enantiomer içerirler (20).

2.8.2.5.2. HMG CoA Redüktaz İnhibitörlerinin Absorbsiyon ve Metabolizmaları

Dört inhibitörün oral alımdan sonra absorpsiyon yüzdeleri farklıdır. Absorbsiyondan sonra hepsi de primer etki yerleri olan karaciğere gider. Oral dozun hepatik ekskresyonu da farklıdır. Hepatik ekskresyonun fazla olması periferik dokuları ilacın yan etkilerinden korur. İlaç alınmasıyla beraber yemek yenilmesi intestinal absorpsiyon ve hepatik ekskresyonu değiştirerek sistemik biyoyararlanımı etkiler. Sistemik sirkülasyonda proteinlere bağlanmaları da yine periferik dokuları ilacın yan etkilerinden korur. Ayrıca plazma yarı ömrü de yan etki gösterme potansiyellerini etkiler. İlaçların ana ekskresyonları hepatobilier yolladır. Natif ilacın renal ekskresyonu hidrofilik olduğu ve plazma proteinlerine az bağlandığı için sadece pravastatinde görülür (Tablo 2.6.). Lovastatin ve simvastatin çok hidrofobik oldukları için BOS'a penetrasyonları hidrofilik pravastatinden daha fazladır. Fakat proteinlere bağlanmaları fazla olduğu için BOS'da miktarlarının belirlenmesi güçtür (21).

Scandinavian Simvastatin Survival Study'de 4444 hastada 5.4 yıl boyunca HMG CoA redüktaz inhibitörleri kullanılmış, total kolesterolde %25, LDL kolesterolde %35 düşüş ve HDL kolesterolde %8 artış görülmüştür (22).

	Absorbsiyon (%)	plazma proteinlerine bağlanma (%)	hepatik ekstrak siyon (%)	renal atılım (%)	plazma yarı ömrü (saat)
lovastatin	31	>95	>69	30	3
simvastatin	61-85	98	>79	13	-
pravastatin	34	43-48	46	60	3
fluvastatin	>90	>99	>68	6	0,5-0,8

Tablo 2.6.: HMG CoA redüktaz inhibitörlerinin metabolizması

Todd J. Anderson ve ark. serum kolesterol düzeyleri 209 \pm 33 mg/dl olan 49 kişide diyet ve diğer kolesterol düşürücü ilaçların etkilerini karşılaştırmışlar ve asetil koline endotel bağımlı vazodilatatör cevabın en fazla HMG CoA redüktaz inhibitörleri ile birlikte antioksidan (probukol) verilen grupta olduğunu ayrıca probukolun bu kişilerde lipid düşürücü tedaviye bağlı gelişen istenmeyen koroner etkileri azalttığını bildirmişlerdir (23).

O'Driscoll ve ark. yaptıkları çalışmada simvastatinle tedavi sırasında endotel'in hem asetil kolinle stimüle edilmiş hem de bazal nitrik oksit (NO) aracılı dilatasyonunun bir ayda arttığını ve tedavinin sürdürülmesi ile etkinin devam ettiğini göstermişlerdir (24).

Treasure ve ark. nın yaptıkları başka bir çalışmada ise lovastatinle kolesterol düşürülmesinin aterosklerozlu kişilerde koroner arterlerin endotel bağımlı dilatasyonunu düzelttiği, bu lokal regülasyondaki düzelmelerin iskemik semptomların hafiflemesini ve aterosklerotik plağın stabilizasyonunu sağladığı gösterilmiştir (25).

Elektrokardiyogramlarında en az bir ST segment çökmesi gözlenen ve total kolesterol düzeyleri yüksek olan 40 hastada plasebo ile lovastatin tedavisi karşılaştırılmış, lovastatin alan grupta belirgin total kolesterol ve LDL kolesterol düşmesi ile birlikte ST segment çökmesinde %63 azalma, plasebo verilen grupta ise ST segment çökmesinde %10 azalma gözlenmiştir (26).

Corsini ve ark. hücre kültüründe yaptıkları çalışmada simvastatinin rat ve insan miyosit proliferasyonuna direkt inhibitör etkisi olduğunu göstermişlerdir (27). Fibroblast kültürlerinde kolesterol sentezi statinlerle inhibe edildiğinde HMG CoA redüktaz enzim düzeyinde belirgin bir artış gözlenmiştir. Bu artış, transkripsiyon ve mRNA'nın translasyonunda artışa ve protein degradasyonunda azalmaya bağlıdır. Ayrıca kolesistektomi geçiren hastaların karaciğer biyopsilerinde HMG CoA redüktaz aktivitesinin 12 kat arttığı ve LDL reseptör ekspresyonunun tedavi görmeyen kişilerdekinin %180'i olduğu gösterilmiştir.

HMG CoA redüktaz inhibitörlerinin koroner kalp hastalığı dışında kanser hastalığında da faydalı olduğu ileri sürülmektedir. İnhibitörlerin fosforillenmiş izoprenoid bileşiklerinin miktarını azaltarak ras proteinlerinin prenilasyonunu ve böylece tümör hücrelerinin büyüme hızını azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca azalmış dolikol düzeyinin glikoprotein senteziyle etkileşip hücre büyümesi için önemli olan

membran akışkanlığını değiştirmesinin de tümör hücrelerinin büyümesini yavaşlattığı gösterilmiştir (28).

Pravastatin ile tedavi edilen 51 familial hiperkolesterolemili hastada total ve LDL kolesterol düzeyleri belirgin olarak düşerken lipoprotein (a) düzeylerinde belirgin bir artış gözlenmiş ve bu artışın özellikle düşük moleküler ağırlıklı Apo (a) fenotipli kişilerde daha fazla olduğu gösterilmiştir (29). Lipoprotein (a)'nın aterojenik ve trombojenik etkileri olduğu ileri sürülmektedir.

2.8.2.6. LDL Aferezi

LDL aferez tekniği tüm kandan primer filtreyle ayrılan plazmanın dekstran-sülfat sellüloz kolonla LDL'den temizlenmesine dayanır. LDL kolesterol ve lipoprotein (a) düzeylerinin düşürülmesinde ilaçlardan daha etkilidir ve ilaçlara cevap vermeyen hastalarda kullanılır (30).

2.8.2.7. Gen Terapisi

Kardiyovasküler hastalıkların tedavisine yönelik gen çalışmaları arasında lipoprotein metabolizması bozukluklarına yönelik olanlar da yer almaktadır. Bu konuda son yıllarda çalışmalar artarak ilerlemekteyse de henüz gen nakli ve istenen genlerin istenenden şekillerde regülasyonlarının sağlanmalarında temel yöntemsel sorunlar tam olarak çözümlenmiş olmaktan uzaktır ve bu yaklaşımın yaygın klinik uygulamaları temel sorunların çözümlerini beklemektedir (31-33).

2.9. DÜŞÜK KOLESTEROLÜN VEVEYA KOLESTEROL DÜŞÜRÜLMESİNİN ZARARLI ETKİLERİ

Randomize çalışmalarda total kolesteroldeki hızlı düşmenin nonkardiyovasküler ölümlere neden olabileceği ifade edilmiştir. Düşük kolesterol düzeylerinde kardiyovasküler hastalıklara bağlı ölüm oranı azaldığı halde total mortalitedeki artışın birçok nedeni olabilir: kanser, hemorajik strok, kaza, intihar, respiratuar ve enfeksiyöz hastalıklar gibi (11). Total mortalitedeki artışın total kolesterolün 160 mg/dl'nin altındaki değerlerinde görüldüğü bildirilmiştir. ABD'de orta yaşlardaki kadın ve erkeklerin %10'unda total kolesterol bu sınırın altındadır. Çalışmalar düşük kolesterol düzeylerindeki bu mortalite artışının bir kısmının da düşük kolesterollü kişilerin başlangıçtaki sağlık durumunun kötü olmasına bağlı olduğunu göstermektedir. Ancak sağlıklı kişilerin ve erken ölümlerin çıkarılmasından sonra da çok düşük kolesterol düzeyleriyle mortalite arasındaki ilişki sürmektedir (34). Kısa vadede kardiyovasküler hastalıktan ölüm riski düşük olan sağlıklı kişilerde yapılan çalışmalarda koroner nedenlere bağlı ölüm oranındaki azalmanın çeşitli nonkardiyovasküler ölüm nedenlerindeki artışla dengelendiği bildirilmiştir (35).

2.9.1. Serum Kolesterolü ve Kanser

Whitehall çalışmasına 1967 ve 1969 yılları arasında başvuran 40-64 yaşları arasındaki 17718 erkek gönüllü 18 yıl boyunca izlenmiş, çeşitli kolesterol düzeyleri ile kanser ve diğer hastalıklara bağlı ölüm oranları arasındaki ilişki araştırılmıştır (36). 14 organın 6 tanesini tutan kanserlerde mortalitenin, en düşük kolesterol grubunda en fazla olduğu gözlenmiştir (128 mg/dl'nin altı). Bunların başında gelen akciğer kanseri ile kolesterol düzeyi arasında kuvvetli bir ters orantı olduğu, diğer 5 kanser bölgesinin ise rektum, karaciğer, pankreas, mesane ve böbrek olduğu belirtilmiş, ayrıca sigara içimi ile ilişkili kanserlerin en düşük kolesterol grubunda gözlemlendiği ve bütün kanser grupları topluca incelendiğinde, en yüksek mortalitenin en düşük kolesterol grubunda görüldüğü bildirilmiştir. Bunların dışında kardiyovasküler sistem hastalıkları ve kansere bağlı ölümler çıkarıldığında mortalite ile kolesterol konsantrasyonu arasında ters korelasyon saptanmıştır. Bu ilişki özellikle respiratuar hastalıklara bağlı mortalitede görülmektedir.

Wannamethee ve ark.nın yaptıkları çalışmada 40-59 yaşları arasında 7735 erkek gönüllü 14,8 yıl boyunca izlenmiş, gönüllülerin %5'inde görülen 185 mg/dl'nin altındaki kolesterol düzeylerinde özellikle kanser ve nonkardiyovasküler nedenlere bağlı ölümler olmak üzere bütün nedenlere bağlı ölümlerde artış gözlenmiştir (37). Kansere bağlı mortalitenin sadece bu grupta arttığı diğer gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı bildirilmiştir. Kolesterol düşüklüğüne yol açabilen çeşitli nedenler düzeltilindiğinde (yaş, sigara-alkol kullanımı gibi) kansere bağlı mortalite ile kolesterol düzeyi arasındaki ters ilişki azalsa da yine de anlamlı bir fark bulunduğu belirtilmiştir.

Newman ve ark. hipolipidemik ve antihipertansif ilaçların fare ve ratlarda kanser oluşumuna etkisini karşılaştırmışlar, antihipertansif ilaçların çok azında benign tümörler görülürken lipid düşürücülerin en sık kullanılan 2 grubu olan fibratlar ve HMG CoA redüktaz inhibitörlerinin karsinojenik olduğu gözlenmiştir (38). Karsinojenik etki çok yüksek ilaç düzeylerinde görüldüğü gibi, insanlara yakın dozlarda ilaç verilenlerde de gözlenmiştir.

Herrinton ve ark. 160000 kişiyi 8 yıl süresince izleyerek kolesterol düzeyleri ile beyin tümörleri arasındaki ilişkiyi incelemişler, süregelen kanserleri dışlamak için izlem, kolesterol ölçümünden 5 yıl sonra başlatılmış, 258 mg/dl'nin üzerindeki kolesterol düzeylerinde malign beyin kanseri görülme sıklığı daha az olsa da anlamlı bir fark gözlenmemiştir (39).

2.9.2. Düşük Kolesterol ve Depresyon

ABD'de R.E. Morgan ve ark.nın yaptığı çalışmada 50-89 yaşları arasında 1020 erkek 1972 ve 1987 yılları arasında izlenmiş, 70 ve daha fazla yaşı olanlarda 159 mg/dl'nin altındaki kolesterol değerlerinde depresyon, ≥ 160 mg/dl serum kolesterolü olanlardan 3 kat fazla gözlenmiştir (40). Bu ilişkinin yaşa bağlı olduğu düşünülmüş çünkü yapılan başka çalışmalarda genç erkeklerde depresyon ile kolesterol konsantrasyonu arasında bir ilişki gözlenmemiş, açıklaması da yaşlandıkça ideal kolesterol konsantrasyonunun artması ile yapılmıştır.

Gebelik sırasında yükselen serum kolesterol ve trigliseridleri doğumdan sonraki birkaç gün içinde düşer. Bu hızlı düşüşle duygulanım arasındaki ilişki sağlıklı gebelerde araştırılmış ve doğumdan sonraki 4 gün içinde kolesterol düşüşüyle depresif semptomlar arasında belirgin bir korelasyon bulunmuş, bu ilişki progesteron düzeyleri düzeltildikten sonra da devam etmiştir (41).

2.9.3. Düşük Kolesterol ve İntihar

Paris'de yapılan prospektif bir çalışmada düşük kolesterol konsantrasyonu veya kolesterol konsantrasyonundaki değişiklik ile erkeklerde intihar riski arasındaki ilişki araştırılmış, intihar nedeniyle ölüm riski ile düşük kolesterol düzeyi arasında bir ilişki olduğu saptanmıştır (42). Gallerani ve ark.nın çalışmasında intihara teşebbüs eden 331 kişi ve 331 kontrol incelenmiş, kolesterol konsantrasyonları intihara teşebbüs edenlerde kontrollere oranla düşük bulunmuştur (43). Her iki çalışmada da bu ilişkinin kolesterol düşüklüğünün yol açtığı depresyona bağlı olabileceği ya da depresyona bağlı iştah azalması ve kilo kaybı nedeniyle kolesterol düzeyinin düşebileceği belirtilmiştir.

Vartianien ve ark. ise kolesterol düşüklüğü ile kaza, intihar ve diğer nonkardiyovasküler ölümler arasında bir ilişki bulunmadığını bildirmişlerdir (44).

2.9.4. Düşük Kolesterol ve Serotonin Metabolizması

Beyin serotonin 1-A ve 2-A reseptörleri ve bu reseptörlerin fonksiyonel etkileşimleri depresyon patogeneğinde yer alır (45). Biyolojik membranlarda kolesterol, fosfolipid tabakası içinde dağılır, gevşek bağlandığı için serum kolesterolü ile serbestçe yer değiştirebilir. Serum kolesterolündeki azalma beyin hücrelerinde membran kolesterolünü azaltır, lipid mikroviskozitesini düşürür ve membran yüzeyindeki serotonin reseptörlerinin serotonin "uptake"inin azalmasına ve kandan beyin hücrelerine daha az serotonin girmesine neden olur (46). Serotoninin santral sinir sistemindeki fonksiyonlarından biri zararlı davranış impulslarının baskılanmasıdır.

Bunun sonucu olarak düşük kolesterol düzeyinin yatkınlığı olan kişilerde intihar veya şiddeti tetiklemesi bir olasılık olarak düşünülebilir.

Steegmans ve ark. bu hipotezden yola çıkarak 40-79 yaşları arasında tedavi görmeyen 30359 erkekte yaptıkları araştırmada 150 mg/dl'nin altındaki kolesterol değerlerinde serum serotonin konsantrasyonunu belirgin olarak düşük bulmuşlardır (47). Başka bir çalışmada depresyonlu kişilerin BOS'larında 5HIAA (serotoninin majör metaboliti) düzeyleri intihara teşebbüs edenlerde etmeyenlerden daha düşük bulunmuştur (48).

Maymunlarda yapılan bir çalışmada yağdan fakir diyetle beslenenlerde agresif davranışların arttığı gözlenmiş, depresyonu bu hayvanlarda tanımlamanın zor olduğu fakat insanlarda depresyon ve agresif davranışın yakın ilişkili olduğu bildirilmiş, ayrıca santral sinir sisteminde serotonin aktivitesi düşük bulunmuştur (49).

2.9.5.HMG CoA Redüktaz İnhibitörleri ve Rabdomiyoliz

HMG CoA redüktaz inhibitörleri kullanımı ile rabdomiyoliz gelişimi arasındaki ilişki birçok literatürde belirtilmiştir. Farklı iki olgu sunumunda simvastatin kullanan kişilerde rabdomiyoliz geliştiği ve ilacın kesilmesi ile semptomların gerilediği belirtilmiştir (50, 51). Her iki yayında da ubikinon eksikliğine bağlı azalmış mitokondriyal ATP üretiminin mitokondriyal disfonksiyon ve miyopatiye, ciddi vakalarda Na^+-Ca^{++} değişiminin bozulmasıyla intrasellüler kalsiyum artışı ve hücre ölümüne neden olabileceği ileri sürülmüştür. Ayrıca elektron mikroskopik çalışmalarda hücre hasarı gözlenmiştir. Bu etkinin özellikle siklosporin ile birlikte kullanımda arttığı çünkü siklosporinin HMG CoA redüktaz inhibitörlerinin biliyer atılımını azaltarak plazma düzeyini arttırdığı bildirilmiştir.

Laaksonen ve ark. hiperkolesterolemik 20 kişiye 4 dört hafta boyunca simvastatin vermişler, serum ubikinonunun tedaviden önce kontrollere göre yüksek olduğunu, tedaviden sonra %32 düştüğünü, ubikinon serumda lipoproteinlerle taşındığı için serum ubikinon/kolesterol oranının hasta ve kontrollerde aynı olduğunu bildirmişlerdir (52).

Aynı grup başka bir çalışmalarında simvastatin tedavisini 6 ay sürdürmüşler, serum ubikinonunda belirgin bir azalma görülürken iskelet kası ubikinon, ATP, kreatin ve kreatin fosfat düzeylerinde ve LDL'nin antioksidan kapasitesinde bir değişiklik görülmemiştir (53).

Watts ve ark. yüksek kolesterolü kişilerde simvastatin tedavisini düşük kolesterolü diyet kullanımı ve kontrol grubu ile karşılaştırmış, simvastatin kullanımı ile serum ubikinon düzeylerinde belirgin bir düşme göstermiş ve simvastatin dozu ile ubikinon düzeyi arasında ters korelasyon olduğunu belirtmişlerdir (3). Ubikinonun mitokondriyal fonksiyon ve antioksidan aktivite için gerekli olduğunu, plazma ve doku ubikinon düzeyleri dengede olduğu için plazma ubikinonundaki düşmenin statinlerin yan etkilerinden sorumlu olabileceğini, ayrıca antioksidan kapasitedeki azalma nedeniyle normal LDL kolesterol düzeylerine rağmen koroner ateroskleroz gelişimine neden olabileceğini bildirmişlerdir.

Düşük kolesterol düzeyleri ile kanser, intihar ve depresyon arasındaki ilişkinin kolesterolün düşük olmasına mı yoksa HMG CoA redüktaz inhibitörleri ile düşürme sırasında azalan ubikinon, Hem A, serotonin gibi maddelere mi bağlı olduğu kesinlik kazanmamıştır. Bazı yazarlar ikinci yolun daha ağır bastığı görüşündedirler.

Biz, ubikinon ve Hem A'nın rol aldığı oksidatif fosforilasyon reaksiyonları sonucunda mitokondriyal ATP üretiminin azalabileceği ve bahsedilen zararlı etkilerden sorumlu olabileceği düşüncesiyle, simvastatin verilen ratlarda kan ve doku ATP düzeyleri ile eritrosit membranı lipid kompozisyonunda bir değişiklik olup olmadığını araştırdık.



3. MATERYAL VE METOD

3.1. KULLANILAN ALETLER

<u>ALETİN CİNSİ</u>	<u>MODELİ</u>	<u>MARKASI</u>
1- Santrifüj	2.0 RS	Heraeus
2- Otoanalizör	opeRA	Technicon
3- Homojenizatör	Potter S	Braun
4- Spektrofotometre	CL-750	Schmadzu
5- Ultrasantrifüj	T-1180	Kontron
6- pH Metre	710A	Orion

3.2. KULLANILAN KİTLER VE REAKTİFLER

<u>KİT VEYA KİMYASAL MADDE</u>	<u>FİRMA</u>	<u>KATALOG NO</u>
1- Adenosine-5'-triphosphate (ATP)	Sigma	366-A
2- ASAT/GOT 20 monoreaktif	Biomerioux	63 212
3- ALAT/GPT 20 monoreaktif	Biomerioux	G 3312
4- Enzyline CK NAC optimise 20	Biomerioux	61145
5- Cholesterol enzyomatik PAP	Biomerioux	61 224
6- Triglyserides enzyomatik 150	Biomerioux	61 236
7- Phospholipides enzyomatik PAP 150	Biomerioux	61 491
8- Fluitest HDL-CHOL	Biocon	D-57299
9- Perklorik asid	Merck	B 604518 428
10- KOH	Sigma	6462
11- NaCl	Sigma	6400
12- EDTA-Na ₂	Sigma	10093
13- Tris	Sigma	T-3253
14- KHCO ₃	Sigma	12602
15- CH ₃ OH	Merck	K 24171808 733
16- CHCl ₃	Merck	K 149 6231
17- CaCl ₂	Sigma	12018
18- Na ₂ CO ₃	Sigma	6398
19- CuSO ₄	Sigma	12849
20- Na-K-tartarat	Sigma	S-8640
21- Folin-Chiocalteu çözültisi	Sigma	F-9252
22- Azot gazı	Habaş	
23- Anhidri asetik asit	Merck	48855
24- Glasiyel asetik asid	Merck	302011
25- Sülfirik asit	Merck	07208
26- Amonyum vanadat	Merck	071605
27- Amonyum molibdat	Sigma	61060
28- HNO ₃	Merck	K 23309043
29- H ₂ O ₂	Merck	K 17436700

3.2.1. Hazırlanan Çözeltiler

Hemoliz çözeltisi: 37,2mg EDTA-Na₂ ve 851mg Tris 1L bidistile suda çözülerek hazırlandı.

Taze alkali bakır sülfat çözeltisi: 0,1N NaOH içinde hazırlanan %2'lik Na₂CO₃ çözeltisine 1ml %1'lik CuSO₄ ve 1ml %2,7'lik Na-K-tartarat eklenerek hazırlandı.

Kolesterol renk reaktifi: 63 ml anhidri asetik asit, glasiyal asetik asit ile 100 ml'ye tamamlandı.

Vanadat çözeltisi: 1,227 g amonyum vanadat, distile su içinde çözüldü, 9,5 ml nitrik asit eklenerek distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

Molibdat çözeltisi: 24,9 g amonyum molibdat, distile su içinde çözüldü, 34 mlsülfirik asit eklenerek distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

3.3. DENEYSEL ÇALIŞMA

HMG CoA redüktaz inhibitörlerinin kan ve doku ATP düzeylerine ve eritrosit membran lipid kompozisyonuna etkilerini araştırmak amacıyla planladığımız çalışmada kullanılan dişi ve erkek ratlar Tarım Bakanlığı Veteriner Aşı Kontrol Laboratuvarı'ndan temin edildi. Swiss albino cinsi 18 rat 12 saat karanlık, 12 saat gün ışığı ile aydınlatılmış, sıcaklığı 20±2°C, nem oranı ise %55 olan odalarda barındırıldı. Beslemek için pelet rat yemi kullanıldı.

Ratlar 2 gruba ayrıldı. Kontrol grubunun (n=6) 4 hafta boyunca normal beslenmelerine devam edildi. Çalışma grubuna ise (n=12) 4 hafta boyunca normal besinlerinin yanısıra bir simvastatin preparatı olan Zocor'un (Merck & Co.,Inc) 2mg/ml'lik süspansiyonu, 10 mg/kg/gün'lük tek dozda, oral gavaj ile, sabah saatlerinde verildi (54).

Dördüncü haftanın sonunda çalışma ve kontrol grubuna intraperitoneal Ürethan anestezisi (1.25g/kg) uygulanarak ratların kalp, karaciğer, beyin ve kas dokuları disseke edilerek sıvı nitrojende hızla donduruldu ve analiz yapıncaya kadar (ortalama 15 gün) -70°C'de saklandı. Venöz kan örnekleri ise vena cava caudalis'den, K₃EDTA (1mg/ml) içeren tüplere alındı ve ATP analizine kadar buz içinde saklandı.

3.4. KAN ATP ANALİZİ

Kan ATP analizi aynı gün içinde yapıldı. %12'lik trikloroasetik asid solüsyonu ile deproteinizasyondan sonra fosfogliserat fosfokinaz (PGK) ve gliseraldehid fosfat dehidrojenaz (GAPD) enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlarla NADH'ın NAD'ye oksitlenmesine bağlı azalan absorbands 340 nm de ölçülerek ATP değerleri hesaplandı.



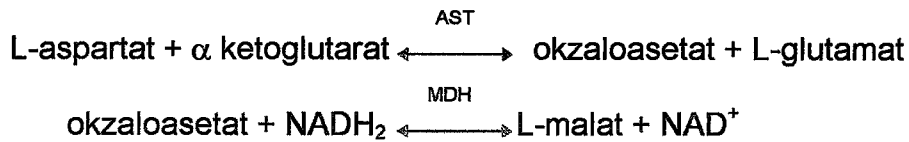


3.5. PLAZMA ANALİZLERİ

1500 g'de 10 dk santrifüjle ayrılan plazmadan total kolesterol, trigliserid, AST, LDH ve CK düzeyleri ölçüldü. Bütün analizler Biomerioux kitleri ile opeRA analizöründe yapıldı.

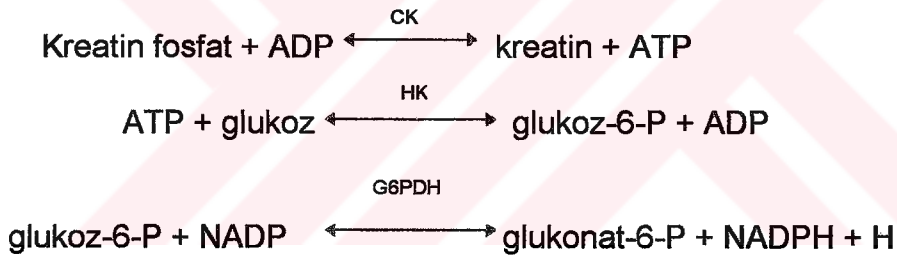
3.5.1. AST Ölçüm Yöntemi

Aspartat aminotransferaz aktivitesi, kinetik olarak, AST ve malat dehidrojenaz (MDH) tarafından katalizlenen reaksiyonlarla ölçüldü:



3.5.2. CK Ölçüm Yöntemi

Kreatin kinaz aktivitesi, kinetik olarak ölçüldü. N-asetilsistein ile CK'nın reaktivasyonunu CK, hekzokinaz (HK) ve glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PDH) enzimlerinin katalizlediği 3 reaksiyon izler:



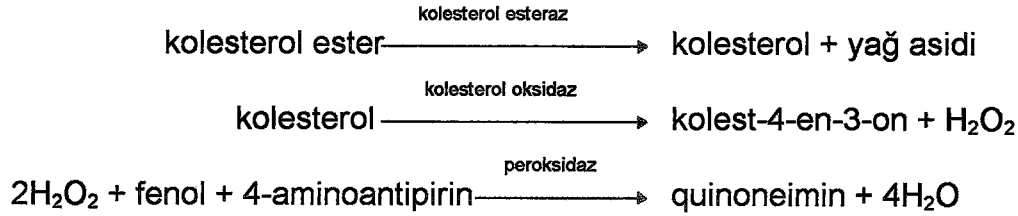
3.5.3. TG Ölçüm Yöntemi

Trigliserid düzeyi, aşağıdaki reaksiyonlarla enzimatik olarak ölçüldü:



3.5.4. Kolesterol Ölçüm Yöntemi

Kolesterol düzeyi, kolesterol esteraz ve kolesterol oksidazın katalizlediği reaksiyonlarla enzimatik olarak tayin edildi:



3.6. DOKU ATP ANALİZLERİ

3.6.1. Deproteinizasyon

- 1- Enzimatik aktiviteleri sıvı nitrojenle dondurulan kalp, karaciğer, beyin ve kas dokuları soğutulmuş mermer havanda toz haline getirildi.
- 2- Doku ağırlığının iki katından fazla 0,9 N perklorik asit donduruldu ve öğütüldü.
- 3- Donmuş durumdaki doku tozu ile asit karıştırılarak tekrar öğütüldü.
- 4- Asit etkisi ile enzimatik aktivite tahrip edilmeden dokuların ısınmasını engellemek için, oluşan buz karışımı iki saat buz banyosunda bekletildi.
- 5- Örnekler 2°C'de homojenize edildi ve homojenatlar 3000 g. de 10 dk. santrifüj edildi.
- 6- Süpernatant alınarak sediment 0,2 N perklorik asit ile (ilk ekstraksiyonda kullanılan asit volümünün 1/3'ü ile) ekstrakte edildi.
- 7- Tekrar santrifüj yapılarak her iki süpernatant karıştırıldı ve 2N KOH ile pH 6.0-6.5 arasına nötrale edildi.
- 8- Tekrar 1 saat buz banyosunda bekletildi ve çöken KClO₄ santrifüjle uzaklaştırıldı (55).

3.6.2. Spektrofotometrik Ölçüm

Süpernatantda ATP düzeyi, Adenosine-5'-triphosphate, Sigma Diagnostics kiti ile tayin edildi ve sonuçlar aşağıdaki yöntemle hesaplandı:

$$\frac{\Delta A \times V_A \times V_E}{\epsilon \times d \times V_p} = \mu\text{mol ATP/total ekstrat}$$

$$\Delta A = A_1 - A_2$$

V_A = küvetteki test karışımının volümü

V_E = ekstraktın total volümü

V_p = küvete eklenen ekstrakt volümü

ε = ekstinksiyon koefisient (6,22 cm²/μ mol)

d = küvet kalınlığı

3.7. ERİTROSİT MEMBRANLARINDA YAPILAN ANALİZLER

3.7.1. Eritrosit Membranlarının Elde Edilmesi

Plazması alınan eritrositler üzerine 5 hacim %0,9'luk NaCl eklenerek eritrositler yıkandı. 2 ml eritrosit üzerine buz soğukluğunda hemoliz çözeltisinden 18 ml hızla

konuldu. Tüp içeriği karıştırıldıktan sonra 12000 g'de, 4-7°C'de, 7 dakika santrifüj edildi. Süpernatant, hemoglobinden ayrılmış "ghost"ları (eritrosit membranı) çekmemeye dikkat ederek yavaşça alındı. Kümeleşmiş membran 30-60 saniye vorteksle karıştırıldıktan sonra, üzerlerine yeniden aynı miktar hemoliz solüsyonu konuldu. Bu işlem, ghostlar tamamen renksiz olarak elde edilinceye kadar tekrarlandı. Son santrifüjden sonra tüpün dibinde kalan renksiz ghostlar, hacminin 3 katı kadar hemoliz çözeltisi ile süspansiyonlaştırılarak başka bir tüpe aktarıldı ve analiz yapılıncaya kadar -70°C'de saklandı (56).

3.7.2. Membran Protein İçeriğinin Belirlenmesi

0,1ml ghost süspansiyonu üzerine 0,9ml distile su eklendikten sonra, 5 ml taze alkali bakır sülfat çözeltisi konularak 10 dakika oda sıcaklığında bırakıldı. 0,5ml Folin reaktifi eklendi, tüp karıştırılıp oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra 750 nm'de, aynı işlemler uygulanmış distile suya karşı okundu. Stok standart olarak 100mg/dl protein standartı kullanıldı ve sonuçlar protein standart grafiğinden değerlendirildi.

3.7.3. Eritrosit Membranı Lipid Ekstraksiyonu

4-6mg membran proteini total hacim 2ml olacak şekilde 1mM KHCO₃ içinde süspansiyone edildi. CHCl₃-CH₃OH (2:1) (V/V) ile, 2 saat süreyle, buz banyosunda, kapaklı tüplerde ekstraksiyon yapıldı. Çözünmeyen materyal filtre kağıdından filtre edilerek ayrıldı. Filtrat hacminin 0,2 katı 0,1 M CaCl₂ ile ekstrakte edildi. Üst faz atıldı, alt faz tetraer filtre edildi. Çözgenler 40°C'deki su banyosunda. N₂ gazı altında uçuruldu. Elde edilen lipid kalıntısı hemen 0,3ml kloroformda çözüldü, kolesterol ve fosfolipid analizi için kullanıldı.

3.7.4. Membran Fosfolipid Düzeylerinin Belirlenmesi

0,1 ml lipid ekstraktı üzerine 0,5 ml, %70'lik perklorik asit ve 0,2 ml, %30'luk H₂O₂ eklendi. Tüpler, 180-200°C'de, 15 dakika bekletilerek oksitlenme aşaması sağlandı. Tüpler oda sıcaklığına soğutulduktan sonra vanadat-molibdat çözeltilerinden 1'er ml eklendi. 10 dakika sonra 405 nm'de köre karşı okundu. Standart çalışma için aynı koşullarda 20 µg/ml'lik fosfolipid standartı çalışıldı.

3.7.5. Membran Kolesterol Düzeylerinin Belirlenmesi

Kolesterol tayininde Liebermann-Burchard yöntemi kullanıldı. 0,1 ml lipid ekstraktı 2,5 ml kolesterol renk reaktifi içinde 10 dakika bekletildikten sonra 0,5 ml %98'lik H₂SO₄ eklendi. 20 dakika sonra 578 nm'de distile suya karşı okundu. Standart çalışma için aynı koşullarda 200 mg/dl'lik kolesterol standartı çalışıldı.

3.8. İstatistiksel Analiz

Her bir parametrenin gruplar arası istatistiksel farklılığını belirlemek için Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Ayrıca kontrol ve deney grubunda Sperman korelasyon analizleri yapılmıştır.

SONUÇLAR

Daha önce de belirtildiği gibi bu çalışmada, ratlardan bir kontrol grubu (n=6) ve simvastatin verilen bir deney grubu (n=12) oluşturulmuştur.

Elde edilen kontrol grubu bulguları Tablo 4.1., 4.2. ve 4.3.'de görülmektedir. İlaç verilen deney grubunun sonuçları ise Tablo 4.4., 4.5. ve 4.6.'da gösterilmiştir.

Tüm sonuçların ortalama değerleri ve istatistiksel anlamları Tablo 4.7.'de görülmektedir.

Plazma kolesterolü ve eritrosit membran lipid kompozisyonu arasındaki korelasyonlar Tablo 4.8.'de görülmektedir.

rat no:	kan ATP	kas ATP	kalp ATP	KC.ATP	beyinATP
1	49.8	0.62	0.28	0.08	0.08
2	49.0	0.65	0.33	0.07	0.08
3	52.6	0.77	0.25	0.08	0.14
4	52.8	0.91	0.34	0.10	0.09
5	42.9	0.80	0.33	0.06	0.09
6	49.2	0.66	0.25	0.07	0.08
ortalama	49.3	0.73	0.30	0.08	0.09
ortanca	52.7	0.71	0.30	0.08	0.09
SE	1.47	0.05	0.02	0.00	0.01
birim	µmol/dl	µmol/g	µmol/g	µmol/g	µmol/g

Tablo 4.1. Kontrol grubuna ait kan ve çeşitli dokularda ATP konsantrasyonları, ortalama \pm SE (standart error) değerleri

rat no:	kolesterol	TG	AST	CK	LDH
1	64	79	80	395	519
2	67	80	83	1439	335
3	62	115	198	442	971
4	68	92	95	342	610
5	81	88	162	312	733
6	60	107	162	1370	770
ortalama	67	94	130	717	656
ortanca	66	90	128	418	671
SE	3.1	6	21	218	90
birim	mg/dl	mg/dl	U/L	U/L	U/L

Tablo 4.2. Kontrol grubuna ait çeşitli parametrelerin plazma konsantrasyonları ve ortalama \pm SE değerleri

rat no:	kolesterol	fosfolipid	kolesterol/fosfolipid
1	0.04	2.05	0.02
2	0.08	0.41	0.02
3	0.05	1.78	0.03
4	0.03	1.90	0.02
5	0.04	2.06	0.02
6	0.02	0.44	0.05
ortalama	0.05	1.44	0.03
ortanca	0.05	1.84	0.02
SE	0.01	0.32	0.01
birim	$\mu\text{mol/mg pr.}$	$\mu\text{mol/mg pr.}$	$\mu\text{mol/mg pr.}$

Tablo 4.3. Kontrol grubuna ait eritrosit membranı kolesterol ve fosfolipid konsantrasyonları, ortalama \pm SE değerleri

rat no:	kan ATP	kas ATP	kalp ATP	KC. ATP	beyinATP
1	25.2	1.00	0.39	0.08	0.14
2	25.8	0.98	0.43	0.07	0.10
3	23.9	1.08	0.42	0.10	0.05
4	24.8	0.63	0.14	0.04	0.03
5	24.9	0.97	0.62	0.07	0.08
6	25.4	1.05	0.48	0.07	0.09
7	25.9	0.98	0.37	0.12	0.09
8	24.5	0.74	0.24	0.07	0.07
9	25.2	0.72	0.26	0.09	0.07
10	25.9	0.77	0.41	0.08	0.08
11	25.3	0.76	0.35	0.07	0.18
12	23.9	0.98	0.43	0.07	0.18
ortalama	25.0	0.89	0.38	0.08	0.10
ortanca	25.2	0.98	0.40	0.07	0.09
SE	0.2	0.04	0.04	0.01	0.01
birim	$\mu\text{mol/dl}$	$\mu\text{mol/g}$	$\mu\text{mol/g}$	$\mu\text{mol/g}$	$\mu\text{mol/g}$

Tablo 4.4. Deney grubuna ait kan ve çeşitli dokularda ATP konsantrasyonları, ortalama \pm SE değerleri

rat no:	kolesterol	TG	AST	CK	LDH
1	43	60	144	1725	1969
2	44	59	188	394	1079
3	46	32	95	261	516
4	43	78	83	668	532
5	40	56	244	1101	1020
6	40	58	152	446	1032
7	44	69	89	626	788
8	48	47	210	499	1962
9	49	45	178	833	1000
10	43	38	191	966	1050
11	51	73	133	709	1187
12	42	50	236	1482	1624
ortalama	44	55	162	809	1147
ortanca	44	57	183	688	1041
SE	1	4	16	128	139
birim	mg/dl	mg/dl	U/L	U/L	U/L

Tablo 4.5. Deney grubuna ait çeşitli parametrelerin plazma konsantrasyonları, ortalama \pm SE değerleri

rat no:	kolesterol	fosfolipid	kolesterol/fosfolipid
1	0.02	3.90	0.01
2	0.02	2.39	0.01
3	0.02	2.91	0.01
4	0.02	2.19	0.01
5	0.02	3.56	0.01
6	0.02	4.47	0.01
7	0.03	2.42	< 0.01
8	0.03	0.84	0.04
ortalama	0.02	2.83	0.01
ortanca	0.02	2.65	0.01
SE	0.00	0.40	0.00
birim	$\mu\text{mol/mg pr.}$	$\mu\text{mol/mg pr.}$	$\mu\text{mol/mg pr.}$

Tablo 4.6. Deney grubuna ait eritrosit membranı kolesterol ve fosfolipid konsantrasyonları, ortalama \pm SE değerleri

	<i>birim</i>	<i>kontrol grubu</i>	<i>deney grubu</i>	<i>p<...</i>
kan ATP	µmol/dl	49.4±1.5	25.1±0.2	0.01
kas ATP	µmol/g	0.73±0.05	0.89±0.04	—
kalp ATP	µmol/g	0.3±0.02	0.38±0.04	—
KC. ATP	µmol/g	0.08±0.00	0.08±0.01	—
beyin ATP	µmol/g	0.09±0.01	0.1±0.01	—
kolesterol	mg/dl	67±3.06	44±1.0	0.01
TG	mg/dl	94±5.97	55±4.0	0.01
AST	U/L	130±21	161±16	—
CK*	U/L	418±218	688±128	—
LDH	U/L	656±90	1146±138	0.05
er.memb.kolesterol	µmol/mg pr.	0.1±0.01	0.02±0.0	0.01
er.memb.fosfolipid*	µmol/mg pr.	1.84±0.32	2.65±0.4	0.01
er.memb.kol/fos.	µmol/mg pr.	0.05±0.03	0.01±0.0	0.01

Tablo 4.7. Kontrol grubu ve deney grubuna ait tüm parametrelerin ortalama ± SE değerleri, farklılıklarının istatistiksel anlamları (p<...) (CK ve eritrosit membran fosfolipidi için bimodal dağılım nedeniyle ortanca değerler verilmiştir.)

<i>Grup</i>	<i>Parametreler</i>	<i>r =</i>	<i>p<...</i>
deney grubu	plazma kolesterol - eritrosit membran kolesterol	0.720	< 0.05
deney grubu	plazma kolesterol - eritrosit membran fosfolipid	-0.649	< 0.05
deney grubu	plazma kolesterol - er. memb. kol./er. memb. fos.	0.851	< 0.05
kontrol grubu	plazma CK - er. memb. fosfolipid	998	< 0.05

Tablo 4.8. Plazma kolesterolü, eritrosit membranı lipid kompozisyonu ve plazma CK aktivitesi arasındaki korrelasyonlar

Tablo 4.7.'de özetlenen istatistiksel analizlere bakıldığında:

- HMG CoA redüktaz inhibitörleri verilen deney grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında kan ATP konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede düştüğü gözlenmiştir (p<0.01).
- Kas, karaciğer, kalp ve beyin dokularındaki ATP konsantrasyonları için deney grubu ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.
- Simvastatin verilen grupta plazma kolesterol ve trigliserid konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düştüğü görülmektedir (p<0.01).
- Plazma enzim düzeylerine bakıldığında, deney grubu ile kontrol grubu arasında CK ve AST düzeylerinde anlamlı bir değişiklik bulunmazken, LDH konsantrasyonları belirgin olarak yüksek bulunmuştur (p<0.05).

- Deney grubu ve kontrol grubunun eritrosit membranı lipid komponentleri karşılaştırıldığında membran kolesterolünün düştüğü ($p<0.01$), membran fosfolipid konsantrasyonunun arttığı ($p<0.01$) ve sonuç olarak membran kolesterol / fosfolipid oranının düştüğü ($p<0.01$) gözlenmiştir.

Deney grubu içinde korelasyon analizleri yapıldığında:

- Plazma kolesterolü ile eritrosit membran kolesterolü ve kolesterol / fosfolipid oranı arasında pozitif korelasyon (sırasıyla $r = 0.720$, $r = 0.851$) gözlenmiştir.
- Plazma kolesterolü ile eritrosit membranı fosfolipid konsantrasyonu arasında ise negatif korelasyon ($r = -0.649$) bulunmuştur.

Kontrol grubu içinde korrelasyon analizi yapıldığında;

- Plazma CK konsantrasyonu ile eritrosit membran fosfolipidi arasında kuvvetli negatif korrelasyon ($r=-0.998$, $p<0.05$) saptanmıştır.

Ayrıca ratların genel durumu izlendiğinde:

- Deney grubundaki ratların 2 tanesinde kilo kaybı ve dorsal alopesi görülmüştür.
- Deney grubundaki tüm ratlarda simvastatin tedavisinin 21. gününden sonra aşırı hareket ve saldırganlık gözlenmiştir.

TARTIŞMA

Yüksek kolesterol düzeyleri ile kardiyak mortalite riski arasındaki ilişki uzun yıllardır bilinmektedir. NCEP koroner arter hastalığı riskinin azaltılması için total ve LDL kolesterol düzeylerinin düşürülmesini önermektedir. Bu amaçla ABD'de erişkinlerin %7'si HMG CoA redüktaz inhibitörlerini kullanmaktadır. Ancak 1970'lerde düşük kolesterol düzeylerinin birçok istenmeyen sonuçları olduğu, nonkardiyovasküler nedenlere, özellikle kansere bağlı mortalitede artışa yol açtığı bildirilmiş ve bu ilişkinin doğruluğunu ve nedenlerini araştıran çalışmalar yapılmıştır (35, 57).

Bu çalışmalarda 2 sorunun cevabı bulunmaya çalışılmıştır:

1. Çok düşük kolesterollü kişilerde nonkardiyovasküler mortalite artmakta mıdır, yoksa düşük kolesterol düzeyleri nonkardiyovasküler mortalitenin nedeni değil sadece bir korrelatı mıdır?
2. İleri sürülen nonkardiyovasküler mortalitedeki artış kolesterolün başka nedenlerle düşüklüğüne mi yoksa kolesterol düşürmek için kullanılan ilaçların beklenmeyen etkilerine mi bağlıdır?

Biz kolesterol düşürücü tedavi olarak insanlarda en sık kullanılan HMG CoA redüktaz inhibitörlerini ratlara bir ay boyunca oral gavajla vererek serum kolesterolü üzerindeki amaçlanan etkisine ek olarak olası yan etkilerini inceledik. İlaç verdiğimiz ratların plazma kolesterol ve TG düzeylerinde bekleneceği gibi kontrollere göre anlamlı derecede düşme gözlemlendi ($p < 0.001$).

Simvastatin alan ratlarda plazma kolesterolündeki düşmeye paralel olarak eritrosit membranı kolesterol içeriğinde düşme bulduk. Ayrıca bu etilerine ek olarak simvastatin alımı ratlarda eritrosit membranı fosfolipid içeriğinde artışa yol açtı. Kolesterol biyosentezinin simvastatin tarafından inhibisyonunun hem plazma kolesterolünde hem de hücre membranlarının kolesterol içeriğinde düşmelere yol açması beklenen bir durumdur. Eritrosit membranı fosfolipid içeriğinin artması ise muhtemelen membran kolesterolündeki düşmeye sekonderdir. Hücre membranlarının lipid kompozisyonundaki %100'ü aşan bu değişmelerin (tablo 4.7) fonksiyonel sonuçlarının olmaması uzak bir olasılıktır. Membranlarda kolesterol/fosfolipid oranındaki düşmenin akışkanlıkta artışa yol açtığı bilinmektedir. Maymun beyinde sinaptik membranların kolesterol ve fosfolipid içeriklerinin değiştirilmesi ile akışkanlıkta %10'luk bir değişikliğin bile serotonin reseptörüne bağlanmasını ve hücrelere alınımını etkilediği gösterilmiştir (46). Bazı araştırmacılar serum kolesterolündeki azalmaya bağlı olarak beyin hücrelerinde membran kolesterolünün azaldığını, lipid mikrovizkozitesinin düşerek beyin hücrelerine serotonin girişinin azaldığını ve bu nedenle düşük kolesterolün depresyon yaratıcı etkisi olabileceğini öne sürmüşlerdir (40, 42, 45, 47). Obes kadınlarda eritrosit membranı fosfolipid kompozisyonundaki değişimin insülin resistansına yol açtığı duyurulmuştur (58). Başka bir çalışmada simvastatin verilen ratlarda kas hücreleri içine klor iletiminin azaldığı, potasyum iletiminin ise arttığı bulunmuştur (54). Bu değişikliklerin doza bağımlı olduğu ve siklosporin-A gibi HMG CoA redüktaz inhibitörlerinin atılımını yavaşlatan ilaçların birlikte kullanımıyla arttığı bildirilmiştir. Rat iskelet kası hücre kültürlerinde simvastatin 1-5 $\mu\text{mol/L}$ konsantrasyonlarda hücre

hasarı, 25 µmol/L'de ise hücre ölümü yaratmıştır (59). İnsanlarda beş aylık simvastatin tedavisi sonunda eritrositlerde membran açıl zincir dağılımının değiştiği duyurulmuştur (60).

Toplumda düşük plazma kolesterolü ile nonkardiyovasküler nedenlerden ölüm sıklığı arasında varlığı duyurulan pozitif korrelasyonun bir neden-sonuç ilişkisini yansıtmadığı henüz açık değildir. Örneğin sigara içenler ve alkol kullananlarda kaza ve intihar sonucu ölümün daha sık görüldüğü bildirilmiştir (44). Bu şekilde ölen kişilerde sıklıkla düşük plazma kolesterolü de bulunmuştur. Ancak kolesterol düşüklüğü ile belirtilen nedenlere bağlı ölümler arasında doğrudan bir ilişki bulunmamış, ölüme yol açan nedenin asıl kolesterol düşüklüğü değil, sigara içimi ve alkol kullanımı olduğu belirtilmiştir (44). Koroner damar hastaları arasında yapılan bir çalışmada plazma kolesterolü 160 mg/dl'nin altında olan 595 kişi, 160 mg/dl'nin üzerinde olan 10.968 kişi ile karşılaştırılarak 3.3 yıl izlenmişler, düşük kolesterollü grupta nonkardiyovasküler nedenlerden ölüm sıklığı iki kattan fazla artmış bulunmuştur (61). Bu nonkardiyovasküler ölüm nedenleri içinde kanser (%41) ve karaciğer hastalığının (%18) başta gelmesi bu grubun sigara ve alkol kullanımının daha sık olabileceğini, kolesterol düşüklüğünün belki de bu durumdan kaynaklanan beslenme farklılıkları ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim plazma kolesterolü düşük olan 7735 kişi ile yapılan başka bir çalışmada nonkardiyovasküler ölümlerin ağırlıklı olarak sigara ve alkol kullanımı ile bağlantılı olduğu, kolesterol düşüklüğünün ancak bir gösterge olabileceği belirtilmiştir (37). Ancak bizim çalışmamızda ve yukarıda anılan çalışmalarda da görüldüğü gibi simvastatin hücre membran kompozisyonunu belirgin biçimde değiştirmektedir. Bu değişikliklerin fonksiyonel sonuçları ve ilacı kullanan hastalardaki olası istenmeyen etkileri başka çalışmalarla belirlenmelidir.

Bu çalışmadaki beklenmedik bir bulgu kontrol grubu ratlarda eritrosit membranı fosfolipid içeriği ile plazma CK aktivitesi arasında gözlediğimiz çok kuvvetli invers korrelasyondur (tablo 4.8, $r=-0.998$, $p<0.05$). Bilgilerimize göre böyle bir ilişki daha önce duyurulmamıştır. Plazma CK aktivitesi büyük oranda kas hücreleri hasarını yansıtmaktadır. Eritrosit membranı lipid kompozisyonu kas hücre membranlarınıninkine ile korrelasyon gösteriyor ise belki de membran fosfolipid içeriğindeki düşüklük kas hücrelerinden ekstrasellüler sıvı ve kan plazmasına CK kaçıışı ve kas hücre hasarı ile birlikte görülmektedir. Bu yönden ilginç bir bulgu Duchenne Müsküler Distrofili hasta ve genetik taşıyıcılarda eritrosit morfolojisinin membran fosfolipid kompozisyon değişikliği ile ilişkili tipik bir morfoloji (echinocyte) gösterme sıklığının artması ve bunun taşıyıcıların tanısında kullanılabileceğinin duyurulmuş olmasıdır (62). Kontrol grubu ratlarda eritrosit membranı fosfolipid içeriği ile plazma CK aktivitesi arasında kuvvetli bir invers korrelasyon bulurken deney grubu ratlarda bunun görünmemesi yine simvastatin alımının membran lipid kompozisyonunu ve fonksiyonlarını etkilemesi ile uyumlu olarak yorumlanabilir. Eritrosit membranı fosfolipid içeriği ile plazma CK aktivitesi arasındaki ilişkinin insanlarda da araştırılması yararlı olacaktır.

Biz çalışmamızda, birçok yayınlarda belirtilen statin kullanımına bağlı oluşan ubikinon düzeyindeki düşüşün ubikinonun mitokondriyal elektron transport zincirindeki rolü nedeniyle ATP düşüşüne de yol açıp açmadığını araştırmak istedik. Bu amaçla simvastatin verdiğimiz ratların beyin, kas, kalp, karaciğer dokularında ve kanda ATP düzeylerini çalıştık. Kan ATP düzeylerinde kontrollere göre istatistiksel

olarak anlamlı bir düşme gözlenirken ($p < 0.01$) doku ATP düzeylerinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı. Ne var ki deney ve kontrol grubu ratların dokularında ölçtüğümüz ATP konsantrasyonları hem bu hayvanların kanlarında bulduklarımızdan (tablo 4.1 ve 4.4), hem de başkalarınca normal rat dokuları için duyurulmuş olanlardan (53) çok daha düşük bulundu. Ölçümler için yeni alınmış taze kan örneklerini kullanırken dokuları -70°C 'de sakladıktan (yaklaşık iki hafta) sonra kullanmış olmamız belki de bu işlemler ve sürede ATP moleküllerinin parçalanıp kaybına yol açmış olabilir. Ayrıca kanda eritrosit ve lokosit sayımları yapmamış olmamız nedeniyle bu çalışmanın sonuçlarından hücre ve dokulardaki ATP konsantrasyonları hakkında doğrudan karar vermek mümkün değildir. Ancak simvastatin alan ratlarda total kandaki ATP konsantrasyonlarında görülen anlamlı düşme ilacın en azından bazı dokularda ATP konsantrasyonunu azaltıcı etki gösterdiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda kontrol grubu ratlarda simvastatin alanlar arasında görülen diğer farklılıklar ilaç alan ratlarda gözlenen aşırı hareketlilik ve huysuzluk ile yine bu ratların serum LDH aktivitesindeki artıştır. Deney grubu ratlardaki aşırı hareketlilik ve huysuzluğun ilacın etkisi mi olduğu yoksa sadece gavaj işleminden hayvanların irrite olmalarından mı kaynaklandığı çalışmamızın sonuçlarından söylenemez, çünkü çalışmamız plasebo verilen bir grubu içermemektedir. Aynı nedenle deney grubunda görülen LDH yükselmesinin ilaca bağlı bir doku hasarını mı yoksa gavaj işleminin sonuçlarını mı yansıttığına karar vermek mevcut verilerle mümkün değildir.

HMG CoA redüktaz inhibitörlerinin zararlı olup olmadıklarının dışında maliyetleri de tartışılmaktadır. NCEP'ye göre LDL kolesterolü 160mg/dl 'nin üzerinde olan kişilerin tedavi edilmesi gerekmektedir (63). Bu da ABD'deki erişkinlerin %11'ini kapsar ve yıl başına maliyeti 5,2-11,1 milyar dolardır. Kolesterolün düşürülmesi yerine koroner arter hastalığı riskini azaltıcı başka tedavilerin uygulanması hem maliyeti azaltacak, hem de yan etkileri önleyecektir. Örneğin aspirin, riski %33 azaltırken, maliyeti 2\$/yıl, östrojen replasman tedavisi riski %35 azaltırken, maliyeti 135\$/yıldır. Antihipertansifler riski %4 azaltırken maliyeti sıfır sayılabilir çünkü hipertansiyonu olan hastaya zaten verilmektedir. Statinler ise KAH riskini %30 azaltırlar ve maliyeti 600\$/yıl'dır.

Son yıllarda kolesterol sentezinin daha ileri bir basamakta inhibe edilmesi için çalışmalar yapılmaktadır. Kolesterol ve ubiquinon sentez yolunun dallanma noktasının altında etkili bir enzim olan squalen sentazı inhibe eden, ve squalenstatin adı verilen ilaçların geliştirilmesi nonsterol izoprenoid sentezini koruyarak statinlerin neden olduğu yan etkileri önleyebilecektir.

Bu çalışmada elde edilen ve yukarıda tartışılan başka veriler HMG CoA redüktaz inhibitörlerinin hücre membran lipid kompozisyonunu değiştirdiklerini göstermektedir. Bu veriler membran fonksiyonlarında değişmelere ve hücrelerde ATP oluşumunda muhtemel bir düşmeye de işaret etmektedir.

ÖZET

Yüksek kolesterol konsantrasyonları ile kardiyak mortalite riski arasındaki pozitif korelasyon nedeniyle kolesterol düzeylerinin düşürülmesi için çok çeşitli tedaviler uygulanmaktadır. Bu tedavilerden en sık kullanılanı HMG CoA redüktaz inhibitörleridir. HMG CoA redüktaz inhibitörleri ile tedavi sırasında kanser, depresyon, intihar gibi çeşitli nonkardiyovasküler nedenlere bağlı mortalitenin arttığı bildirilmiştir. HMG CoA redüktaz inhibitörleri, HMG CoA redüktaz enzimini kompetitif olarak inhibe ederek mevalonat sentezini azaltırlar. Mevalonat diğer bazı izopren bileşiklerinin de prekürsörüdür ve HMG CoA redüktaz inhibitörleri ile tedavi sırasında serum ubikinon düzeylerinin düştüğü birçok çalışmada gösterilmiştir. Ubikinonun elektron transport zincirindeki rolü nedeniyle, bu ilaçlarla tedavi sırasında ATP oluşumunun etkilenip etkilenmediği açıklık kazanmamıştır.

Biz çalışmamızda ratlara 4 hafta boyunca simvastatin vererek kanda ve çeşitli dokulardaki ATP konsantrasyonlarına etkilerini araştırdık. Ayrıca kolesterolün, sadece strüktürel olmakla kalmayıp fonksiyonel rolü de olan membran yapısındaki önemi nedeniyle, eritrosit membranının lipid kompozisyonundaki değişiklikleri inceledik.

Ratlarda simvastatin kullanımı ile plazma kolesterol ve trigliserid konsantrasyonlarında anlamlı bir düşme gözlemlendi ($p < 0.01$). Kan ATP konsantrasyonları kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu. Analiz yapılan plazma enzimlerinden sadece LDH'da anlamlı derecede artış saptandı ($p < 0.05$). Eritrosit membran komponentlerinde ise kolesterolün düştüğü (< 0.01), fosfolipid düzeyinin arttığı ($p < 0.01$) ve kolesterol / fosfolipid oranının düştüğü gözlemlendi ($p < 0.01$). Orandaki düşüşle plazma kolesterol konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon saptandı ($r = 0.851$).

Bu çalışmada halen klinikte kullanılmakta olan bir HMG CoA redüktaz inhibitörü olan simvastatinin hücre membran lipid kompozisyonunu ve muhtemelen membran fonksiyonları ile ATP jenerasyonunu etkilediğine ilişkin bulgular elde edildi. Ratlardaki bu bulgular ilacı kullanan hastalardaki olası yan etkilerin değerlendirilme çalışmalarında yol gösterici olabilir.

KAYNAKLAR

1. Hulley SB., Walsh JMB., Newman TB. et al: Health policy on blood cholesterol time to change directions. *Circulation* 1986;86:1026-1029
2. Law M.: Commentary: having too much evidence (depression, suicide, and low serum cholesterol) *BMJ* 1996;313:651-2
3. G F Watts et al: Plasma coenzyme Q (Ubiquinone) concentrations in patients treated with simvastatin. *J Clin Pathol* 1993;46:1055-1057
4. Lipid Biosynthesis In: *Principles of Biochemistry*, second edition. Ch 20. Eds: Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Worth Publishers 1993
5. Joseph L. Goldstein & Michael S. Brown : Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990;343:425-430
6. Copper GM: The Chemistry of Cells. In: *The Cell, A Molecular Approach*, Ch 2. ASM press Washington, D.C. 1997
7. Beyer RE., Nordenbrand K., Ernster L. et al: The function of Coenzyme Q in free radical production and as an antioxidant: a review. *Chemica Scripta* 1987;27:145-153
8. Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation. In: *Principles of Biochemistry*, second edition, Ch 20. Eds: Lehninger AI, Nelson DI and Cox MM. Worth Publishers 1993
9. Copper GM: Bioenergetics and Metabolism. In: *The Cell, A Molecular Approach*, Ch 2. ASM press Washington, D.C. 1997
10. American College of Physicians: Clinical guideline, part 1. *Ann Intern Med* 1996;124:515-517
11. Michael H. Criqui: Very low cholesterol and cholesterol lowering. *Circulation* 1995;90:2591
12. Jialal I. : A practical approach to the laboratory diagnosis of dyslipidemia. *Am J Clin Pathol* 1996;106:128-138
13. LaRosa JC., Hunninghake D., Bush D. et al: The cholesterol facts. *Circulation* 1990;81:1721-1731
14. Assmann G., Shulte H: Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1992;70:733-737

15. Manninen V, Tenkanen L., Koskinen P. et al: Joint effects of serum triglyceride and LDL cholesterol and HDL cholesterol concentrations on coronary heart disease risk in the Helsinki Heart Study. *Circulation* 1992;85:37-45
16. Kreisberg AR.: Low high-density lipoprotein cholesterol: what does it mean, what can we do about it, and what should we do about it? *Am J Med* 1993;94:1-6
17. Antonio M. Gotto: Lipid lowering, regression, and coronary events. *Circulation* 1995;92:646-656
18. Antonio M. Gotto: Overview of current issues in management of dyslipidemia. *Am J Cardiol* 1993;71:3B-8B
19. Larsen ML, Illingworth DR: Drug treatment of dyslipoproteinemia. *Med Clin NA* 1994;78:225-246
20. Conrad B. Blum: Comparison of properties of four inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Am J Cardiol* 1994;73:3D-11D
21. Witztum JL: Drugs used in the treatment of hyperlipoproteinemias. In: Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Ninth Edition. Ch 36. Eds: Hardman JG, Limbird LE. McGraw-Hill, New York 1996
22. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group: Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994;344:1383-1389
23. Anderson TJ., Meredith IA., Yeung AG. et al: The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N Engl J Med* 1995;332:488-493
24. O'Driscoll G., Green D., Taylor RR. et al: Simvastatin, an HMG-Coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month. *Circulation* 1997;95:1126-1131
25. Treasure CB., Klein JL., Weintraub WS. et al: Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1995;332:481-487
26. Andrews TC., Raby K., Barry J. et al: Effect of cholesterol reduction on myocardial ischemia in patients with coronary disease. *Circulation* 1997;95:324-328
27. Corsini A., Raiteri M., Soma MR. et al: Simvastatin but not pravastatin has a direct inhibitory effect on rat and human myocyte proliferation. *Clin Biochem* 1992;25:399-400
28. Ziad AM. et al: Inhibition of the mevalonate pathway: benefits beyond cholesterol reduction? *Lancet* 1996;347:102-103

29. Klausen IC., Gerdes LV., Meinertz H. et al: Apolipoprotein (a) polymorphism predicts the increase of Lp(a) by pravastatin in patients with familial hypercholesterolemia treated with bile acid sequestration. *Eur J Clin Invest* 1993;23(4):240-245
30. Thompson GR., Maher VMG., Matthews S. et al: Familial hypercholesterolemia regression study: a randomised trial of low-density-lipoprotein apheresis. *Lancet* 1995;345:811-816
31. Nabel GN.: Gene therapy for cardiovascular disease. *Circulation* 1995;91:541-548
32. Grossman M., Raper SE., Kozarsky K. et al: Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolemia. *Nature Genetics* 1994;6:335-341
33. Smithies O., Maeda N. : Gene targeting approaches to complex genetic diseases: atherosclerosis and essential hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5266-5272
34. Dalen JE., Dalton WS.: Does lowering cholesterol cause cancer? *JAMA* 1996;275(1):67-69
35. Smith GD.: Low blood cholesterol and non-atherosclerotic disease mortality: where do we stand? *Eur Heart J* 1997;18:6-9
36. Smith GD., Shipley J., Marmot MG. et al: Plasma cholesterol concentration and mortality. *JAMA* 1992;267:70-76
37. Wannamethee G., Shaper AG., Whincup PH. et al: Low serum total cholesterol concentrations and mortality in middle aged British men. *BMJ* 1995;311:409-413
38. Newmann TB., Hulley SB.: Carcinogenicity of lipid-lowering drugs. *JAMA* 1996;275:55-60
39. Herrinton LJ. et al: Serum cholesterol concentration and risk of brain cancer. *BMJ* 1995;310:367-368
40. Morgan RE., Palinkas LA., Barret-Connor EL.: Plasma cholesterol and depressive symptoms in older men. *Lancet* 1993;341:75-79
41. Ploekinger B., Dantendorfer K., Vlm M. et al: Rapid decrease of serum cholesterol concentration and postpartum depression. *BMJ* 1996;313:664
42. Zureik M. et al: Serum cholesterol concentration and death from suicide in men: Paris prospective study I. *BMJ* 1996;313:649-651
43. Gallerani M., Manfredini R., Caraccido J. et al: Serum cholesterol concentrations in parasuicide. *BMJ* 1995;310:1632-1636

44. Vartianen E., Puska P., Pekkanen J. et al: Serum cholesterol concentration and mortality from accidents, suicide, and other violent causes. *BMJ* 1994;309:445-7
45. Dursun SM., Burke JG., Areveley M. et al: Low serum cholesterol and depression. *BMJ* 1994;309:273-274
46. Engelberg H.: Low serum cholesterol and suicide. *Lancet* 1992;339:727-729
47. Steegmans PHA., Fekkes D., Hoes AW. et al: Low serum cholesterol concentration and serotonin metabolism in men. *BMJ* 1996;312:221
48. Asberg M, Traskman L, Thoren P. 5-HIAA in the cerebrospinal fluid. A biochemical suicide predictor? *Arch Gen Psychiatry* 1976;33:1193-1197
49. Kaplan JR. et al: The effects of fat and cholesterol on social behavior on monkeys. *Psychosom Med* 1991;53:634-642
50. Manoukian AA., Bhagavan NV., Hayashi T. et al: Rhabdomyolysis secondary to lovastatin therapy. *Clin Chem* 1990;36(12):2145-2147
51. Rosenberg AD., Neuwirth MG., Kagen LJ. et al: Intraoperative rhabdomyolysis in a patient receiving pravastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A (HMG CoA) reductase inhibitor. *Anesth Analg* 1995;81:1089-91
52. Laaksonen R., Jokelainen K., Sahi T. et al: Decreases in serum ubiquinone concentrations do not result in reduced levels in muscle tissue during short-term simvastatin treatment in humans. *Pharmacol Ther* 1995;57:62-6
53. Laaksonen R., Jokelainen K., Laakso J. et al: The effect of simvastatin treatment on natural antioxidants in low-density lipoproteins and high-energy phosphates and ubiquinone in skeletal muscle. *Am J Cardiol* 1996;77:851-54
54. Pierno S. et al: Potential risk of myopathy by HMG-CoA reductase inhibitors: a comparison of pravastatin and simvastatin effects on membrane electrical properties of rat skeletal muscle fibers. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;275:1490-1496
55. Adam H.: Adenosine-5'-triphosphate determination with phosphoglycerate kinase. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd ed. New York: Academic Press, 1974:2127-31
56. Kuralay F., Tanyalçın T., Kutay F. et al: Erythrocyte membrane Na⁺, K⁺ ATP ase activity can be a marker of liver histopathology. *Biochem Mol Bio Int* 1996;40(4):769-777
57. Gaziano JM., Hebert PR., Hennekens CH.: Cholesterol reduction: weighing the benefits and risks. *Ann Intern Med*. 1996;124:914-918

58. Candiloros H., Zeghari N., Ziegler O. et al: Hyperinsulinemia is related to erythrocyte phospholipid composition and membrane fluidity changes in obese nondiabetic women. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:2912-18
59. Veerkamp JH., Smit JWA., Benders AAGM. et al: Effects of HMG CoA reductase inhibitors on growth and differentiation of cultured rat skeletal muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1996;1315:217-22
60. Dwight JF., Mendes-Ribeiro AU., Hendry BM.: Effects of HMG-CoA reductase inhibition on erythrocyte membrane cholesterol and acyl chain composition. *Clin-Chim-Acta* 1996;256(1):53-63
61. Behar S., Graff E., Reicher-Reiss H. et al: Low total cholesterol is associated with high total mortality in patients with coronary heart disease. *Eur Heart J* 1997; 18:52-59
62. Tangorra A, Curatola G, Milani-Comparetti M: Echinogenic action of L-alpha-lysophosphatidylcholine in Duchenne muscular dystrophy: a study on carrier detection. *Am J Med Genet* 1989;32:540-544
63. Avins AL., Browner WS.: Lowering risk without lowering cholesterol: implications for national cholesterol policy. *Ann Intern Med* 1996;125:502-6