

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

**HMG CoA REDÜKTAZ İNHİBİTÖRLERİNİN  
PLAZMA UBİKİNON, ATP DÜZEYİ VE  
TOTAL ANTİOKSİDAN KAPASİTE  
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**DR. EMEL ALTEKİN**  
UZMANLIK TEZİ

**PROF.DR. BANU ÖNVURAL**  
TEZ YÖNETİCİSİ

İNCİRALTI - İZMİR  
1999

**88977**

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DÜZENLEMELER VE İZLENLER MERKEZİ

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TABLO LİSTESİ	I
ŞEKİL LİSTESİ	II
KISALTMALAR	III

## BİRİNCİ BÖLÜM

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
------------------	---

## İKİNCİ BÖLÜM

2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. KOLESTEROL SENTEZİ	2
2.2. KOLESTEROL SENTEZİNİN DÜZENLENMESİ	7
2.2.1. HMG CoA Redüktaz Aracılı Düzenleme	7
2.2.1.1. Transkripsiyonun Sterol Aracılı Düzenlenmesi	7
2.2.1.2. Hormonal Düzenleme	7
2.2.1.3. İlaçlar Tarafından İnhibisyon	7
2.2.1.4. Sirkadian Ritim	8
2.2.1.5. Oksisterol Aracılı Düzenleme	8
2.2.2. Sterol Regülatör Element (SRE)-1	8
2.3. KOLESTEROLÜN METABOLİK ÖNEMİ	8
2.3.1. Hücre Membranları ve Kolesterol	9
2.4. HİPERKOLESTEROLEMİ VE ATEROSKLEROZ	10
2.5. KOLESTEROL DÜŞÜRÜCÜ TEDAVİ	11
2.5.1. HMG CoA REDÜKTAZ İNHİBİTÖRLERİ (STATİNLER)	13
2.6. STATİNLERİN MEVALONAT OLUŞUMUNA ETKİLERİ	16
2.7. UBIKİNON	18
2.7.1. Ubikinon Sentezi	20
2.7.2. Ubikinon Regülasyonu	20
2.8. UBIKİNONUN MİTOKONDRİDE ENERJİ ÜRETİMİNDEKİ ROLÜ	23
2.8.1. Kompleks I	24
2.8.2. Kompleks II	25

2.8.3. Kompleks III	25
2.8.4. Kompleks IV	26
2.8.5. Kompleks V	26
2.8.5.1. Kemiosmotik Hipotez	27
2.9. UBİKİNONUN PROOKSİDAN VE ANTIOKSİDAN ROLÜ	28
2.9.1. Serbest Radikal Kavramı	28
2.9.2. Reaktif Oksijen Türlerinin ve Diğer Serbest Radikallerin Oluşmasına Yol Açan Kaynaklar	28
2.9.3. Serbest Radikal Kaynağı Olarak Mitokondrial Elektron Transport Zinciri	30
2.9.4. Serbest Radikallerin Hedefleri	30
2.9.5. Antioksidan Defans Sistemi	33
2.9.6. Ubikinonun Prooksidan Rolü	35
2.9.7. Ubikinonun Antioksidan Rolü	35
2.10. UBİKİNONUN KLİNİK ÖNEMİ	38
2.11. HMG CoA REDÜKTAZ İNHİBİTÖRLERİNİN KAS DOKUSUNA ETKİLERİ	40
2.12. HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)	41

## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	48
3.1. CİHAZLAR	48
3.2. KİMYASAL MADDELER	49
3.3. TİCARİ KİTLER	49
3.4. OLGULARIN SEÇİMİ VE ÖRNEKLERİN TOPLANMASI	50
3.5. PLAZMA UBİKİNON ANALİZİ	50
3.6. KAN ATP ANALİZİ	53
3.7. DİĞER PLAZMA ANALİZLERİ	53
3.7.1. Total Antioksidan Kapasite Ölçüm Yöntemi	53
3.7.2. Trigliserid Ölçüm Yöntemi	54
3.7.3. Kolesterol Ölçüm Yöntemi	54

3.7.4. HDL Kolesterol Ölçüm Yöntemi	55
3.7.5. LDL Kolesterol Ölçüm Yöntemi	55
3.7.6. CK Ölçüm Yöntemi	55
3.7.7. Myoglobin Ölçüm Yöntemi	55
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	56

## **DÖRDÜNCÜ BÖLÜM**

4. BULGULAR	57
-------------	----

## **BEŞİNCİ BÖLÜM**

5. TARTIŞMA VE SONUÇ	69
KAYNAKLAR	76

**TABLO LİSTESİ**

- Tablo 1: NCEP'in erişkinde yapılmasını önerdiği markırlar ve tercih edilen değerleri**
- Tablo 2: Reaktif oksijen türlerinin ve diğer radikallerin oluşmasına yol açan kaynaklar**
- Tablo 3: Serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri**
- Tablo 4: Antioksidanların hücresel yerleşimlerine göre sınıflandırılması**
- Tablo 5: Kontrol grubunun sonuçları**
- Tablo 6: Tedavi ncesi grubun sonuçları**
- Tablo 7: Tedavi sonrası grubun sonuçları**
- Tablo 8: Kontrol ve tedavi gruplarının plazma kolesterol değerlerinin karşılaştırılması**
- Tablo 9: Kontrol ve tedavi gruplarının plazma HDL kolesterol değerlerinin karşılaştırılması**
- Tablo 10: Kontrol ve tedavi gruplarının plazma LDL kolesterol değerlerinin karşılaştırılması**
- Tablo 11: Kontrol ve tedavi gruplarının plazma ubikinon değerlerinin karşılaştırılması**
- Tablo 12: Kontrol ve tedavi gruplarının plazma trigliserid değerlerinin karşılaştırılması**
- Tablo 13: Kontrol ve tedavi gruplarının kan ATP değerlerinin karşılaştırılması**
- Tablo 14: Kontrol ve tedavi gruplarının plazma total antioksidan kapasite değerlerinin karşılaştırılması**
- Tablo 15: Tedavi ncesi ve tedavi sonrası gruplarda plazma CK değerlerinin karşılaştırılması**
- Tablo 16: Tedavi ncesi ve tedavi sonrası gruplarda myoglobin değerlerinin karşılaştırılması**

**ŞEKİL LİSTESİ**

- Şekil 1: Kolesterolün yapısı
- Şekil 2: Mevalonat oluşumu
- Şekil 3: İzopren ünitelerinin oluşumu
- Şekil 4: Kolesterol biyosentez yolu
- Şekil 5: HMG CoA redüktaz inhibitörlerinin etki basamağı
- Şekil 6: Doğal ve sentetik statinler
- Şekil 7: Kolesterol sentezinin ara ürünleri
- Şekil 8: Ubikinonun yapısı
- Şekil 9: Elektron transport zincirinin şematik yapısı
- Şekil 10: Ubikinonun yapısı
- Şekil 11: Ubikinon biyosentez yolu
- Şekil 12: Elektronların ubikinona aktarılış yolu
- Şekil 13: “Q siklusu”
- Şekil 14: Elektrokimyasal potansiyel farkıyla ATP sentezinin şematik görüntüsü
- Şekil 15: Lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonları
- Şekil 16: Ubikinolün lipid radikalleri ile reaksiyonu
- Şekil 17: Plazma ubikinon analizinde kalibrasyon eğrisi örneği
- Şekil 18: HPLC cihazının şematik görüntüsü
- Şekil 19-20: Plazma ubikinon analizinde HPLC kromatogram örnekleri.
- Şekil 21: “Box-Plot” grafik örneği
- Şekil 22: Kontrol ve tedavi gruplarında plazma kolesterol düzeyleri
- Şekil 23: Kontrol ve tedavi gruplarında plazma HDL kolesterol düzeyleri
- Şekil 24: Kontrol ve tedavi gruplarında plazma LDL kolesterol düzeyleri
- Şekil 25: Kontrol ve tedavi gruplarında plazma ubikinon düzeyleri
- Şekil 26: Kontrol ve tedavi gruplarında plazma trigliserid düzeyleri
- Şekil 27: Kontrol ve tedavi gruplarında kan ATP düzeyleri
- Şekil 28: Kontrol ve tedavi gruplarında plazma total antioksidan kapasite düzeyleri
- Şekil 29: Tedavi öncesi ve tedavi sonrası grupların CK düzeyleri
- Şekil 30: Tedavi öncesi ve tedavi sonrası grupların myoglobin düzeyleri

**KISALTMALAR**

**ADP:** Adenozin difosfat

**ATP:** Adenozin trifosfat

**CK:** Kreatin kinaz

**DNA:** Deoksiribonükleik asid

**ETF:** Elektron transfer eden protein

**FAD:** Flavin adenin dinükleotid

**FMN:** Flavin mononükleotid

**FPP:** Farnezil pirofosfat

**GPP:** Geranil pirofosfat

**HDL:** High density lipoprotein (Yüksek dansiteli lipoprotein)

**HPLC:** High-performance liquid chromatography (Yüksek performanslı sıvı kromatografi)

**IPP:** İzopentenil pirofosfat

**LDL:** Low density lipoprotein (Düşük dansiteli lipoprotein)

**NAD:** Nikotinamid adenin dinükleotid

**NCEP:** National Cholesterol Education Program

**SRE-I:** Sterol Regulator Element

**UQ:** Ubikinon

**UQH<sub>2</sub>:** Ubikinol

**UQH:** Semikinon

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimin her aşamasında destek ve yardımlarını esirgemeyen, yetişmemde büyük katkıları olan Anabilim Dalı Başkanımız ve danışman hocam Sayın Prof.Dr. Banu Önvural'a,

Klinik Biyokimya Bilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Dr. Meral Fadıoğlu'na,

Tez çalışmam sırasında bilgi ve tecrübelerinden yararlanma olanağı bulduğum Sayın Doç.Dr. Canan Çoker'e,

Bölümümüz tüm öğretim üye ve görevlilerine,

Tez çalışmamı yürütebilmem için gerekli hastaların teminindeki yardımlarından ötürü Kardiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr. Sema Güneri'ye,

Fikir, öneri ve yardımlarıyla bana her zaman olumlu katkıları olan öğretim görevlisi Sayın Dr. Sezer Çalışkan'a,

Çalışmamın analiz aşamasında, bana ayırdığı zaman ve yardımlarından dolayı Sayın Memduh Bülbül'e,

İhtisas süresince birlikte bulunduğumuz tüm bölümümüz çalışanlarına,

Projeyi destekleyen araştırma fon saymanlığı yetkililerine,

Ayrıca bana verdikleri çalışma desteğinden dolayı aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Emel Altekin



## ÖZET

HMG CoA redüktaz inhibitörleri (statinler) yüksek kolesterol tedavisinde yaygın kullanıma sahip ilaç grubudur. Bu ilaçlar kolesterol sentezinde hız kısıtlayıcı basamak olan HMG CoA'nın mevalonata dönüşüm basamağını inhibe ederler. Mevalonat aynı zamanda Ubikinon, dolikol gibi izopren bileşiklerin de prekürsörüdür. Ubikinon, elektron transport zincirindeki yeri nedeniyle ATP sentezinde rol alırken aynı zamanda antioksidan özelliği nedeniyle serbest radikal hasarına karşı hücre savunmasında yer alır.

HMG CoA redüktaz inhibitörlerinin bir yandan mevalonat sentezini baskılayarak kolesterol sentezini azaltırken, diğer yandan hücre fonksiyonları için önemli serum ubikinon düzeylerini de düşürdüğü bir çok çalışmada bildirilmiştir (19,70). Ayrıca statinlerin kullanım dozlarında, kasla ilgili bazı yan etkilerin ortaya çıktığı ileri sürülmüştür (42,58).

Bizim çalışmamızda 40-65 yaşları arasındaki 17 yüksek kolesterolü sağlıklı kişinin simvastatin ile kolesterol düşürücü tedaviye başlanmadan önceki trigliserid, kolesterol, HDL kolesterol, LDL kolesterol, ubikinon değerleri, ayrıca kan ATP ve total antioksidan kapasite düzeyleri, iki ay süre ile günde 20 mg simvastatin kullanımını sonrası değerlerle ve kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Olabilecek muhtemel kas hasarını araştırmak amacıyla da tedavi öncesi ve sonrası grubun serum CK ve myoglobin değerleri kıyaslandı.

Simvastatin kullanımını ile iki aylık bir sürede trigliserid ( $p=0.0003$ ) ve kolesterol değerlerinde ( $p=0.0003$ ) olduğu gibi, ubikinon düzeylerinde de ( $p=0.0003$ ) tedavi öncesi gruba göre anlamlı düşme saptandı. Total antioksidan kapasite değerleri tedavi sonrası grupta düşerken ( $p=0.0086$ ) yapılan karşılaştırmalarda ATP değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenemedi. Ayrıca CK ( $p=0.0003$ ) ve myoglobin ( $p=0.0003$ ) değerlerinde ilaç kullanımını sonrasında anlamlı artış gözlemlendi.

HMG CoA redüktaz inhibitörlerinin 20 mg/gün kullanımını ile 2 aylık bir sürede serum ubikinon düzeyini düşürdüğü ve klinik olarak uzun süreli yan etkileri açısından incelenmesi gerektiğine ilişkin bulgular elde ettik.

## SUMMARY

HMG-CoA reductase inhibitors (statins) are widely used for lowering hypercholesterolemia. These drugs inhibit the conversion of HMG CoA to mevalonate, which is the rate limiting step in cholesterol synthesis. Mevalonate is also the precursor for isopren compounds like ubiquinone and dolichol. Being a member of electron transport chain, ubiquinone plays an important role in ATP synthesis and in its reduced form, it protects membranes against free radical damage with its antioxidant features.

In many studies it was reported that HMG-CoA reductase inhibitors, while decreasing the cholesterol synthesis by suppressing the mevalonate synthesis, also decreased the ubiquinone levels which is very important for cellular functions. In addition, at therapeutic doses, adverse effects of statins related with muscles were also reported.

In this study plasma triglyceride, cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, ubiquinone levels, total antioxidant status, and whole blood ATP concentrations were determined in 17 patients (age range: 40 to 65 years) with high cholesterol levels, before and after the patients had received simvastatin (20mg/day) for 2 months and compared with each other and also the control group's values. To evaluate the possible muscle damage, plasma CK activity and myoglobin concentrations were compared before and after the therapy.

There was a significant decrease in plasma triglyceride ( $p=0.0003$ ), cholesterol ( $p=0.0003$ ) and ubiquinone ( $p=0.0003$ ) levels after two months of simvastatin therapy, while total antioxidant capacity decreased in the therapy group ( $p=0.0086$ ). There wasn't a statistically significant difference for whole blood ATP levels. Significant increases were noted for plasma CK activity ( $p=0.0003$ ) and myoglobin concentrations ( $p=0.0003$ ) after therapy.

In this study we found that HMG-CoA reductase inhibitors decreased the plasma ubiquinone levels with 2 months of 20 mg/day simvastatin therapy and its long term side effects needs to be evaluated clinically.

## GİRİŞ VE AMAÇ

Hiperkolesteroleminin koroner kalp hastalığı oluşumunda en önemli risk faktörlerinden biri olduğu bilinmektedir (60). Son zamanlarda bir yandan etkin şekilde kolesterol düşürücü ilaçlar kullanıma sunulurken, diğer yandan kolesterol düşürücü tedavinin kardiyovasküler sebeplere bağlı ölümleri azaltmakla beraber, total mortaliteyi azaltmadığını gösteren prospektif çalışma sonuçları yayınlanmaktadır (9,65).

HMG CoA redüktaz inhibitörleri (statinler) yaygın kullanılan güçlü kolesterol düşürücü ajanlardır. Kompetitif olarak HMG CoA redüktazı inhibe ederler. Bu ilaçlar HMG CoA redüktaz enziminin inhibisyonuyla mevalonat oluşumunu baskılayarak kolesterol sentezini yavaşlatırlar. Mevalonat kolesterolün olduğu gibi hücrel fonksiyonlar için önemli diğer izoprenoid bileşiklerin de prekürsörüdür (ubikinon, dolikol).

Yapılan çalışmalar, HMG CoA redüktaz inhibitörlerinin mevalonat sentezini baskılayarak plazma kolesterol düzeyini düşürürken diğer taraftan hücrel enerjinin sağlanması ve korunmasında önemli rolü olan ubikinon düzeylerindeki düşürdüğünü göstermektedir (70,19). Ubikinon aynı zamanda serbest radikal hasarına karşı hücrede antioksidan olarak görev alır. Bazı araştırmacılar, HMG CoA redüktaz inhibitörleriyle tedavi sırasında serum ubikinon düzeylerinin düşmesinin ubikinona bağlı fonksiyonlarda azalmaya yol açacağını ve sellüler hasarın meydana gelebileceğini öne sürmüşlerdir (42,50). Ayrıca bu ilaç grubunun kasa toksik etkilerinin olabileceği, statin kullanan bazı hastalarda CK yüksekliği, rabdomyoliz görülebileceği öne sürülmüştür (17).

Bu bilgileri değerlendirerek geniş kapsamlı bir çalışma planladık. Çalışmanın ilk aşamasında, kolesterol yüksekliği nedeniyle simvastatin başlanacak olan hastaların tedavi öncesindeki serum ubikinon düzeylerini, tedavi sonrası ve kontrol grubuyla karşılaştırmayı amaçladık. İkinci aşama olarak bu hastalarda olası ubikinon eksikliğinin kan ATP düzeyini, total antioksidan kapasiteyi etkileyebileceğini düşünerek ATP ve total antioksidan kapasite düzeylerini ayrıca bu ilaçların kasa toksik etkilerini araştırmak için CK ve myoglobin düzeylerini ilaç öncesi ve sonrası grupta çalışmayı planladık.

## İKİNCİ BÖLÜM

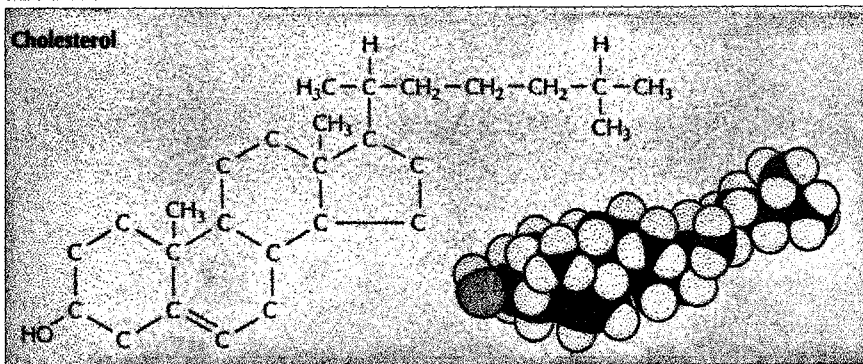
### 2. GENEL BİLGİLER

#### 2. 1. KOLESTEROL SENTEZİ

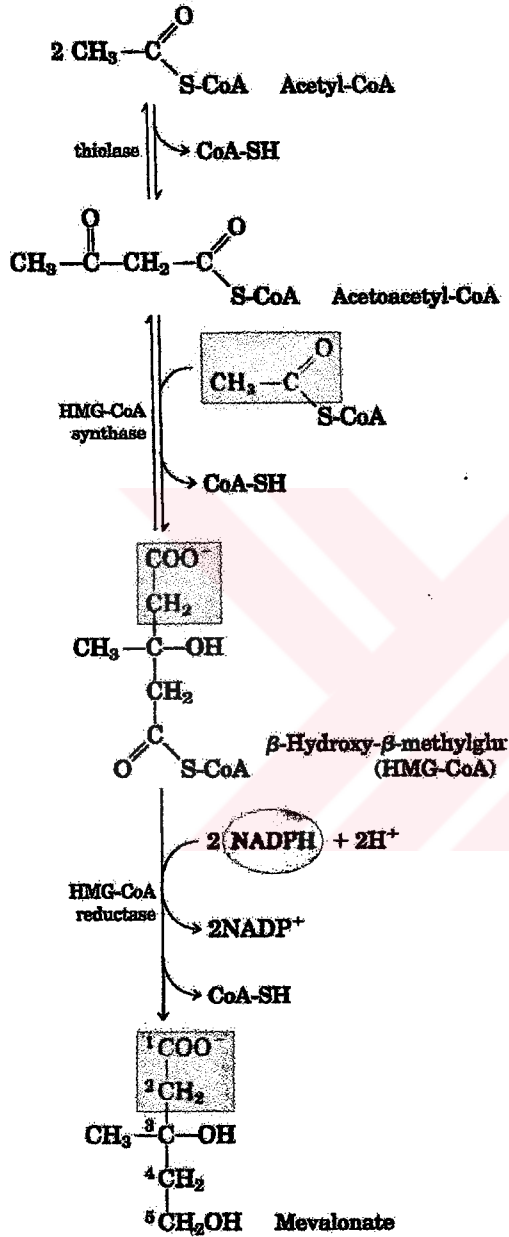
İnsanlarda serbest halde veya uzun zincirli yağ asitlerinden biri ile esterleşmiş olarak bulunan kolesterol, dört halka taşıyan steroid çekirdeği ile hidroksil ve metil gruplarından ve sekiz karbonlu dallanmış hidrokarbon zincirinden oluşmaktadır (Şekil 1).

Kolesterol yapısında 27 karbon atomu içermektedir ve bu karbon atomlarının tümü tek bir prekürsörden, asetattan gelir (40).

Vücut kolesterol miktarının yaklaşık yarısı endojen olarak sentez edilirken, kalan kolesterol diyetle alınmaktadır. Hücre membran yapısında önemli role sahip olan kolesterol sentezi birçok dokuda gerçekleşir. Karaciğer başta olmak üzere, adrenal korteks, testis, overler, barsak ve plasenta kolesterol sentezinin gerçekleştiği organlardır.



Şekil 1: Kolesterolün yapısı.

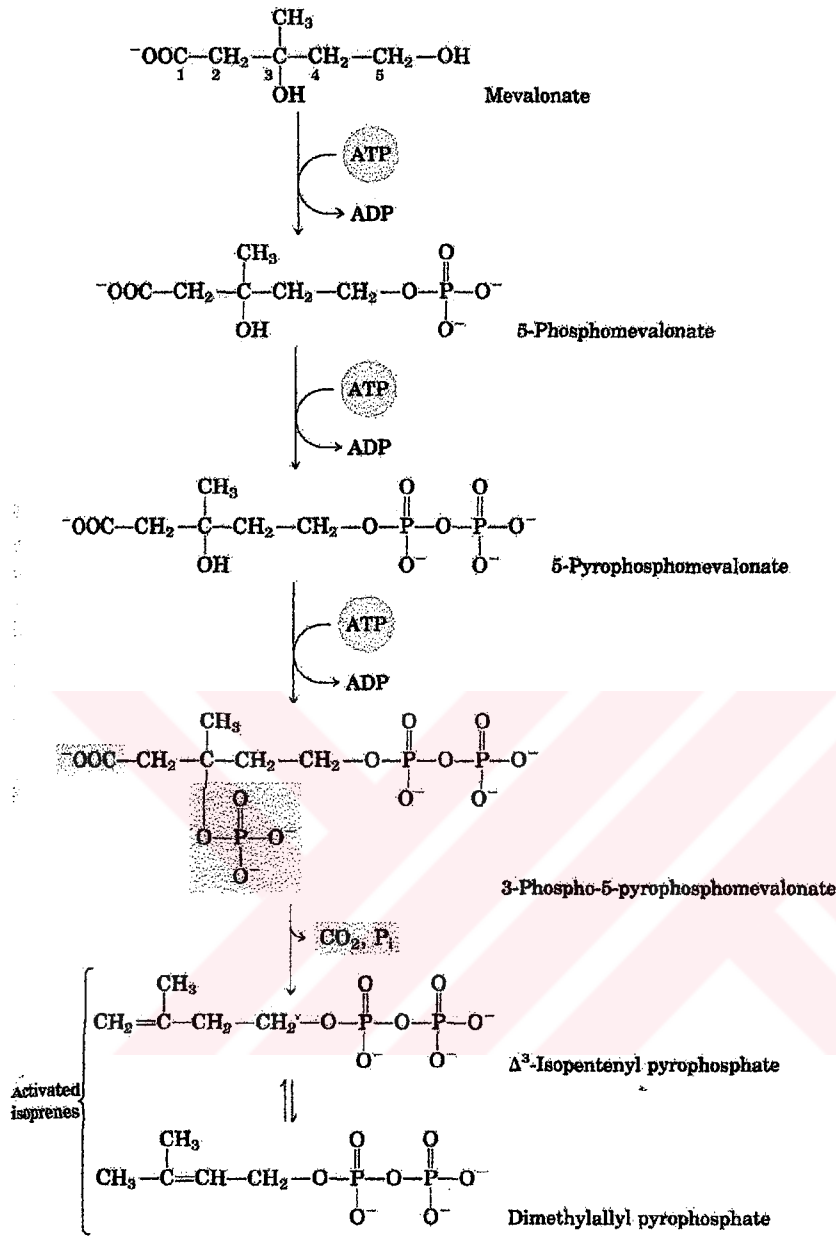


Şekil 2: Mevalonat oluşumu.

Kolesterol sentezi dört basamakla özetlenebilir (40).

### 1. Mevalonat sentezi

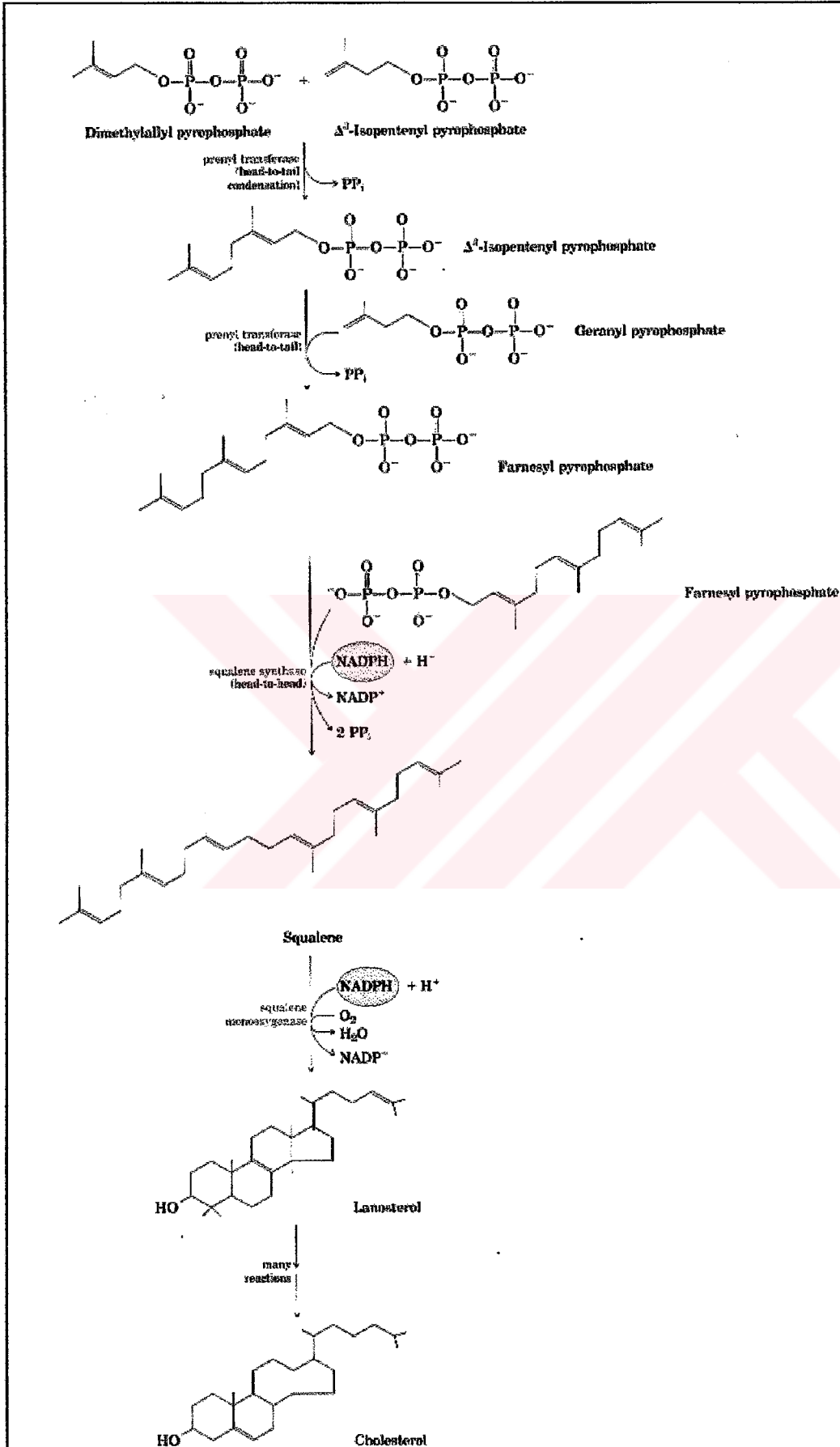
İzoprenoidlerin ve kolesterolün sentezindeki öncül madde asetil koenzim A molekülüdür. İki molekül asetil koenzim A sitozolik tiyolaz enziminin katalitik etkisi ile kondanse olarak asetoasetil koenzim A oluşturmaktadır. Asetoasetil koenzim A HMG-CoA sentaz enziminin katalizlediği bir tepkime ile diğer asetil koenzim A molekülü ile kondanse olarak 6 karbonlu β-hidroksi-β-metilglutaril-koenzimA(HMGCoA)'yı oluşturur. Daha sonra HMG CoA'nın HMG CoA redüktaz ile mevolanata redüksiyonu gerçekleşir (Şekil 2). Bu reaksiyonda elektron vericisi olarak NADPH kullanılır. HMG CoA redüktaz enzimi düz endoplazmik retikulumun bir integral membran proteindir. Bu basamak kolesterol sentezinin hız sınırlayıcı basamağıdır.



Şekil 3: İzopren ünitelerinin oluşumu.

## 2. İzopren Ünitelerinin Oluşumu

Mevalonik asit, her biri ATP'den bir fosfat transfer eden 3 basamakta 3-fosfo-5-pirofosfo mevolanata dönüştürülür. Beş karbonlu bir izopren birimi olan  $\Delta^3$  izopentenil pirofosfat (IPP), 3-fosfo-5-pirofosfomevolanatin dekarboksilasyonu ile oluşturulur. Reaksiyon için ATP gereklidir.  $\Delta^3$  IPP, ilk aktif izopren bileşiğidir. Bu yapının izomerizasyonu ile dimetilallil pirofosfat, ikinci aktif izopren oluşur (Şekil 3).



Şekil 4: Kolesterol sentezi



### 3. Skualen Oluşumu

İki aktif izopren grubunun baş-kuyruk (head-to-tail) kondenzasyonu ve bir pirofosfat grubunun ayrılmasıyla 10 karbonlu geranil pirofosfat meydana gelir (GPP). İkinci bir IPP molekülü daha sonra farnesil pirofosfatı (FPP) oluşturmak üzere GPP ile kondanse olur. İki molekül 15 karbonlu farnesil pirofosfat birleşir ve iki pirofosfat grubunun ayrılmasıyla 30 karbonlu bir bileşik olan skualen oluşur (Şekil 4).

### 4. Kolesterol Sentezi

Skualen moleküler oksijen ve NADPH kullanan bir dizi reaksiyonlar sonucu lanosterole dönüştürülür. Skualenin hidroksilasyonu yapının lanosterole halkalaşmasını başlatır. Lanosterolün kolesterole dönüşümü çok basamaklı bir işlemdir. Sonuçta 30 karbonlu zincir uzunluğu 27 karbona iner, 4. karbondaki iki metil grubu uzaklaştırılır, 8. karbondaki çift bağ 5. karbona göçer ve 24-25. karbonlar arasındaki çift bağ indirgenir (Şekil 4).



## **2.2. KOLESTEROL SENTEZİNİN DÜZENLENMESİ**

### **2.2.1.HMG CoA Redüktaz Aracılı Düzenlenme**

HMG CoA redüktaz endoplazmik redikulumun bir iç membran proteindir. Kolesterol sentezinde hız kısıtlayıcı bir enzim olarak farklı metabolik kontrol tiplerinin etkisine maruz kalır (20).

#### **2.2.1.1. Transkripsiyonun Sterol Aracılı Düzenlenmesi**

Lipoprotein metabolizması sırasında hücreler tarafından alınan kolesterol miktarı kolesterol sentezinin düzenlenmesinde rol oynar. Karaciğer hücreleri tarafından alınan şilomikron kalıntıları ve hem karaciğer hem de periferik dokuların hücreleri tarafından alınan LDL partikülleri HMG CoA redüktaz geninin transkripsiyonunun azalması ve denovo kolesterol sentezinde azalmayla sonuçlanır.

#### **2.2.1.2. Hormonal Düzenlenme**

HMG CoA redüktaz aktivitesi, enzim aktivasyon-inhibisyon kaskadı yoluyla çeşitli hormonlar tarafından kontrol edilir. Bu mekanizma HMG CoA redüktazın fosforilasyonu ve defosforilasyonu yoluyla sağlanır. Glukagon HMG CoA'nın inaktif formunun (fosforillenmiş) oluşumunu kolaylaştırarak kolesterol sentezinin hızını azaltırken, insülin ise aktif formun (fosforillenmemiş) oluşumunu kolaylaştırarak sonuçta kolesterol sentez hızını artırır.

#### **2.2.1.3. İlaçlar Tarafından İnhibisyon**

HMG CoA redüktaz inhibitörleri HMG CoA'nın kompetitif inhibitörleridir. Karaciğer kolesterol üretiminde azalmaya yol açarak LDL reseptörlerinde gen transkripsiyonuyla artışa yol açarlar. Böylelikle LDL'nin plazmadan uzaklaştırılması hızlandırılır.

#### 2.2.1.4. Sirkadian Ritim

Gün içinde kolesterol sentezi değişiklik gösterir. Kolesterol sentezindeki bu sirkadian ritim HMG CoA redüktazın diüurnal varyasyonu nedeniyledir. Hepatik HMG CoA redüktaz aktivitesi gece yarısı en yüksek düzeydeyken, öğlen en düşük seviyededir.

#### 2.2.1.5. Oksisterol Aracılı Düzenlenme

Kolesterolün oksitlenmiş türevleri olan 7-ketokolesterol, 24-hidroksikolesterol, 24,25-epoksikolesterol ve 25-hidroksikolesterol HMG CoA redüktazın kolesterolden daha güçlü inhibitörleridir. Bu etki, kolesterolün HMG CoA redüktaz üzerine olan negatif feedback etkisini hücre içinde bu türevlere dönüşerek gösterebileceği yolundaki çalışmaların artmasına neden olmuştur.

#### 2.2.2. Sterol Regulatör Element (SRE)-1

Hücre yüzeylerindeki LDL reseptörleri Apo B<sub>100</sub> ve Apo E'yi tanıyarak şilomikron kalıntıları ve LDL'leri bağlarlar. Artan hücre içi kolesterol transkripsiyonel mekanizma ile LDL reseptör üretimini durdurur. LDL reseptör geni 5' flanking (yan) bölgesinde lokalize küçük bir DNA segmentiyle kontrol edilir. Bu segment sterol regulatör element olarak adlandırılır. (SRE)-1 geni HMG CoA sentaz geninin ön tarafında yer alır. Hücre içi kolesterol içeriği azaldığında SRE-1 LDL reseptör gen transkripsiyonunu aktive ederek hücre içi LDL alımını artırır (20).

### 2.3. KOLESTEROLÜN METABOLİK ÖNEMİ

Kolesterol insandaki en yaygın steroldür ve vücutta bir grup işleve sahiptir. Vücudun belli başlı dokularına sürekli kolesterol sağlanması önemlidir (40). Özellikle beyin, sinir sistemi ve adrenalde yaygın olan kolesterol, vücudun bütün hücrelerinde bulunmaktadır. İnsanlarda adrenal kortekste, testiste, overlerde ve plasentada sentez edilen ve salgılanan steroid hormonların öncül bileşiği kolesteroldür. Adrenal kortekste glukokortikoidler,

mineralokortikoidler ve seks hormonları, testislerde testosteron, overlerde östrojenler ve progesteron sentez edilmektedir. Hamilelik sırasında plasentada progesteron sentezi yapılmaktadır. Bu hormonların sentezi kolesterolün D halkasının 17. karbonundaki yan zincirden çeşitli sayıda karbonların uzaklaşmasıyla mitokondride meydana gelir.

Kolesterolün lanosterolden sentez edilmesi sırasında ara ürün olan 7-dehidrokolesterol deride birikmektedir. ultraviyole ışık ile 7-dehidrokolesterolde elde edilen kolekalsiferol (D<sub>3</sub> vitamini) karaciğerde 25-hidrokolesalsiferole çevrilmektedir. Böbreğe taşınan bu bileşik daha aktif olan 1,25-dihidroksikolekalsiferole dönüşmektedir.

Safra asitleri karaciğerde çok basamaklı bir yolla kolesterolden sentez edilirler. Hidroksil gruplarının steroid yapı üzerine yerleşmesi, kolesterolün B halkasının çift bağının indirgenmesi ve hidrokarbon zincirinin üç karbon kısalması yer almaktadır.

### **2.3.1. Hücre Membranları ve Kolesterol**

Hücre aktivitelerinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan hücre membranı sadece hücre içini çevreden ayırmakla kalmaz, nükleus gibi sitoplazmik organelleri de çevreler. Biyolojik membranların temel yapısında proteinler ve polar lipidler ile birlikte az miktarda glikoprotein ve glikolipid şeklinde karbonhidratlar bulunmaktadır. Membran sistemleri yüklendikleri görevlere göre değişik oranlarda lipid ve protein içermektedirler. Membranların yapısında yer alan proteinlerin transport, reseptör, enerji iletimi ve enzim fonksiyonları gibi özel görevleri vardır. Lipid, ikili tabakaların arasında yer alan proteinlerin fonksiyonları için uygun bir ortam yaratmaktadır. Lipid ve protein molekülleri membran düzleminde hızla yayıldıkları için membranlar akıcı yapıya sahiptirler. Membran akışkanlığını membranların asıl yapı taşı olan fosfolipidler güçlü şekilde etkilemektedir, membran akışkanlığının sağlanmasında da fosfolipidlerin yapısında yer alan doymamış yağ asitlerinin etkisi bulunmaktadır. Bir fosfolipid molekülünün fosfat grubu taşıyan polar özellikteki baş kısmı suda kolayca çözünürken nonpolar özellikte olan kuyruk kısımları suda çözünmediği için membran iç kısmında yer almaktadır (8).

Kolesterol, membran akışkanlığının düzenlenmesinde önemli role sahiptir. Polar hidroksil gruplarıyla membranın içine giren kolesterolün hidrokarbon halkası yağ asidi zincirinin fosfolipid baş grubuyla komşu olan bölgesiyle etkileşir. Bu etkileşim yağ asit zincirinin o bölgesini rijit yapar ve mobilitesini azaltır. Kolesterol içeriği zengin membran yapıları bu nedenle daha kısıtlı hareket etmektedir.

Normal hücre fonksiyonları önemli ölçüde plazma membranlarının kolesterol içeriğine bağlıdır. İntegral membran proteinlerinin de membran kolesterol içeriğindeki değişikliğe duyarlı olduğu gösterilmiştir (52).

#### **2.4. HİPERKOLESTEROLEMİ VE ATEROSKLEROZ**

Hiperkolesteroleminin koroner kalp hastalığı oluşumunda en önemli risk faktörlerinden biri olduğu bilinmektedir (9,60). Yüksek kan kolesterol düzeylerinin kardiyovasküler hastalıklara bağlı mortaliteyi arttırdığı, değişik tedavi yöntemleri ile kan kolesterol düzeylerinin düşürülmesinin mortaliteyi azalttığı yapılan geniş kapsamlı prospektif ve epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir (37). Koroner kalp hastalığı ile plazma kolesterol düzeyi arasındaki bu doğrusal ilişki, LDL kolesterolün aterojenik etkisine bağlıdır.

Ateroskleroz, arterlerin intima ve media tabakalarının dejenerasyonuna neden olan lipid birikimi ve hücre proliferasyonunun görüldüğü kompleks bir olaydır. Ateroskerozu başlatıcı olay, endotel bariyerinin bozulmasıdır. LDL yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksitlenmesi toksik ve aterojenik bir ürün olan okside LDL'yi ortaya çıkarır (22). Oksitlenmiş LDL'nin makrofajlar ve düz kas hücrelerindeki çöpçü reseptörler tarafından alınmasıyla köpük hücreleri oluşmaktadır. Ayrıca oksitlenmiş LDL, hasarlanmış endotel üzerine trombositlerin yapışması ve kümelenmesini, düz kas hücrelerinin proliferasyonunu sağlayan bazı faktörlerin salgılanmasını uyarak ileri aterosklerotik lezyonların oluşumunda da etkili olmaktadır.

NCEP (National Cholesterol Education Program) kolesterol yüksekliği sebebiyle koroner kalp hastalığı riski taşıyan şahısların saptanması, değerlendirilmesi ve tedavi

edilmesi konusunda standart kriterleri belirlemeyi amaçlayan bir protokoldür. Bu protokole göre hastalar önce total kan kolesterol düzeylerine göre sınıflamaya tabi tutulmakta, risk grubuna girenlere lipoprotein analizi yapılarak bunun sonuçlarına göre tedavi planlanmaktadır (Tablo 1) (1,31).

**Tablo 1:** NCEP'in erişkinde yapılmasını önerdiği markırlar ve tercih edilen değerleri.

Parametre	Değerler
Total Kolesterol	≤200 mg/dl
LDL Kolesterol:	
Koroner Kalp Hastalığı Olmayan Grup:	
İkiden az risk faktörü taşıyanlar	≤160 mg/dl
İki ve daha fazla risk faktörü taşıyanlar	≤130 mg/dl
Koroner Kalp Hastaları	<100 mg/dl
HDL Kolesterol:	
Kadın	≥45 mg/dl
Erkek	≥35 mg/dl
Trigliserid	60-160 mg/dl
Total Kolesterol / HDL Kolesterol Oranı	≤5

## 2.5. KOLESTEROL DÜŞÜRÜCÜ TEDAVİ

Kan kolesterol düzeylerinin düşürülmesinin koroner kalp hastalığı riskini azaltması yanında periferik arterlerdeki ve koroner arterlerdeki mevcut aterosklerotik lezyonların gerilemesini de sağlayabileceği bugüne kadar yapılmış çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (22,66).

Tüm bu çalışmalar kan kolesterol düzeyinin düşürülmesinin koroner kalp hastalığı oluşumunu ve bu hastalığın sebep olduğu ölümleri azalttığını açık bir şekilde ortaya koyar. Bu çalışmaların sonuçları kolesterol düşürücü tedavinin koroner kalp hastalığı oluşumunu ve

hastalığa bağlı mortaliteyi azalttığını gösterdiği halde, total mortalitede (tüm nedenlere bağlı toplam mortalite) anlamlı bir azalma tesbit edilememiştir.

Bu çalışmalarda kolesterol düzeyinin düşürülmesi ile kardiyovasküler hastalıklara bağlı ölümlerin azalmasına rağmen tedavi edilen gruplarda kanser, kazalar ve intiharlar gibi sebeplere bağlı ölümlerin artması nedeniyle total mortalitede anlamlı azalma tesbit edilememektedir (9,65).

Bütün bu geniş kapsamlı çalışmalarda kolesterol düşürücü tedavinin yararlı olup olmadığı, kolesterol düşürücü tedavide kullanılan ajanların yan etkilerinin diğer ölüm sebeplerinde artmaya yol açabileceği konusunda tartışmalara yol açmıştır (18,29).

NCEP kolesterol düşürücü tedavinin diyet ve ilaç tedavisi olmak üzere 2 aşamada planlanmasını önermiştir. Diyet ve nonfarmakolojik önlemler (egzersiz, sigaranın bırakılması) lipid düzeyini düşürmede yetersiz kalırsa, ilaçla tedaviye başvurulur (23).

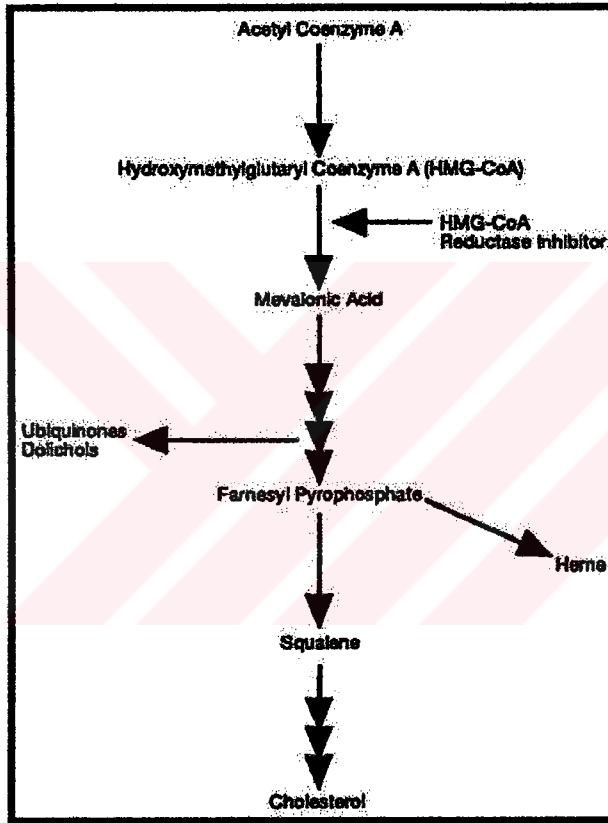
Lipid düşürücü ilaçlar başlıca 2 kategoriye ayrılır.

- A. Major ilaçlar:**
1. Safra asidi sekestranları
  2. Nikotik asit
  3. HMG CoA redüktaz inhibitörleri

- B. Minör ilaçlar:**
1. Fibratlar
  2. Probucol

### 2.5.1. HMG CoA REDÜKTAZ İNHİBİTÖRLERİ (STATİNLER)

Güçlü kolesterol düşürücü etkiye sahip olan HMG CoA redüktaz inhibitörleri kolesterol sentezinde hız kısıtlayıcı basamak olan HMG CoA'nın mevalonata dönüşüm basamağını katalizleyen HMG CoA redüktazın kompetitif inhibitörüdürler (Şekil 5). Esas olarak LDL reseptör aktivitesini artırarak etkili olurlar. İntrasellüler kolesterol depolarının azalması, LDL reseptörlerinin artmasına neden olur ve LDL'nin plazmadan uzaklaştırılışı hızlandırılır.



Şekil 5: HMG CoA redüktaz inhibitörlerinin etki basamağı.

#### Statinlerin Kimyasal Yapısı ve Metabolizmaları:

Statinler iki alt gruba ayrılarak sınıflandırılır (Şekil 6) (16).

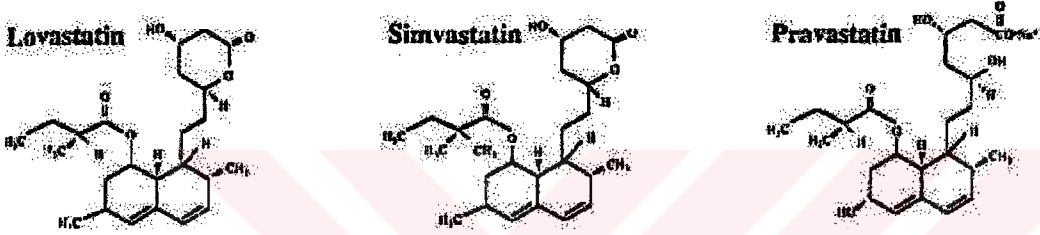
1. Fermentasyon deriveleri veya doğal statinler (lovastatin, simvastatin, pravastatin).
2. Sentetik statinler (fluvastatin, cerivastatin)



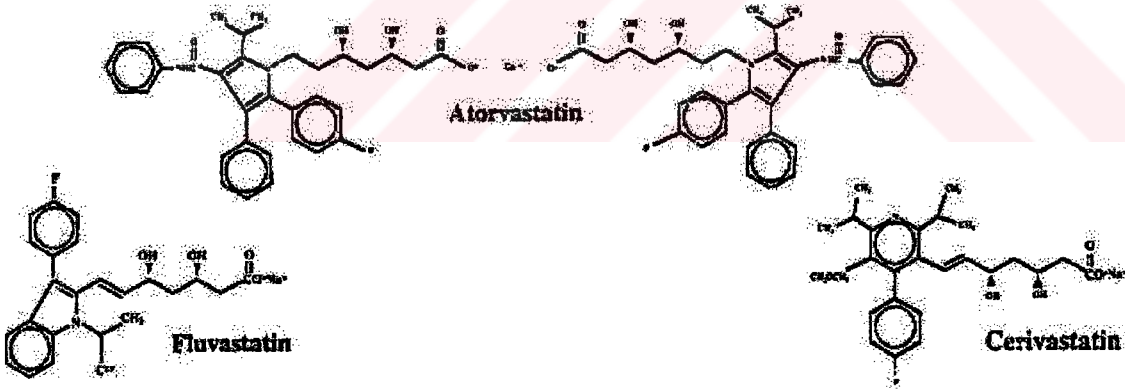
Doğal statinlerin kimyasal yapısı birbirine benzer. Lovastatin aspergillus terreusun bir ürünüdür, simvastatin ve pravastatin, lovastatinin kimyasal modifikasyonlarıyla üretilirler. Bu üç bileşik HMG CoA redüktazın CoA'yı tanıyan bölgesiyle etkileşen hidronaftalen halkası içerirler, ayrıca mevalonatu taklit eden hidroksi asit yan zincirleri vardır.

Sentetik statinlerin kimyasal yapıları birbirinden farklıdır. Fluvastatin, florofenil eklenmiş indol halkasının mevalonolaktan türevidir. Florofenil indol kısmı CoA'ya benzediği için HMG CoA redüktazı, yan zincir ise mevalonatu taklit eder (38).

### Doğal Statinler



### Sentetik Statinler



Şekil 6: Doğal ve sentetik statinlerin kimyasal yapısı.

Statinler karaciğerde metabolize edilir. Lovastatin, simvastatin, atorvastatin ve cerivastatin yaygın olan P-450 3A4 yoluyla metabolize edilirken, sitokrom P-450 2C9 fluvastatin metabolizmasından sorumlu olan enzimdir. Pravastatin metabolizmasından çok yönlü metabolik yollar sorumludur (16). Bu metabolik yollar aynı yollarla metabolize olan diğer ilaçlarla etkileşimde önemlidir.



Atarvastatin haricinde diğer tüm statinlerin plazma yarı ömrü 2-3 saattir. Atarvastatin yarı ömrü 14-20 saattir.

Pravastatin en hidrofilik, simvastatin en lipofilik statin grubudur. Statinlerin etki gösterme potansiyelleri ve biyoyararlanımları farklıdır. Doğal statinler ve atarvastatin uygun kullanım dozuyla LDL kolesterolde %33-35'lik bir azalmaya neden olurken fluvastatin ve cerivastatin daha az etkilidir. Scandinavian Simvastatin Survival Study'de 4444 hastada 5.4 yıl boyunca HMG CoA redüktaz inhibitörleri kullanmış, total kolesterolde %25, LDL kolesterolde %35 düşüş ve HDL kolesterolde %8 artış görülmüştür (60).

Yapılan bir çalışmayla atarvastatinin aynı zamanda güçlü trigliserid düşürücü etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (16).

HMG CoA redüktaz inhibitörlerinin güçlü kolesterol düşürücü etkileri nedeniyle koroner kalp hastalığı riskini ve koroner kalp hastalığına bağlı mortaliteyi azalttığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (11,24).

Statinlerin kolesterol düşürücü etkilerinden bağımsız olarak 4 farklı mekanizmayla yararlı olabileceği öne sürülmüştür. Endotelial fonksiyonun düzeltilmesi, inflamatuvar cevap supresyonu, plak stabilizasyonu ve trombus oluşumunun engellenmesiyle bu mekanizmalar gerçekleşir (59).

Bazı statinlerin makrofajlarda kolesterol akümülyasyonunu, düz kas hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, lipofilik olan statinlerin koagülasyon başlangıcında önemli olan doku faktör ekspresyonuna yol açtığı, doğal statinlerin trombosit agregasyonunda etkili olduğu gösterilmiştir.

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 (46).

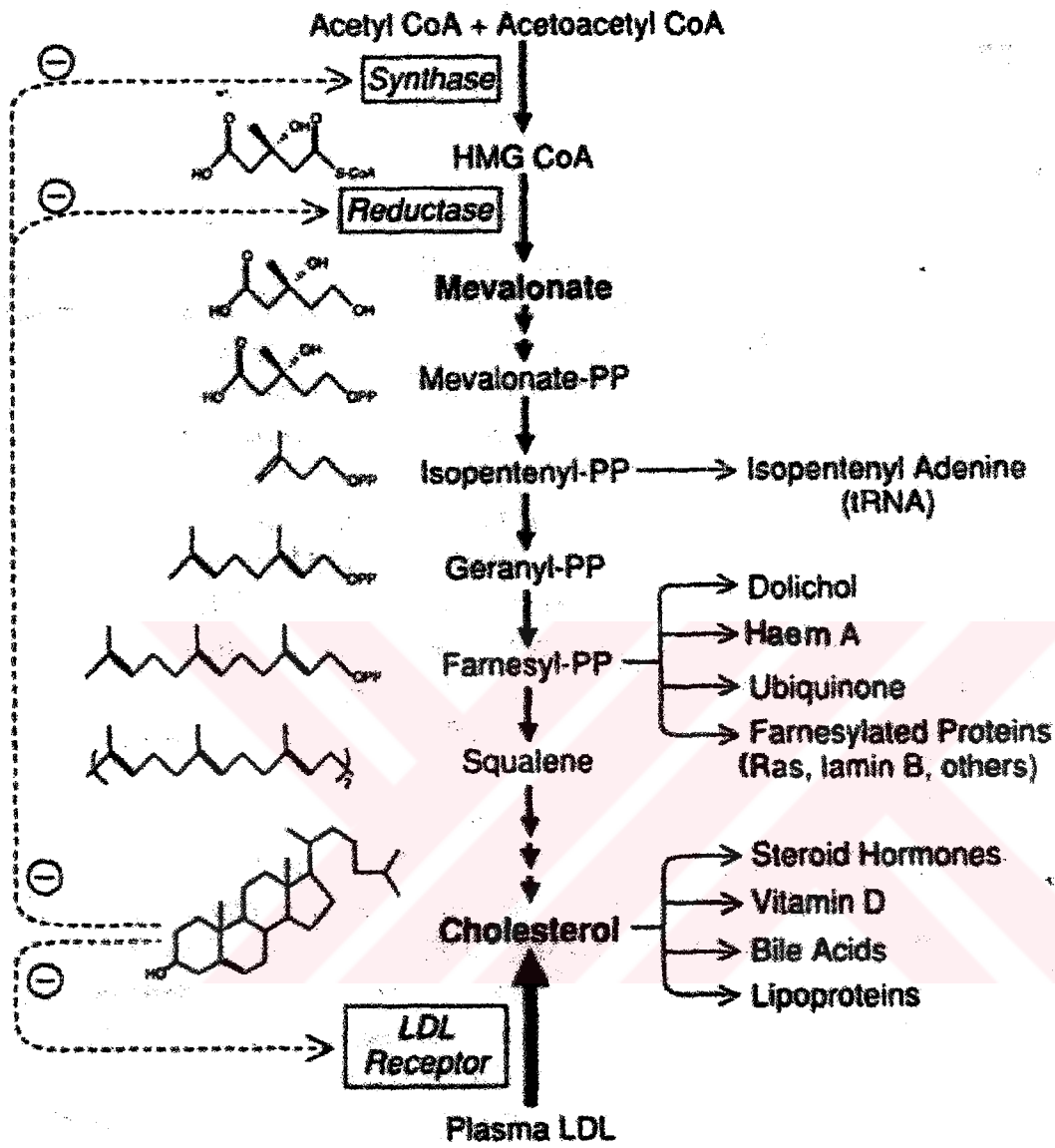
Bir başka çalışmada, pravastatinin myokardiyal infarktüs sonrası gelişen şok ve transient iskemik atak (TIA) gelişimini azalttığı ileri sürülmüştür (51).

## 2.6. STATİNLERİN MEVALONAT OLUŞUMUNA ETKİLERİ

Statinlerin kolesterol düşürülmesi ve koroner kalp hastalığı gelişiminin yavaşlatılması gibi çok önemli olumlu etkilerinin yanısıra, kolesterol sentezinden büyüme kontrolüne kadar geniş bir aralıkta çeşitli hücresel fonksiyonlar için hayati olan isoprenoidler dizisinin sentezinden sorumlu olan mevalonati baskılaması, bu grup ilaçların uzun süre kullanımı konusunda tartışmalar yaratmaktadır.

İsopentenil pirofosfat, mevalonattan sentezlenen değişik biyolojik görevleri olan bir çok molekülün aktif prekürsörüdür. Proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonunda (Ras proteinleri, nükleer laminler, G proteinleri) ve dolikol, ubikinon sentezinde substrat görevi gören farnezil ve geranil pirofosfat bu molekuler arasında yer alır. Sitokromların yapısında yer alan hem A'nın farnezil rezidüsünün prekürsörü de izopentenil pirofosfattır. Ayrıca A, E ve K vitaminleri, karoten, bir çok esansiyel yağlar izopentenil pirofosfat üzerinden sentez edilir. Dolikol glikoprotein sentezinde taşıyıcı rolüyle, ubikinon hücre enerji fonksiyonlarındaki düzenleyici rolüyle önem kazanmaktadır (Şekil 7).

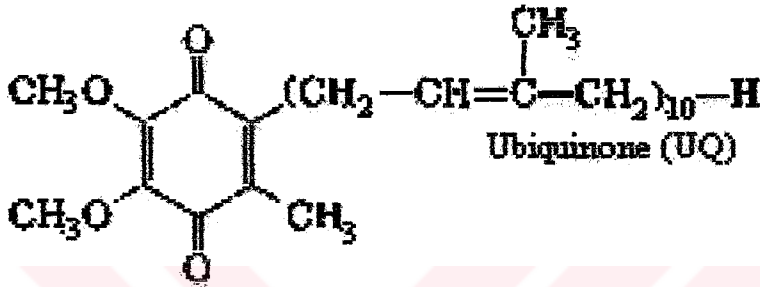
Watts ve ark. yüksek kolesterolü kişilerde simvastatin tedavisini düşük kolesterolü diyet kullanımı ve kontrol grubu ile karşılaştırmış, simvastatin kullanımı ile serum ubikinon düzeylerinde belirgin bir düşme göstermiş ve simvastatin dozu ile ubikinon düzeyi arasında ters korelasyon olduğunu belirtmişlerdir (70). Ubikinonun mitokondrial 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.



Şekil 7: Kolesterol sentezinin ara ürünleri.

## 2.7. UBİKİNON (KOENZİM Q<sub>10</sub>)

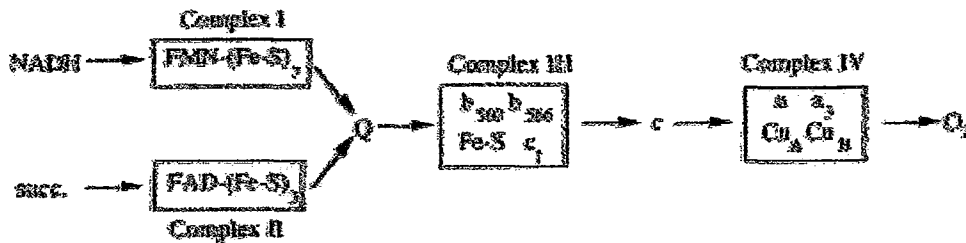
Koenzim Q<sub>10</sub> , uzun izoprenoid kuyruğu olan bir kinon türevidir. Biyolojik sistemlerde çok yaygın olarak bulunduğundan (Ubiquitous) ubikinon olarak da adlandırılır. Kinonlar, benzokinon halkasına bağlı prenil yan zincir uzunluğuna göre adlandırılır. Koenzim Q<sub>10</sub> , yan zincirinde 10 izopren ünitesi içerir. Açık adı 2,3-dimetoksi-5-metil-6-poliprenil-1,4-benzokinondur (4).



Şekil 8: Ubikinonun yapısı.

Bitki kloroplastlarında bulunan plastokinon ve bakterilerde bulunan menokinon ubikinon benzeri yapı ve fonksiyona sahiptirler (39).

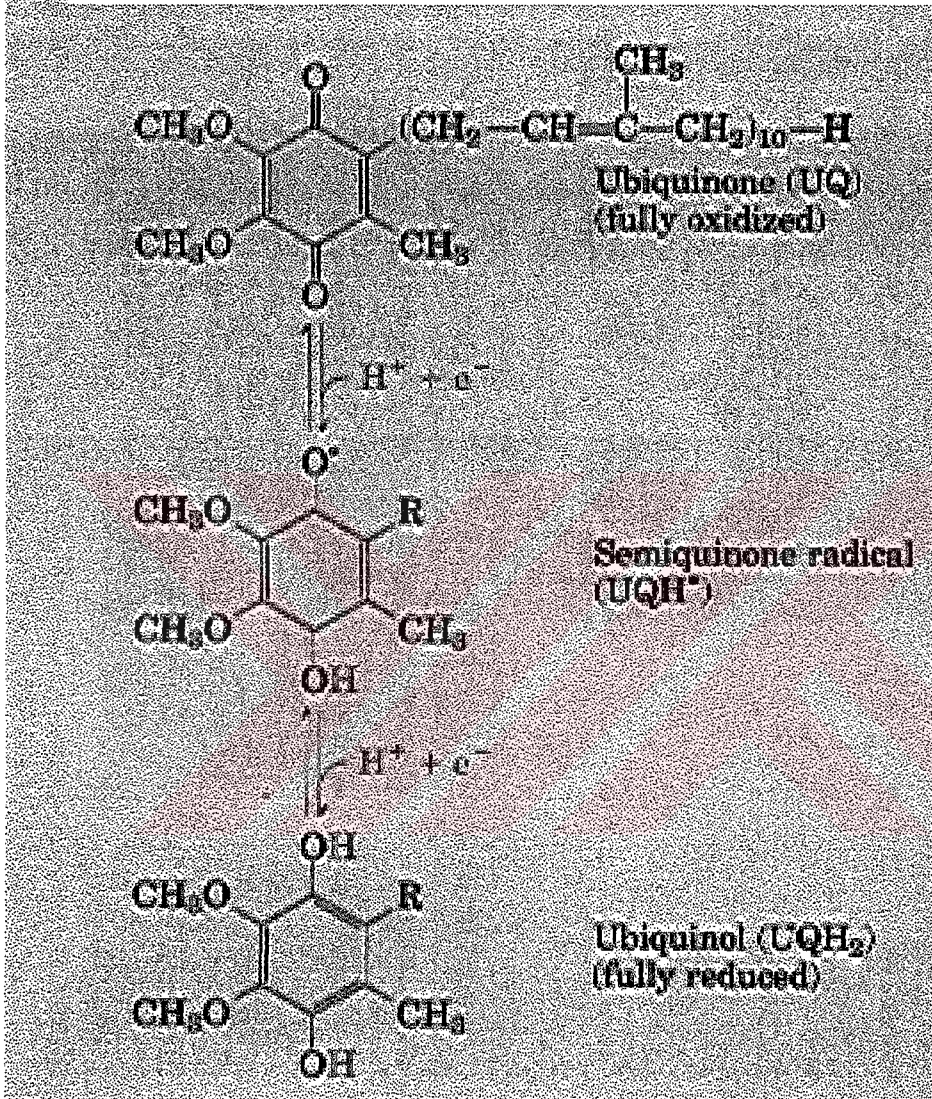
Ubikinon ilk olarak 1957'de Crane ve ark. tarafından mitokondrial elektron transport zincirinin zorunlu bir komponenti olarak tanımlanmıştır (4). Ubikinon membranla ilgili redoks reaksiyonları üzerindeki biyolojik etkinliğini, dehidrogenazlar, nonhem-demir proteinleri ve sitokromlar gibi bazı diğer redoks taşıyıcılarla birlikte paylaşır (Şekil 9) (45).



Şekil 9: Elektron transport zincirinin şematik yapısı.



Ubikinon aynı zamanda yarı redükte formu olan semikinon ile serbest radikal üretiminde ve tam redükte formu ubikinol ile membran komponentlerini peroksidatif hasardan koruyan bir antioksidan olarak görev alır (Şekil 10).



Şekil 10: Ubikinonun yapısı.

### 2.7.1. Ubikinon Sentezi

Memeli hücrelerinde ubikinon sentezi üç basamakta olur (Şekil 11):

1. Poliprenil yan zincir sentezi
2. Altı karbonlu kinon halkasının oluşumu
3. O ve C metil gruplarının kinon halkasına yerleşimi.

Tirozin ve fenilalanin, kinon halkasının prekürsör amino asitleridir. O ve C metil grupları, metioninden türer. Poliprenil yan zincir ise farnezil pirofosfat oluşumu ile sonuçlanan ve mevalonat yolu olarak adlandırılan bir reaksiyon dizisi sonunda asetil CoA'dan meydana gelir. Farnezil pirofosfat dekaprenil pirofosfata dönüştükten sonra 4-hidroksi benzoat ile birleşerek dekaprenil 4-OH benzoatı ve birkaç basamak sonra koenzim Q'yu oluşturur. Farnezil pirofosfat, aynı zamanda kolesterol ve dolikolün de ön maddesidir ve izoprenilasyon yoluyla belirli proteinlerin kovalent modifikasyonunda görev alır (14).

Ubikinon sentezi endoplazmik retikulumda başlar ve Golgide tamamlanır, buradan hücredeki diğer lokalizasyonlara dağılır. En çok iç mitokondrial membranda bulunur. Hayvan hücrelerinde koenzim Q nun mitokondriye ek olarak endoplazmik retikulum, golgi, lizozom, peroksizom ve plazma membranında da yer aldığı gösterilmiştir. Ubikinonun sınırlı miktardaki fazlalığı plazma membranından kana geçer ve plazma lipoproteinlerine bağlanır.

### 2.7.2. Ubikinon Regülasyonu

Ubikinon çoğu mikroorganizmada, bitki ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan biyolojik bileşiktir (45). Mitokondriye ek olarak endoplazmik retikulum golgi aparatı, lizozom, peroksizom ve plazma membranlarında ve lipoproteinlerde bulunur.

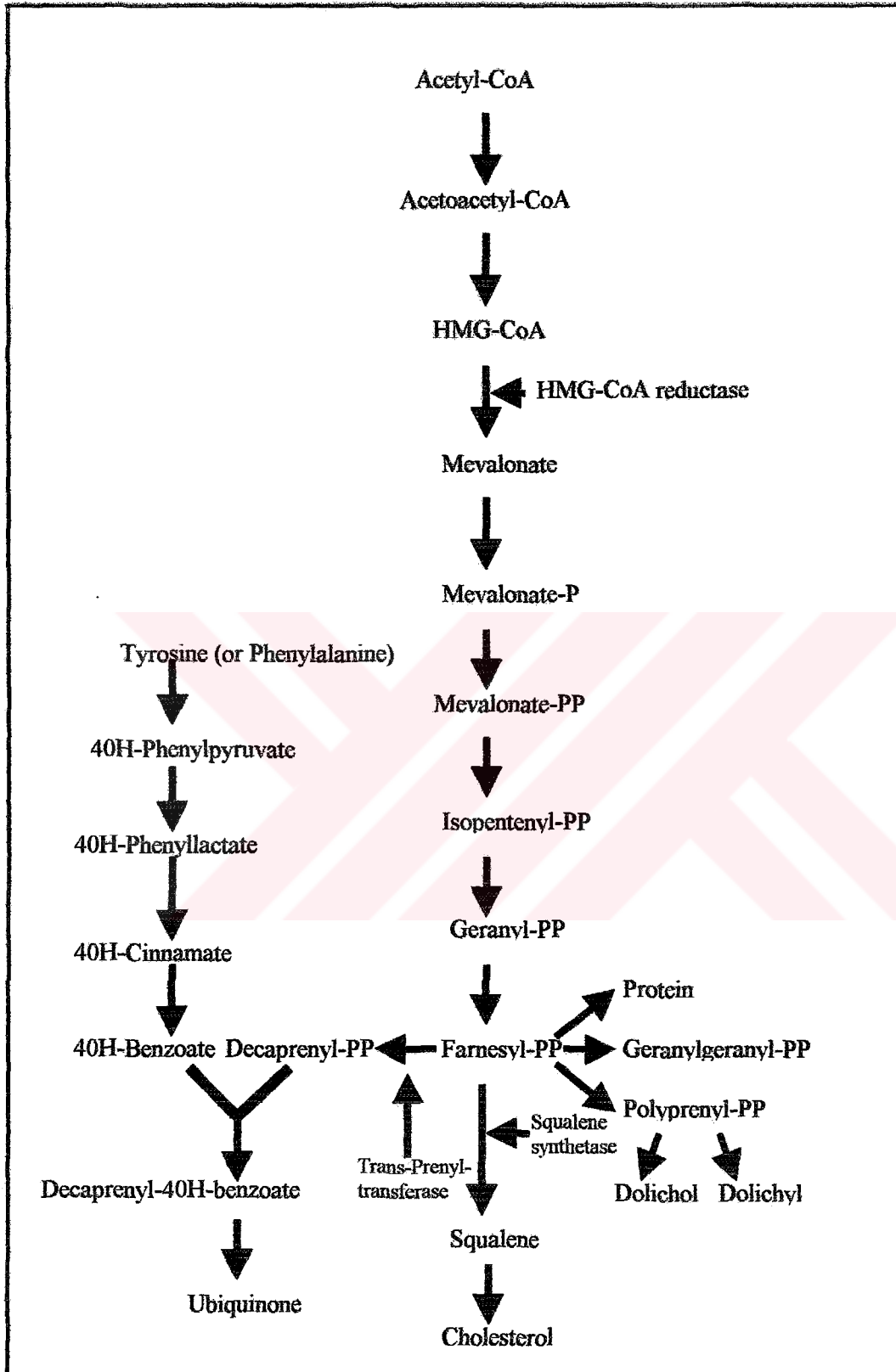
Kolesterolün tersine ubikinon sirkülasyonla farklı dokulara dağılım göstermez. Ubikinon beyin ve akciğerler haricindeki dokularda esas olarak indirgenmiş form olan ubikinol (UQH<sub>2</sub>) formunda bulunur (48). Ubikinonun mitokondri membranı dışındaki membranlarda indirgenmesinden kinon redüktazların sorumlu olabileceği veya diğer

membranlarla ubikinon içeren lipozom ve submitokondrial partiküller arasında geçici füzyonun rol alabileceği ileri sürülmüştür.

Redükte ubikinon (UQH<sub>2</sub>-10) ve okside ubikinon (UQ-10) toplamı total plazma ubikinon düzeyini oluşturur (Total UQ-10). Yapılan bir çalışmada total ubikinonun %85 kadar bir kısmını redükte ubikinonun (ubikinol) oluşturduğu gösterilmiştir (47).

Doku ubikinon seviyeleri organizmanın oksidatif aktivitesiyle ilgili fizyolojik faktörlerle düzenlenir. Fiziksel egzersiz, soğuğa adaptasyon, tiroid hormon tedavisi gibi oksidatif stres etkisi altında bulunulan durumlarda doku ubikinon seviyeleri artarken, artan yaşla birlikte ubikinon seviyelerinde azalma görülür. Klofibrat, flalat gibi peroksizom proliferatörleri muhtemelen bu ajanların indüklediği hidrojen peroksid formasyonundaki artışla ubikinon biyosentezini stimüle ederler. Ayrıca besinlerle veya diyetle ek olarak alınan ubikinon da plazma ubikinon düzeyini arttırıcı etki yapar. 20-60 yaş arası sağlıklı kişilerde plazma ubikinon düzeyinin normal değerleri  $0.8 \pm 0.2$  mg/L'dir (14).

Ubikinonun dokulardaki turnover hızı birbirine benzer, 50-125 saat arasındadır, feçesle ve bir miktar da idrarla atılır.



Şekil 11: Kolesterol-ubikinon biyosentez yolu.



## 2.8. UBİKİNONUN MİTOKONDRİDE ENERJİ ÜRETİMİNDEKİ ROLÜ

Hücrelerin, biyosentez, taşıma ve mekanik işlevler gibi metabolizma olayları için biyolojik enerjiye gereksinimleri bulunmaktadır. Bu tip endergonik tepkimeler için gerekli olan enerji ekzergonik tepkimeler ile sağlanmaktadır. Sağlanan enerjinin önemli bölümü öncelikle özel bir kimyasal taşıyıcı haline getirilmektedir, bu özel taşıyıcı molekül adenozintrifosfat'dır (ATP). ATP enerjinin uzun süreli bir depo biçiminden çok hemen gerekli enerjiyi verebilen hızlı bir aktarıcıdır.

Elektron transport zinciri mitokondri iç zarındadır ve vücutta farklı yakıtlardan elde edilen elektronların oksijene iletilmesindeki son ortak yoldur. Elektron transportu ve oksidatif fosforilasyon ile ATP sentezi vücudun mitokondri taşıyan tüm hücrelerinde sürekli oluşur. Elektronlar katabolik ara ürünlerden moleküler oksijene akarken oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarıyla sağlanan enerji, ADP ve inorganik fosfordan ATP sentezlenmesi için kullanılır.

Ubikinon elektron transport zincirinde NADH dehidrogenaz ve süksinat dehidrogenaz ile sitokrom sistemleri arasında bulunur ve indirgenmiş formuyla elektron transport zincirinden enerji serbest bırakılma hızını etkiler (4). Ubikinon küçük ve hidrofobik bir molekül olduğu için iç mitokondrial membran lipid bariyerinden rahatça difüze olur ve indirgeyici ekivalanlarla, membrandaki daha az mobil diğer elektron taşıyıcıları arasında bir mekik oluşturur (39). Elektron transport zincirinde elektronların flavoproteinlerden sitokromlara transportu sırasında NADH dehidrogenaz (kompleks I) ve süksinat dehidrogenaz (kompleks II) için koenzim görevi yapar. Lipofilik özelliğine uygun olarak ubikinon dehidrogenazlarla etkileşir ve diffüzyonla sitokromlara bir çift elektron taşır. Bu bioaktivite mitokondrial membran dışına iki proton transferiyle sonlanan iki ardışık deprotonasyon basamağını gerektirir.

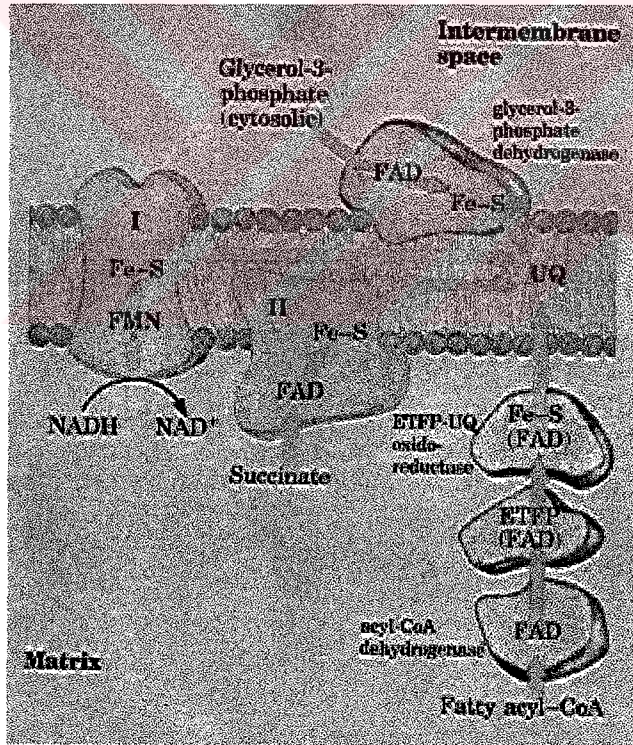
Biyolojik sistemlerde enerji paketler halinde serbest kalmakta ve hemen yüksek enerjili fosfat bağları oluşturarak ortadan kaldırılmaktadır. Bunu sağlayan, oksidasyonun bir dizi

basamak tepkimelere bölünmesidir. Basamak tepkimelerden her biri özel oksidoredüksiyon enzimleri tarafından kataliz edilir(Oksidoredüktazlar).

Elektron transport zinciri basamak tepkimeler şeklinde tanımlanmıştır (39).

### 2.8.1. NADH<sub>2</sub> - Koenzim Q-Oksidoredüktaz Kompleksi (kompleks I)

Nikotinamid adeninükleotit (NAD) bağımlı dehidrogenazların yer aldığı kompleks I yapısında prostetik grubun olarak flavin mononükleotid (FMN) içerir. Oksitlenen substrat yapısından ayrılan hidrojenlerden bir tanesi, nikotinamid halkasının 4. Pozisyonuna hidrid (H<sup>-</sup>) iyonu şeklinde bağlanırken, diğeri proton olarak serbest kalmaktadır. Komplekste 7 tane demir sülfür (Fe-S) bölgesi vardır. Elektronlar bu yolla FMN'den ubiquinona geçerler (Şekil 12).



Şekil 12: Elektronların ubiquinona aktarılış yolu.

### 2.8.2. Süksinat Dehidrogenaz Kompleksi (kompleks II)

Kompleks (II) yapısında, prostetik grubu flavin adenin dinükleotid (FAD) olan süksinat dehidrogenaz enzimi ile Fe-S proteini bulunmaktadır. (Süksinat dehidrogenaz sitrik asit siklusunun tek membrana bağlı enzimidir.) Elektronlar süksinat'dan FAD sonra Fe-S boyunca ubikinona ulaşır.

Ubikinona elektronlar kompleks I ve kompleks II haricinde iki farklı yoldan gelir (Şekil 12). Bu yollardan bir tanesi, yağ asitlerinin  $\beta$  oksidasyonu sırasında açıl CoA dehidrogenazlar tarafından ortaya çıkarılan elektronların, sırasıyla, FAD, ETFP (elektron transfer eden protein), ETFP-ubikinon oksidoredüktaz aracılığı ile ubikinona ulaştırılmasıdır. Bir diğer yol, gliserolün dihidroksiasetonfosfata dönüşümünü katalizleyen, iç mitokondrial membranda yerleşmiş olan gliserol-3-fosfat dehidrogenaz enziminin ubikinonu indirgeyerek elektronları respiratuar zincire ulaştırmasıdır.

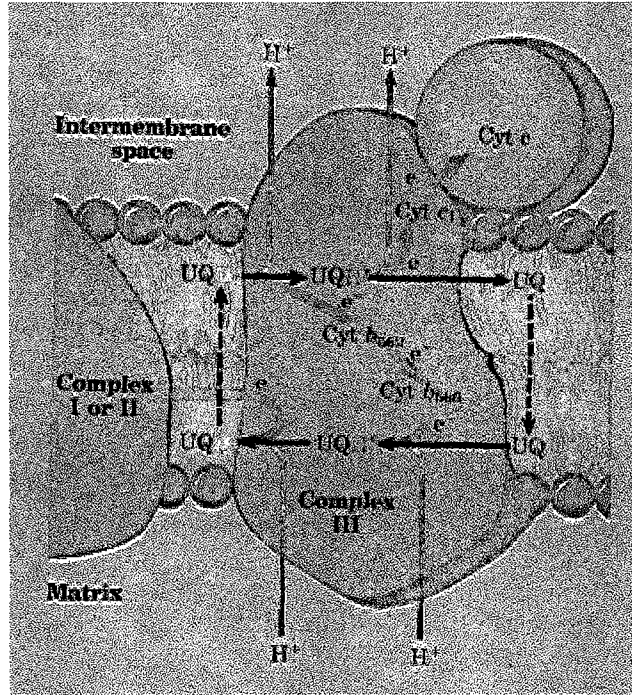
### 2.8.3. Ubikinon – Sitokrom c Oksidoredüktaz Kompleksi (kompleks III)

Kompleks III, yapısında sitokrom  $b_{562}$ ,  $b_{566}$ ,  $c_1$ , Fe-S proteini ve altı protein subünitesi içerir. Sitokrom b membranı kateder,  $c_1$  ve Fe-S protein dış yüzeyde yerleşir. "Q siklusu" denilen bir seri reaksiyonla ubikinol ubikinona okside olur ve sitokrom c, demir atomunun geri dönüşümlü olarak  $Fe^{+3}$  şekline dönüşmesiyle indirgenir. Elektronlar ubikinondan sitokrom b, sitokrom c ve sitokrom  $aa_3$ ' e doğru ilerler (Şekil 13).

Ubikinon protonmatif "Q siklusuyla" oksidoredüksiyon reaksiyonları tarafından salınan enerjinin korunmasında rol alır (14).

Proton gradientinin transmembranöz oluşumu ATP sentezi için kullanılan enerjinin kaynağıdır. ATP sentaz'ın proton kanallarından protonların geri akımı, enzimin konformasyonel değişiklikleri ile ATP salınmasına yol açar. Mitokondrial elektron transportu sırasında ubikinonun oksidasyon redüksiyon döngüsü devam eder (45).





Şekil 13: “Q siklusu”

#### 2.8.4. Sitokrom Oksidaz Kompleksi ( kompleks IV )

Solunum zinciri ile moleküler oksijen arasındaki ilişkiyi kompleks IV sağlamaktadır. Sitokrom oksidaz yapısında hem  $a$ , hem  $a_3$  ( sitokrom  $aa_3$  ) ve iki Cu atomu içerir. (  $Cu_A$ ,  $Cu_B$  ). Sitokrom  $aa_3$ , hem halkasının moleküler oksijen ile direkt reaksiyona girebileceği serbest bağ yapısına sahip olan tek elektron taşıyıcısıdır. Bu bölgede taşınmış elektronlar, moleküler oksijen ve serbest protonlar su oluşturmak üzere bir araya gelirler. Kompleks boyunca 4 elektron sitokrom c’den moleküler oksijene aktarılarak  $H_2O$ ’ ya indirgenir.

#### 2.8.5. ATP Sentaz Enzim Kompleksi ( kompleks V )

Bu kompleks elektron transport zinciri tarafından yaratılmış olan proton farkının enerjisini kullanarak ATP sentezler. ATP sentaz (  $F_0 F_1$  ATPaz ) iki ana komponent içerir: Protonları ileten  $F_0$  ve ATP sentezleyen  $F_1$ . ATP sentaz mitokondri iç membranında matrikse doğru uzanan kristea yapısında yer almaktadır. ATP sentazı oluşturan katalitik

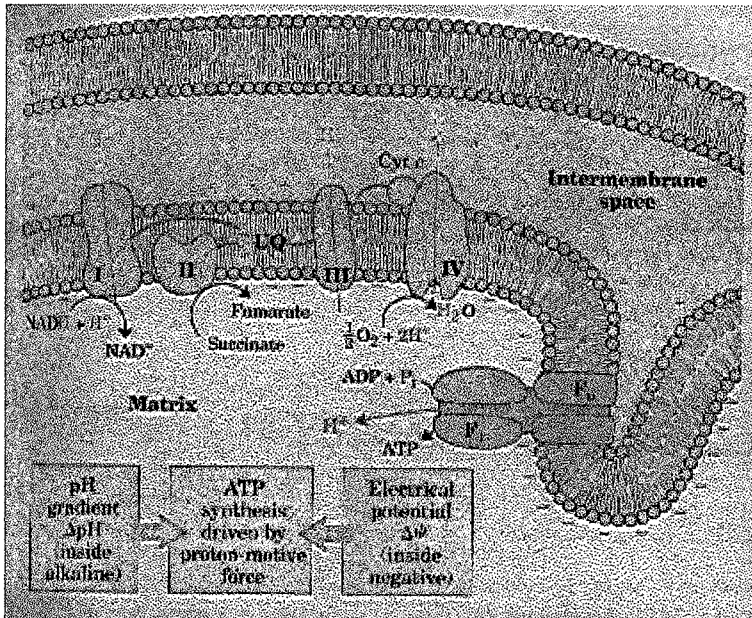
etkili  $F_1$  faktörü kristeannın uç bölgesinde,  $F_0$  faktörü ise membrana gömülü bulunmaktadır.  $F_1$  izole halde iken ATP'nin ADP ve inorganik fosfata hidrolizini katalizler. Bu nedenle  $F_1$  ATPaz olarak adlandırılır.  $F_1$ ,  $F_0$  ile kompleks halde iken ADP ve fosfat'dan ATP sentezleyebilir.

### 8.5.1. Kemiosmotik Hipotez

Bu hipotez, elektron transport zinciri sırasında üretilen serbest enerjinin ATP oluşumunda nasıl kullanıldığını açıklar.

Solunum zincirinde elektronların ilerlemesine bağlı olarak protonlar ( $H^+$ ) matriksten membranlar arası boşluğa geçerek bir proton gradienti meydana getirmektedir. İç mitokondrial membran protonlara geçirgen değildir. Protonların zarın iki yüzü arasında oluşturduğu gradientten doğan elektrokimyasal potansiyel farkı (PH), iç membranda lokalize bir enzim olan ATPsentez'ı yönlendirerek, ADP ve fosfat varlığında ATP oluşmasına yol açar (Şekil 14).

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 3 ATP meydana gelir.  $FADH_2$ 'nin oksidasyonu 6 protonun transferiyle sonuçlandığı için 1  $FADH_2$  molekülünün oksidasyonu 2 ATP meydana gelir.



**Şekil 14:** Elektrokimyasal potansiyel farkıyla ATP sentezinin sematik görüntüsü.

## 2.9. UBİKİNONUN PROOKSİDAN VE ANTİOKSİDAN ROLÜ

Ubikinonun prooksidan ve antioksidan rolüne değinmeden önce oksidan etkenler ve antioksidan mekanizmalara kısaca değinilecektir.

### 2.9.1. Serbest Radikal Kavramı

“Serbest radikaller bir veya daha fazla eşlenmemiş ( tek sayıda ) elektron içeren ve bağımsız olarak bulunabilen çok kısa ömürlü kimyasal türlerdir. Son derece reaktif bir yapıya sahip olabilen serbest radikaller eşlenmemiş elektronlarını paylaşmak için, diğer moleküllerle hızla reaksiyona girerek, daha kararlı yapıları oluştururlar”(53).

Oksijen hayati önem taşıırken aşırı oksijen toksik etki yaratır. Oksijeni bu denli toksik kılan, eşlenmemiş elektronu ile diradikal özelliği taşımasıdır. İki orbitalinde eşlenmemiş birer elektronu bulunan moleküler oksijene, elektronların tek tek eklenmesi ile, bazıları serbest radikal özelliği taşıyan reaktif oksijen türleri oluşmaktadır ( Tablo 3).

### 2.9.2. Reaktif Oksijen Türlerinin ve Diğer Serbest Radikallerin Oluşmasına Yol Açan Kaynaklar

**Tablo 2:** Reaktif oksijen türlerinin ve diğer serbest radikallerin oluşmasına yol açan kaynaklar.

Endojen Kaynaklar	Eksojen Kaynaklar
1. Mitokondrial ve endoplazmik retikulum elektron transport zinciri	1. İyonizan radyasyon (Örn: x ışınları)
2. Nötrofil fagositoz sistemi (NADPH oksidaz)	2. Hepatotoksinler (Örn: Tiyoasetamid, karbon tetraklorür)
3. Ksantin oksidaz enzim sistemi	3. Ksenobiyotikler
4. Araşidonik asid metabolizması	4. Redoks siklüsü yapan maddeler (Örn: Alloxan parakuat)
5. Enzimatik olmayan reaksiyonlar	5. Kemoterapötikler (Örn: adriyamisin)
6. Lenfosit, fibroblast ve endotelden regülatuvar moleküller olarak Salınma	6. Hava kirliliği
7. Diğer oksidazlar	7. Sigara

Tablo 3: Serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri

<b>Oksijen merkezli serbest radikaller</b> Moleküler oksijen Triple durum Singlet durum Süperoksid radikali Hidroksil radikali Alkoksil radikali Peroksi radikali	$^3\text{O}_2$ $^1\text{O}_2$ $\text{O}_2^-$ $\cdot\text{OH}$ $\text{RO}\cdot$ $\text{ROO}\cdot$
<b>Oksijen merkezli olmayan serbest radikaller</b> Karbon merkezli Lipid radikalleri Alkoksi radikalleri Sülfür merkezli Sülfür radikali Hidrojen merkezli Hidrojen atomu Demir merkezli Perferil radikali Azot merkezli Nitrik oksid Nitrojen dioksid	$\text{L}\cdot$ $\text{R}\cdot$ $\text{R-S}\cdot$ $\cdot\text{H}$ $\text{Re}^{3+}-\text{O}_2-\text{Fe}^{2+}$ $\text{NO}\cdot$ $\text{NO}_2\cdot$
<b>Radikal olmayan reaktif türler</b> Ozon Hidroperoksidler Hidrojen peroksid Lipid peroksidleri Hipoklorik asid Kloraminler	$\text{O}_3$ $\text{H}_2\text{O}_2$ $\text{LOOH}$ $\text{HOCl}$ $\text{R}\cdot\text{RNCl}$



### 2.9.3. Serbest Radikal Kaynağı Olarak Mitokondrial Elektron Transport Zinciri

Mitokondrial elektron transport zinciri hücrede en önemli süperoksid üretim yerlerinden biridir ve süperoksid oluşum hızı, mitokondrial oksijen tüketimi ile direk orantılıdır (4).

Oksijenin biyolojik sistemlerde ideal bir terminal elektron alıcısı özelliği bulunmaktadır. İnsan vücudu tarafından solunan oksijenin % 90'ı oksidatif fosforilasyon sırasında, mitokondrial elektron transport zincirinde kullanılmaktadır (28,54). Mitokondride oksidatif fosforilasyonla ATP oluşurken, moleküler oksijenin tetravalan ( dört değerli ) reaksiyonu ile su oluşur. Suya indirgenen oksijenin yaklaşık %1-5'lik kısmı sitokrom oksidazla katalizlenen bu yoldan kaçak yaparak toksik ara ürünleri oluşturabilmektedir (53).

Elektron transportuyla ubikinondan yarı redükte form olan semikinon oluşum basamağı da, elektron transport zincirinde radikal oluşumunda önemlidir.

### 2.9.4. Serbest Radikallerin Hedefleri

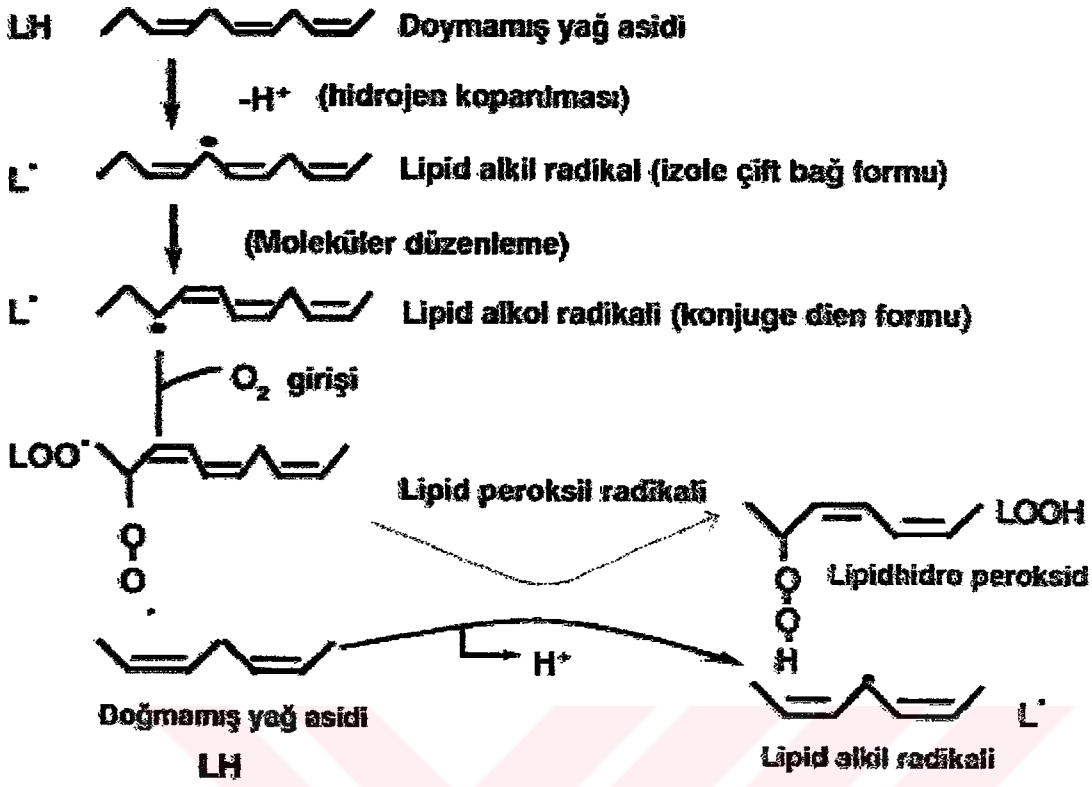
Başlıca üç ana biyolojik makromolekül serbest radikallere karşı duyarlıdır.

1. Lipidler
2. Proteinler
3. Nükleik asitler

#### 1- Lipid Peroksidasyonu

Yeterli reaktivitedeki oksijen kaynaklı bir radikalın membrandaki poliansatüre yağ asitlerine atağı sonucunda lipid peroksidasyonu oluşur.Lipid peroksidasyonu bir radikal zincir reaksiyonudur (Şekil 15).





Şekil 15: Lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonları

Lipid peroksidasyonu başlıca 3 basamakta gerçekleşir:

**Başlangıç Basamağı :** Hız kısıtlayıcı basamaktır. Oksijen kaynaklı radikalın yağ asitlerindeki bir metilen grubundan (-CH<sub>2</sub>-) hidrojen atomunu koparması ile gerçekleşir. Yağ asidinde çift bağ varlığı C-H bağı zayıflatarak H atomunun koparılmasını kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle membran lipidlerinin doymamış yağ asitli yan zincirleri, peroksidasyona özellikle duyarlıdır.

**İlerleme Basamağı :** Karbon merkezli radikal, moleküler düzenleme ile izole çift bağ formundan konjuge dien formuna geçer. Oluşan lipid radikal'ini oksijen ile reaksiyona girerek lipid peroksil radikali oluşturur. Lipid peroksil radikali ise, bir başka yağ asidinden hidrojen atomunu kopararak lipid hidroperoksit'i ve yeni bir lipid alkil radikal'ini oluşturarak yeni bir zincir reaksiyonu başlatabilmektedir.

İndirgenmiş metal iyonları ( $Fe^{2+}$  ve  $Cu^+$ ) lipid hidroperoksidi ile reaksiyona girerek alkoksil radikali ( $LO\cdot$ )'ni, okside metal iyonları ise ( $Fe^{3+}$  ve  $Cu^{2+}$ ) daha yavaş bir reaksiyonla alkoksil ve peroksil ( $LOO\cdot$ ) radikalleri'ni oluşturmaktadır. Her iki radikal de başka yağ asitlerinden hidrojen atomu kopararak lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu sürdürürler.

**Sonlanma Basamağı:** Lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonları , iki lipid peroksit radikali etkileşinceye kadar ve siklik peroksit ( $LOOL$ ) oluşumu ile sonlanmaktadır.

Lipid peroksidasyonu sırasında, karbon bağlarının kopması ile aldehid yapısında yıkılım ürünleri ortaya çıkmaktadır. Bu sitotoksik metabolitler, malondialdehid (MDA) gibi alkanoller, 4 hidroksinonenal gibi hidroksialkanoller ve alkenallerdir.

Lipid peroksidasyonu biyolojik membranlarda yaygın hale geldiği zaman, peroksidasyon ürünleri aracılığı ile membran akışkanlığı bozulmakta, hücresel yapı ve fonksiyonlarda hasar ortaya çıkmaktadır.

## 2. Protein Oksidasyonu

Serbest radikal oluşumu hücrenin protein yapısında hasara neden olmaktadır. Proteinlerin radikal hasarından etkilenme dereceleri amino asit içeriklerine bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallere duyarlılığı çok fazla olduğu için bu yapıda olan proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Oksidasyon sonucunda proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında oluşan değişiklikler fonksiyonlarını etkilemektedir. Enzim veya reseptör fonksiyonuna sahip membran proteinlerinin oksidasyonu ile hücre membran fonksiyonları bozulmaktadır (49).

## 3. DNA Hasarı

Reaktif oksijen radikallerinin bir diğer önemli hedefi nükleik asitlerdir. DNA'nın oksidatif hasarı, DNA baz modifikasyonu ve zincir kırıklarını içerir (55). DNA molekülünün yapısındaki bu değişiklikler mutasyonlar, kanser ve hücre ölümünden sorumludur (33).

### 2.9.5. Antioksidan Defans Sistemi

Oksijenin tam olmayan indirgenmesi ile oluşan toksik ürünlere karşı aerobik organizmalar doku hasarından korunmak için antioksidan savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir.

Antioksidanlar, okside edilebilir substrata oranla çok düşük konsantrasyonlarda bile, substratın oksidasyonunu geciktiren veya engelleyen maddelerdir (27). Antioksidanlar, radikal oluşumunun önlenmesi, oluşan radikallerin detoksifikasyonu, başlamış radikal zincir reaksiyonunu kırarak reaksiyonun sonlandırılmasıyla ; serbest radikal hasarına karşı savunma sağlarlar

Biyolojik sistemlerden serbest radikallerin uzaklaştırılması tablo 4'de gösterilmiştir.



**Tablo 4: Antioksidanların hücrel yerleşimlerine göre sınıflandırılması**

İSİM	İŞLEV
<p><b>İntrasellüler antioksidanlar</b></p> <p><b>Süperoksit dismutazlar</b> (Cu, Zn, Mn)<sup>a</sup></p> <p>Katalaz (4NADPH molekülü içerir) (Fe)<sup>a</sup></p> <p>Glutasyon peroksidaz (Se)<sup>a</sup></p> <p>Sitokrom oksidaz (Cu)<sup>a</sup> tarafından O<sub>2</sub> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve OH oluşumunun engellenmesi</p>	<p>O<sub>2</sub><sup>-</sup> 'i katalitik olarak uzaklaştırma</p> <p>Yüksek konsantrasyonlardaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uzaklaştırma</p> <p>Düşük konsantrasyonlardaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve organik hidroperoksidlerin uzaklaştırılması</p> <p>O<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O'ya indirgenmesi sırasında reaktif oksijen türlerinin salınımının engellenmesi</p>
<p><b>Membran antioksidanlar</b></p> <p><b>Vitamin E</b></p> <p>β karoten</p> <p>Koenzim Q</p> <p>Membranın yapısal organizasyonu</p>	<p>Yağda eriyen, zincir kıran antioksidan</p> <p>Yağda eriyen, radikal yakalayıcı ve singlet oksijen yakalayıcısı</p> <p>Enerji metabolizmasındaki temel rolüne ek olarak antioksidan etki</p> <p>Fosfolipid/kolesterol oranını oluşturma (membran bütünlüğü için fosfolipid ve yağ asitlerinin tipleri önemlidir)</p>
<p><b>Ekstrasellüler antioksidanlar</b></p> <p><b>Transferrin</b></p> <p>Laktoferrin</p> <p>Haptogloblin</p> <p>Hemopeksin</p> <p>Albumin</p> <p>Seruloplazmin</p> <p>EC-SOD</p> <p>EC-GSHP<sub>x</sub></p> <p>Bilirubin</p> <p>Mukus</p> <p>Urik asid</p> <p>Glukoz</p> <p>Askorbik asid</p> <p>Eritrosit</p>	<p>Ferrik iyonlar (Fe<sup>3+</sup>)'i bağlama (1 mol protein 2Fe<sup>3+</sup> iyonu bağlar)</p> <p>Düşük pH değerlerinde ferrik iyonları bağlama (1 mol protein 2Fe<sup>3+</sup> iyonu bağlar)</p> <p>Hemoglobini bağlama</p> <p>Hemi bağlama</p> <p>Bakır, hemi bağlama, HOCl'i yakalama</p> <p>Ferrosidaz aktivitesi ile O<sub>2</sub> yakalama, bakır iyonlarını bağlama, (bakırın reoksidasyonu için H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i kullanır)</p> <p>O<sub>2</sub><sup>-</sup>'i katalitik olarak uzaklaştırma</p> <p>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'i ve hidroperoksidleri katalitik olarak uzaklaştırma</p> <p>Peroksil radikallerini yaklama</p> <p>·OH yakalama</p> <p>Radikal yakalama ve metal bağlama</p> <p>·OH yakalama</p> <p>·OH yakalama</p> <p>Yüksek katalaz ve SOD içeriği nedeni ile eritrosit içine sızan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i ve O<sub>2</sub>'ni yakalama</p>

### 2.9.6. Ubikinonun Prooksidan Rolü

Hücre mitokondrial respirasyonu sırasında kinon redüktazlar olarak etki edebilen NADH ve NADPH okside edici flavoenzimler aracılığı ile bir elektron redüksiyonuyla kinonlardan semikinon formu oluşur (SQ). Semikinon formu mitokondrinin süperoksid radikal oluşumuna yol açan majör otookside olabilir komponentidir. Semikinonun moleküler oksijenle etkileşime girmesi sonucunda süperoksid radikalın oluşumu ve kinon formuna dönüş gerçekleşir (6).



Süperoksid radikal oluşumu mitokondrial oksijen kullanım hızı ile doğru orantılıdır. Süperoksid üretimi özellikle süksinat veya NADH ile sitokrom b arasında gerçekleşir. Redoks siklusuna giren ubisemikinonlar süperoksid radikalleri için fizyolojik oluşum yerleri olarak görülmekle birlikte, mitokondrial iç membranın yapısal olarak bozulması oksijen ile semikinonun etkileşimini arttırmaktadır. Fosfolipid çift tabakanın bozukluğu arttıkça redoks siklusuna giren semikinonun oksijene duyarlılığı artmaktadır (45). Oluşan bu süperoksid radikalının membran fonksiyonlarını değiştirerek sellüler homeostaz için sürekli bir tehdit oluşturmasının yanı sıra, mitokondrial DNA ile reaksiyona girerek mutasyonlara neden olduğu da saptanmıştır (57). Ayrıca mitokondrial solunum zincirinin kanser için önemli bir serbest radikal kaynağı olduğu hatırlanmalıdır.

### 2.9.7. Ubikinonun Antioksidan Rolü

Ubikinon ve tokoferoller antioksidan özelliklerinden dolayı biyolojik membranların stabilizasyonunda rol alırlar (32).

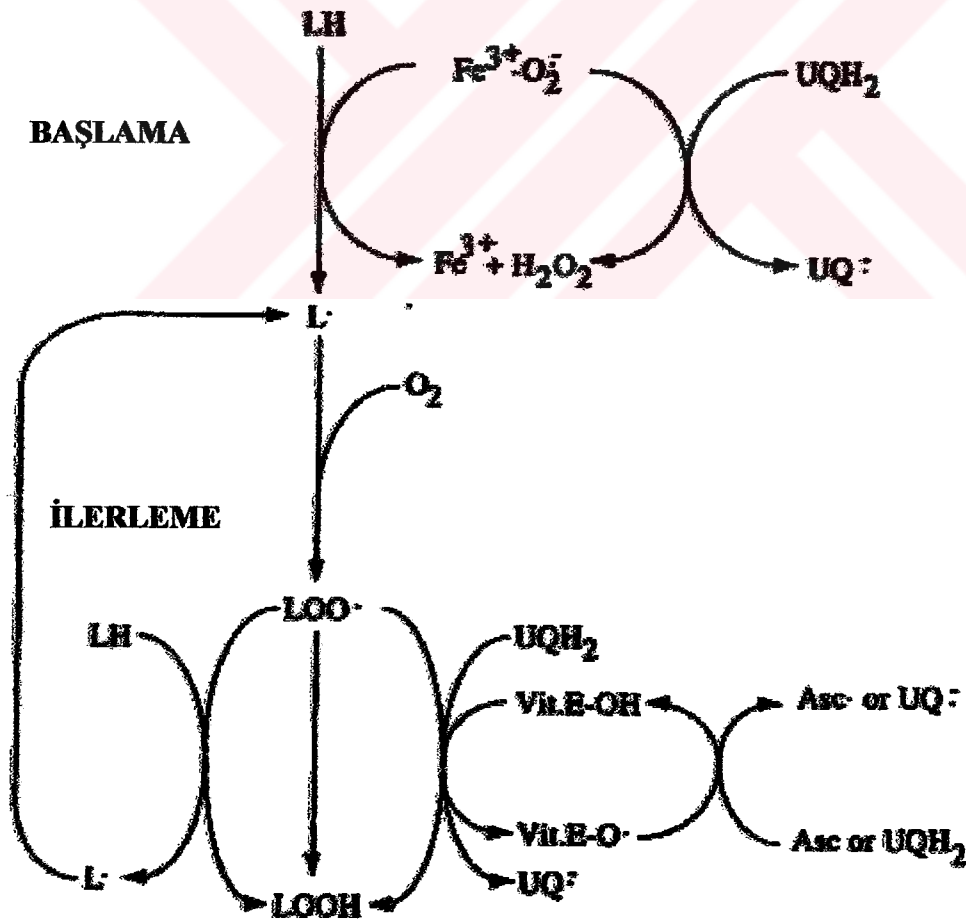
Ubikinonun antioksidan özelliğinin moleküler mekanizması iki şekilde özetlenebilir:

1. Lipid radikalleri ile direkt reaksiyona girmesi
2.  $\alpha$ -tokoperoksil radikali ile etkileşime girerek vitamin E rejenerasyonunu sağlaması

## 1. Lipid radikalleri ile direk reaksiyona girmesi

Biyolojik membranları serbest radikal hasarından koruyucu önemli bir endojen antioksidan olan ubikinol membran fosfolipidlerinin hidrofobik bölgesinde yer aldığından lipid peroksidasyonunun önlenmesinde yüzeye yakın yer alan  $\alpha$ -tokoferole göre daha uygun pozisyonadadır. Vitamin E zincir kırıcı bir antioksidan olarak lipid peroksidasyonunun ilerleme safhasını inhibe ederken, ubikinol başlama ve ilerleme safhalarının her ikisini de önleyebilir (14).

Ubikinol perferil radikalleri ile etkileşime girerek lipid peroksidasyonunun başlangıç safhasına karşı koruyucu etki gösterebilir. Ayrıca peroksil ( $LOO\cdot$ ) ve alkoksil radikaline ( $LO\cdot$ ) H atomunu aktararak da lipid peroksidasyonunun ilerleme safhasını inhibe edebilir (Şekil 16) (32).



Şekil 16: Ubikinolün lipid radikalleri ile reaksiyonu.

Ayrıca LDL-ubikinon, LDL'yi oluşabilecek peroksidatif hasara karşı başlangıç savunmasında yer alarak korumaktadır. LDL'deki çok küçük miktardaki ubikinonun invitro olarak yapılan bir çalışmada LDL'yi bakırla indüklenen oksidasyona karşı önemli ölçüde rezistan hale getirdiği gösterilmiştir (48).

Bir başka çalışmada diyete ek olarak alınan ubikinonun 4-5 gün içinde LDL'deki ubikinon içeriğini 3-4 kat arttırdığı bildirilmiştir (67).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar ubikinonun mitokondrial membran proteinlerini ve DNA'yı serbest radikal hasarından koruduğunu göstermektedir (14).

## 2. $\alpha$ -tokoperoksil radikali ile etkileşime girerek vitamin E rejenerasyonunu sağlaması

$\alpha$ -tokoferol ( $\alpha$ -TOH, vitamin E), lipofilik bir moleküldür, zincir kırıcı antioksidan olarak sekonder savunmada görev alır. Peroksil radikalleri ile reaksiyona girerek zincir reaksiyonlarını kırar (67).



Ubikinol ve semikinon, oluşan bu  $\alpha$ -tokoperoksil ( $\alpha$ -TO $\cdot$ ) radikali için elektron donörü olarak etki ederek vitamin E rejenerasyonunu sağlar (32).

## 2.10. UBİKİNONUN KLİNİK ÖNEMİ

Yaşlılık dahil çeşitli fonksiyonel bozuklukların profilaksi ve tedavisinde ubikinonun kullanımı son yıllarda yaygınlaşmıştır.

Yapılan bir çalışmada ubikinonun oral alımından sonra beyin ve beyin mitokondrisindeki konsantrasyonunun arttığı gözlenmiştir. Eğer nörodejeneratif hastalığın patogenezinde enerji metabolizmasındaki bir bozukluk veya oksidan hasara bağlı bir defekt söz konusu ise ubikinonun yararlı terapötik etki gösterebileceği ileri sürülmüştür (43).

Bir diğer çalışmada Parkinson hastalarında mitokondri ubikinon düzeyi önemli ölçüde düşük bulunmuştur. “Tedavi edilmemiş Parkinson hastalarında trombosit mitokondrisinde kompleks I, II, III aktivitesi başlangıçta düşüktür. Ubikinon ve kompleks I, II, III aktivitesi birbiriyle büyük ölçüde koreledir” (61).

Ubikinon eksikliği, oksidatif fosforilasyon sırasında oluşan serbest radikaller nedeniyle mitokondrial hasar ve disfonksiyona katkıda bulunur.

Kalp yetmezliğinde myokardium ve plazmada ubikinon eksikliği saptandığında, kalp yetmezliğinin patofizyolojisi çok kompleks olmakla birlikte myokardial enerji depolarındaki tükenme yetmezlikle sonuçlanabileceğinden kalp yetmezliği tedavisinde de ubikinon terapötik amaçlı denenmektedir (69).

Yapılan bir çok rat çalışmasının bulguları ubikinonun oral alımının çeşitli bakteriyel, viral, protozoal enfeksiyonlara ve kimyasalların neden olduğu neoplazilere rezistans oluşturduğunu göstermiştir. Bu rezistans artışı hücrel enerji gerektiren konakçı defans sisteminin ubikinon tarafından stimülasyonu ile açıklanmıştır (15).

Mitokondrial myopati, ensefalopati, laktik asidoz, şok tablosuyla seyreden respiratuar zincir fonksiyonlarındaki defekte bağlı gelişen MELAS sendromunun tedavisinde ubikinol



ile benzer kimyasal yapıda olan idebenone preparatının hastalarda klinik ve biyokimyasal düzelme sağladığı gösterilmiştir (30).

Birçok kanser hastalığında kanda, doku ve organlarda ubikinon eksikliği saptanmıştır. Bazı kanser hastalarında ubikinonun bozulmuş biyosentezinin sonucu olarak görülen eksiklik dominant biyokimyasal disfonksiyon olarak tanımlanmıştır (15).

İsveçte 116 kanser hastasında yapılan bir çalışmada plazma ubikinon değerleri normal değerlerin altında olan kişilerde meme kanseri insidansının %38.5 olduğu tespit edilmiştir. Ubikinon biyosentezindeki bozukluğun DNA baz yapısını etkileyerek kanser gelişimine moleküler bir temel hazırlayabileceği öne sürülmüştür (62).

Yapılan hayvan çalışmaları da azalmış ubikinon seviyelerinde immün sistemdeki gerilemeyi göstermektedir. Bu etki de kanser etiolojisinde ubikinonun rolü olabileceğini düşündürmektedir (15).

## 2.11. HMG COA REDÜKTAZ İNHİBİTÖRLERİNİN (STATİNLERİN) KAS DOKUSUNA ETKİLERİ

Simvastatinin kullanım dozlarında myozit ve rabdomyoliz gibi kasla ilgili yan etkileri olduğu ileri sürülmektedir. Simvastatinin iskelet kası hücre kültürlerinde  $C_2C_{12}$  'de hücre bölünmesini azalttığı ayrıca bir başka çalışmayla myoblast kültürlerinde HMG CoA redüktaz inhibitörlerinin antiproliferatif etkisi gösterilmiştir (17).

Farklı iki olgu sunumunda simvastatin kullanan kişilerde kas yorgunluğu, CK ve myoglobulin yüksekliği ile seyreden rabdomyoliz geliştiği, ilacın kesilmesi ile semptomların gerilediği belirtilmiştir. Her iki yayında da ubikinon eksikliğine bağlı azalmış mitokondrial ATP üretiminin mitokondrial 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 (42,58).

Lipofilik olan simvastatinin kasa toksik etkisi hidrofilik pravastatinden daha fazla olduğu dikkat çekmiştir. Lipofilik olması simvastatine hepatositler haricindeki diğer doku hücrelerine de basit difüzyonla girebilme kolaylığı sağlamaktadır. Kas hücrelerindeki lipid fazın değişikliği iskelet kası membranlarının yapısında ve elektriksel özelliğinde değişikliğe yol açmaktadır. Ayrıca simvastatin kas dokusunda ubikinon, dolikol gibi hücre fonksiyonları için önemli olan moleküllerin sentezini de baskılamaktadır (50).

Statinlerin hücre büyümesi ve farklılaşması üzerine olan toksik etkileriyle iskelet kası hücre rejenerasyonunu inhibe ettiği ve bu durumun CK yüksekliği ve rabdomyoliz ile sonuçlandığı bildirilmiştir (68).

## 2.12. HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)

Kromatografi moleküllerin ayırım ve ölçümünde uzun yıllardan beri kullanılan bir tekniktir. Kromatografi ilk olarak 1903-1906'lı yıllarda kalsiyum karbonat kolonu üzerinde adsorpsiyon kromatografisi ile bitki pigmentlerinin ayırımında kullanılmıştır.

Kromatografi tekniğinde incelenecek olan materyal gaz veya sıvı bir fazda çözdürülür ve bu faz özel olarak seçilmiş bir destek ortamdan geçirilir. Bu destek ortama stasyoner (durağan) faz denir. Numune örneklerini taşıyan akıcı faza ise mobil (hareketli) faz denir. Karışımda bulunan maddeler stasyoner faz ile değişik oranlarda etkileşirler, stasyoner faza afinitesi az olan moleküller önce, daha çok afinitesi olan moleküller daha sonra ayrılırlar.

Kromatografik analizler ayırım mekanizmalarına göre şu şekilde sınıflanabilir:

- *Ion-exchange” kromatografisi:* Ayırımın temelini iyonik yükün sayısı ve türündeki (-,+ farklılıklar oluşturur.
- *“Steric-exclusion” kromatografisi* (Jel filtrasyon, moleküler eleme, “size exclusion”): Ayırım da moleküllerin büyüklüklerini temel alan bir tekniktir.
- *Afinite kromatografisi:* Enzimleri ve diğer proteinleri biyolojik spesifitelerine bağımlı olarak incelemekte ve saflaştırmaktadır.
- *Adsorpsiyon kromatografisi:* Moleküller ve solid destek materyali veya adsorban arasındaki elektrostatik, hidrojen bağı gibi etkileşimleri temel alır.
- *Partisyon kromatografisi:* Solid moleküllerin mobil faz ve stasyoner fazdaki kısmi çözünebilirliğine dayanır.

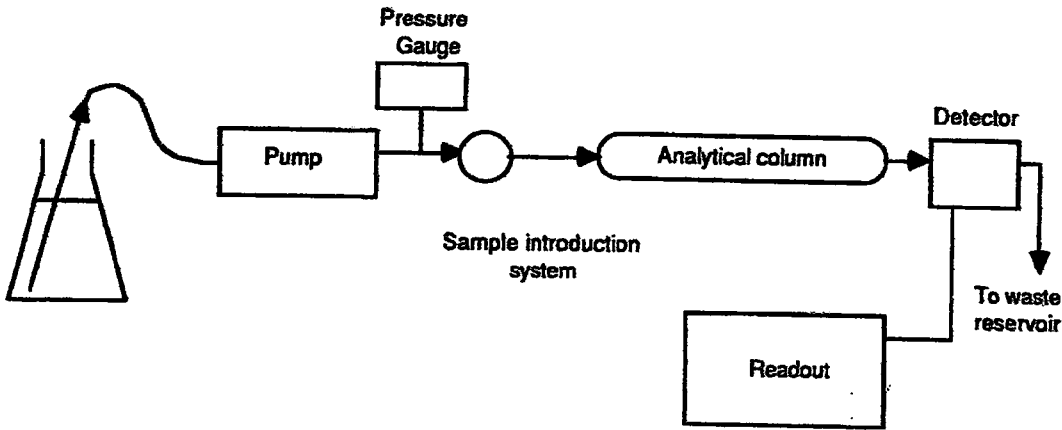
Kromatografi formlarına göre bir sınıflama yapılacak olursa:

- *Planar kromatografi* (kağıt kromatografisi, ince tabaka kromatografisi)
- *Kolon kromatografisi* (gaz kromatografisi, HPLC)

HPLC büyük moleküllü bileşiklerin kromatografik ayırım ve kantitasyonunun gerçekleştirilebildiği ve biyolojik örneklerin analizinde kullanımı giderek artan bir tekniktir (5).

Diğer kromatografik tekniklerin kullanımı oldukça eskiye dayanmakla birlikte bu tekniklerin bileşiklerin ayırımında yetersiz kalması ve ortaya çıkan zorluklar HPLC'yi bu tekniklere göre üstün kılmaktadır. Gaz kromatografisi başarılı bir teknik olarak kabul edilmekle birlikte uçucu olmayan, yüksek polimerize, polar ve kompleks bileşiklerin bu tekniklerle ayırımının zor olması kullanımını kısıtlamaktadır. İnce tabaka kromatografisi, kağıt kromatografisi, kolon kromatografisi kullanışlı teknikler olmakla birlikte bazı bileşiklerin ayırımında tam olarak yeterli olamamaktadır. HPLC'nin yüksek hız ve hassasiyetle gerçekleştirdiği başarılı rezolüsyon kompleks bileşiklerin ayırımına olanak sağlar. Farklı kolon materyallerinin varlığı sayesinde değişik kromatografik mekanizmaların kullanılabilmesi HPLC tekniğini diğer kromatografik tekniklere göre avantajlı kılar.

HPLC, analizi yapılacak komponentin kolon içinden sürekli geçen mobil faz yardımıyla kolon içini kaplayan stasyonier faz (durağan faz) denilen poröz partiküllerdeki fonksiyonel gruplarla etkileşimine dayanan bir sistemdir. HPLC, solvent rezervuarı, pompa, enjektör, kolon, dedektör, kayıt cihazını içeren bir çok modülden oluşmuştur (Şekil 18).



Şekil 18: HPLC cihazının basit şematik yapısı.

**Solvent Rezervuarı:** Mobil faz içeriğinin bulunduğu cam kaptır.

**Pompa:** Mobil fazı rezervuardan alıp kolona, kolondan detektöre yönlendiren sistemdir. Pompa teknolojisi zaman içinde gelişme göstermiştir. Basınç kontrollü ve solventi farklı akış hızlarında kolona ulaştırabilme gücüne sahip pompalar mevcuttur. Solventin, detektöre sabit hızla, pulsasyonsuz bir şekilde ulaşması detektör sensitivitesini arttıran bir faktördür. İyi düzenlenmemiş pompa sistemleri pulsasyonlara neden olarak solvent akış hızında değişikliklere yol açar. Sıvı kromatografisinde pompa iki farklı şekilde işlev görür.

1. İzokratik ayırım
2. Gradient ayırım

*İzokratik ayırım:* Mobil fazın birleşimi kromatografik işlem sırasında sabit kalır, tek bir solvent vardır ya da mobil fazın birleşimi işlem boyunca hiç değişmez.

*Gradient ayırım:* Mobil faz işlem sırasında basamaklı ve sürekli bir şekilde değişime uğrar. Bunu sağlayan değişik teknikler vardır. İki veya daha fazla pompa paralel olarak kullanılır, pompa akışı programlanır. Alternatif bir teknik; tek bir pompa sisteminin bulunduğu tekniktir. Üç yada dört farklı solvent rezervuarı vardır ve tek bir pompanın girişinde ayarlayıcı valvler yoluyla bileşim ayarlanır.

**Enjektör:** Örnek, enjektör yoluyla sisteme uygulanır. En yaygın kullanılan enjektör halkasal enjektördür (“Loop” enjektör).

**Kolon:** Durağan (stasyoner) faz paslanmaz çelikten yapılmış analitik kolonlar içine paketlenmiştir. Kolonların iç çapı 2-5 mm, boyları ise 50-300 mm'dir. Durağan faz olarak kolonun paketlenmesinde siferik silika partikülleri kullanılır. Makro partiküller (partikül çapı 40µm den büyük), mikropartiküller (partikül çapı 3-10 µm) ve peliküller (20-60 nm çapında bilyanın üzerine kaplanan tabakalardan oluşur) olmak üzere üç farklı türde silika partikülü mevcuttur. Tercih edilen yüksek etkinlik ve bağlama kapasitesine sahip olan mikropartiküller silika materyalidir.

Örnek, enjektör yoluyla sisteme verilir ve stasyoner fazla kaplı kolon boyunca mobil faz ile itilir.

Bağlı faz (bonded-phase) kolon dolgu tekniği diğer kromatografik tekniklere göre (partisyon, adsorpsiyon, ion-exchange) avantajlıdır ve sık kullanılır. Bu teknik farklı fonksiyonel grupların silika jel gibi yüzey destek alanına kimyasal olarak bağlanmasıyla oluşur. Örnek komponentleri, hidrojen bağı, dipol-dipol etkileşim ve elektrostatik kuvvetlerle durağan faz ile etkileşirler.

Bağlı fazlı HPLC tekniğinin iki farklı şekli bulunur.

**1. Normal faz kromatografisi:** Stasyoner faz polar, mobil faz nonpolar, kaplama materyali polar özelliktedir ve hcxane-pentan gibi nonpolar solventler kullanılır. Kaplama materyallerinin çoğu silika jelden yapılır. Polar fonksiyonel gruplara örnek olarak amino ve nitril grupları verilebilir. Normal faz HPLC, alkaloidler, vitaminler, aminler, lipidler, terpenler ve yapısal izomerlerin ayrımında kullanılır.

**2. Ters faz (Reverse faz) kromatografisi:** Birçok farklı örnek tipi için kullanılabildiğinden HPLC'nin en yaygın kullanılan formudur. Nonpolar yapıda stasyoner faz, alkol su gibi polar yapıda mobil faz içerir. En popüler durağan faz silika partiküllerine bağlı oktadesilsilan molekülleri içeren C<sub>18</sub> tip kaplamadır (ODS kolon). Diğer ters faz kaplamalar yüzeye bağlanan oktil ve fenil grupları içerir. Kullanılan mobil fazlar, metanol, asetonitril gibi aköz solüsyonlardır.

Kolondan elüe olan komponent detektör tarafından saptanır ve örnek komponentin konsantrasyonu ile orantılı elektriksel sinyal oluşturulur. En sık kullanılan optik detektörlerdir. Işığı küçük volümlü flow-cell boyunca geçirirler. Örnek komponentlerinden kaynaklanan UV absorpsiyon, fluoresans emisyon veya refraktif indeksteki değişikliklere bağlı meydana gelen ışık şiddetindeki değişimler voltaj değişiklikleri olarak kaydedilir, retansiyon zamamı ve pik genişliği hesaplanır. Piklere karşılık gelen her bir örneğin konsantrasyonu internal veya eksternal standart çözeltiler kullanılarak hesaplanır.

**Detektör:** En sık kullanılan UV-Vis detektör olmakla birlikte fluoressan detektör, refraktif indeks detektörü, elektrokimyasal detektör diğer detektör çeşitleridir.

Optik detektörlerden en yaygını UV-Vis detektördür. Absorbe edilebilen komponentler için duyarlılığı yüksektir. Geniş bir aralıkta (190-750 nm) örnek tayini yapabilir. Proteinlerin, çeşitli enzimlerin (katalaz, üreaz, peroksidaz) ayrımında, hemoglobin türlerinin belirlenmesinde, aminoasid, fosfolipid, steroid hormonlar, tokoferol analizinde UV detektör kullanılabilir.

Fluoressan detektör sisteminde örnek komponenti flow-cell boyunca geçerken UV ışığı absorblar ve sonra emisyonla uğratar, emisyonla uğrayan ışığın şiddeti bir "photomultiplier" tüp ile ölçülür. Fluoressan detektörler optik detektörden daha özgül ve seçicidir, çok küçük miktardaki komponentleri ölçebilir. Aflatoksin, aminoasid, tokoferol analizinde kullanılabilir.

Refraktif indeks detektörü, örnek ve referans hücreler arasındaki refraktif indeks farklılığını ölçer. Ksiloz, fruktoz, sakkaroz, maltoz gibi ışığı kıran bileşikler, hidrokarbonlar, alkoller, eter gibi UV ışığı absorplamayan komponentler saptanabilir.

Elektrokimyasal detektör sisteminde numune sabit bir potansiyel ile elektrod üzerinde ya oksitlenir ya da indirgenir. Bir bileşiğin elektrokimyasal detektörle ölçülebilmesi için söz konusu potansiyelde elektroaktif olması gerekir. Üriner katekolaminler, doymamış yağ asitleri ve prostaglandinlerin bu tip detektörle analizi mümkündür.

HPLC'de piklerin oluşturduğu seri kromatogram olarak bilinir. Bir kromatogram örnek içindeki komponentlerin birbirinden ayrımı ile sonuçlanır. Rezolüzyon, ayırım derecesi olarak tanımlanır ve retansiyon farklılıklarının ortalama bant genişliğine bölünmesiyle elde edilir. Retansiyon zamanı, enjeksiyon işleminden elüe olan maddenin pikinin maksimum konsantrasyona erişmesine kadar geçen zamandır ve retansiyon ölçüsü kapasite faktörüdür ( $k'$ ). Rezolüsyonu etkileyen üç temel faktörden bir tanesi kapasite faktörüdür, diğer iki faktör selektivite ve iyi bir kolon performansdır.



Kapasite faktörü ( $k'$ ), durağan fazdaki solüt kitlesinin mobil fazdaki solüt kitlesine oranıdır. Diğer bir ifadeyle kolona bağlanan moleküllerin, bağlanmayan moleküllere oranıdır. İdeal bir ayırım için optimum kapasite faktör değerleri, 2-6 arasındadır.

Selektivite faktörü ( $\alpha$ ), rezolüsyonu belirlemede önemlidir. Bileşimdeki komponentlere ait piklerin nispi seperasyon ölçüsüdür ve iki komponentin kapasite faktörlerinin oranı olarak tanımlanır ( $\frac{k_2'}{k_1'}$ ). Ortam ısı ve mobil faz, durağan faz kompozisyonu selektiviteyi etkileyen faktörlerdir.

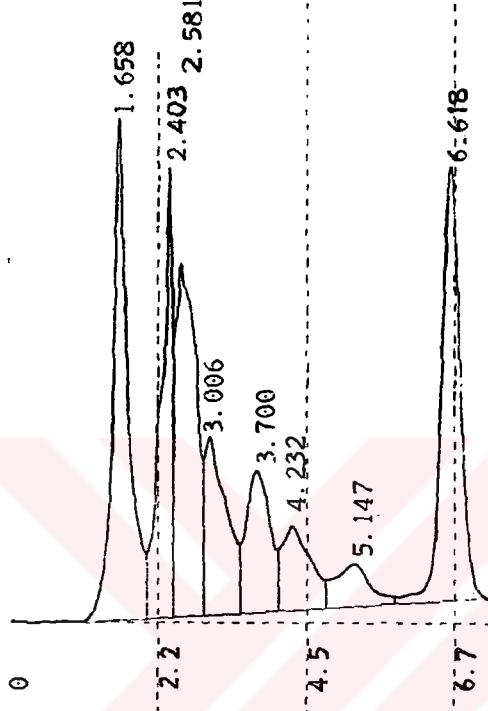
Kolon performansını etkileyen faktörler arasında, kolon dolgu materyalinin partikül çapı, mobil fazın akış hızı, kolon ısı ve solvent viskozitesi yer almaktadır.

Tüm bu koşulların optimize edildiği şartlarda HPLC biyomoleküllerin hızlı ayırım ve kantitasyonuna olanak sağlar.

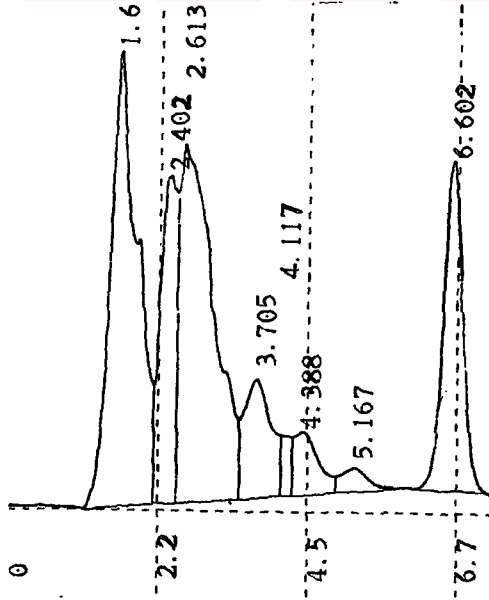


## HPLC Kromatogram örnekleri

Şekil 19'da simvastatin tedavisi öncesi, şekil 20'de iki ay günde 20mg simvastatin tedavisi sonrası yapılan ubikinon analizine ilişkin aynı kişiye ait HPLC kromatogram örnekleri verilmiştir.(6.7dk'ya karşılık gelen pik ubikinona aittir.)



Şekil. 19



Şekil.20

## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. CİHAZLAR

Cihaz	Model	Üretici Firma
HPLC cihazı	LC-6A	Shimadzu
Kolon	RP-18-5 $\mu$ m (125-4) mm	Merc
Detektör	SPD-6AV-UV	Shimadzu
Otoanalizör	Hitachi 747-200	Boehringer
İmmünosay analizör	Elecsys-2010	Boehringer
Santrifüj	2.0 RS	Heraus
Derin dondurucu	Sepatech	Shimadzu
Vorteks	37600	Thermolyne
SPE C <sub>18</sub> tüp 500 mg	204900	Altech
SPE silika tüp 100 mg	209000	Altech

### 3.2. KİMYASAL MADDELER

<b>Kimyasal Madde</b>	<b>Üretici Firma</b>	<b>Kat. No</b>
n-Hexane	Merc	104391
2- Propanol	Sigma	27,049-0
Metanol	Lab-Scan	C2517
Ubikinon standardı	Sigma	C9538
Triklorasetikasit (TCA)	Sigma	366-A
ATP standardı	Sigma	A5394

### 3.3. KULLANILAN KİTLER

<b>Kit</b>	<b>Firma</b>	<b>Kat. No.</b>
ATP	Sigma	366-A
Total Antioksidan Status	Randox	NX 2332
Trigliserid	Sigma	399-50
Kolesterol	Sigma	352-100
HDL Kolesterol	Sigma	354L-D
CK	Sigma	47-20
Myoglobin	Boehringer	18 20788

### 3.4. OLGULARIN SEÇİMİ, ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Çalışma grubu, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Polikliniğine ayaktan başvuran 40-65 yaşları arasında 7'si erkek 10'u kadın 17 hiperkolesterolemili kişiden oluşmaktadır. Yapılan tetkik ve muayeneler sonucunda bu kişiler sağlıklı olarak değerlendirilmiş olup, daha önceden kolesterol düşürücü tedavi almadıkları belirlendi.

Kontrol grubu kolesterol yüksekliği bulunmayan 40-65 yaşlar arası 15 sağlıklı kişiden oluşmaktadır. Kadın erkek oranı kontrol grubunda da aynı tutulmuştur.

Kontrol grubunun ve yüksek kolesterollü grubun (kolesterol düşürücü tedaviye başlanmadan önce) açlık venöz kan örnekleri K<sub>3</sub>-EDTA içeren tüplere alındı. Santrifüj sonrası plazma örnekleri çalışma zamanına kadar -70°C'de bekletildi (ubikinon çalışması için plazma örnekleri polypropylene tüplere alınarak saklandı). Kan ATP analizleri aynı gün içinde gerçekleştirildi. İki ay boyunca günde 20 mg simvastatin alan yüksek kolesterollü kişilerin bu süre sonunda tekrar açlık venöz kan örnekleri K<sub>3</sub>-EDTA içeren tüplere alınarak çalışma zamanına kadar plazma örnekleri -70°C'de saklandı. ATP analizleri aynı gün içinde gerçekleştirildi.

### 3.5. PLAZMA UBİKİNON ANALİZİ

Plazma ubikinon analizi HPLC (High-Performance Liquid Chromatography= Yüksek performanslı sıvı kromatografi) tekniği ile çalışıldı.

#### HPLC Çalışma Şartları

Shimadzu LC-6A model HPLC cihazı, UV-Vis SPD-6AV detektör, reverse faz C<sub>18</sub> 5µm (125mm x 4.6 mm) kolon kullanıldı. Mobil faz olarak 2-propanol:metanol (1:4) kullanıldı. Akım hızı 0.5 ml/dk olarak ayarlandı. 275 nm dalga boyunda çalışıldı.

**Yöntem**

Yöntem G-Grossi ve ark.dan modifiye edilerek alındı (25 )

**Plazma Ubikinon Ekstraksiyonu**

1 ml serum + 1 ml metanol + 4ml n-hexan karışımı 2000 g'de 10 dk santrifüj edildi.

↓  
Üstteki n-hexan fazının 3 ml'si bir tüpe alındı.

↓  
Tüpte kalan aköz faza 4 ml n-hexan eklendi ve 2000g'de 10 dk santrifüj ile ekstraksiyon işlemi tekrarlandı.

↓  
Üstte kalan n-hexan fazının 4ml'si daha önce ayrılan 3ml n-hexan fazının üzerine eklendi.

↓  
Toplam 7ml olan n-hexan fazı 100mg silika solid faz ekstraksiyon (SPE) kartuşundan geçirildi (kartuş bu işlemden önce 2 ml n-hexan ile aktive edildi)

↓  
7ml n-hexan fazının tamamı kartujdan geçirildikten sonra kartuş 2ml n-hexan ile yıkandı ve 380 mmHg vakum altında 1 dk kurutuldu.

↓  
0.5 ml metanol ile iki kez elüsyon yapıldı.

↓  
Toplanan metanol, silika 50mg C<sub>18</sub> SPE kartuşundan geçirildi. (Bu kartuş da önceden 2 ml metanol ile aktive edildi ve 2ml su ile dengelendi)

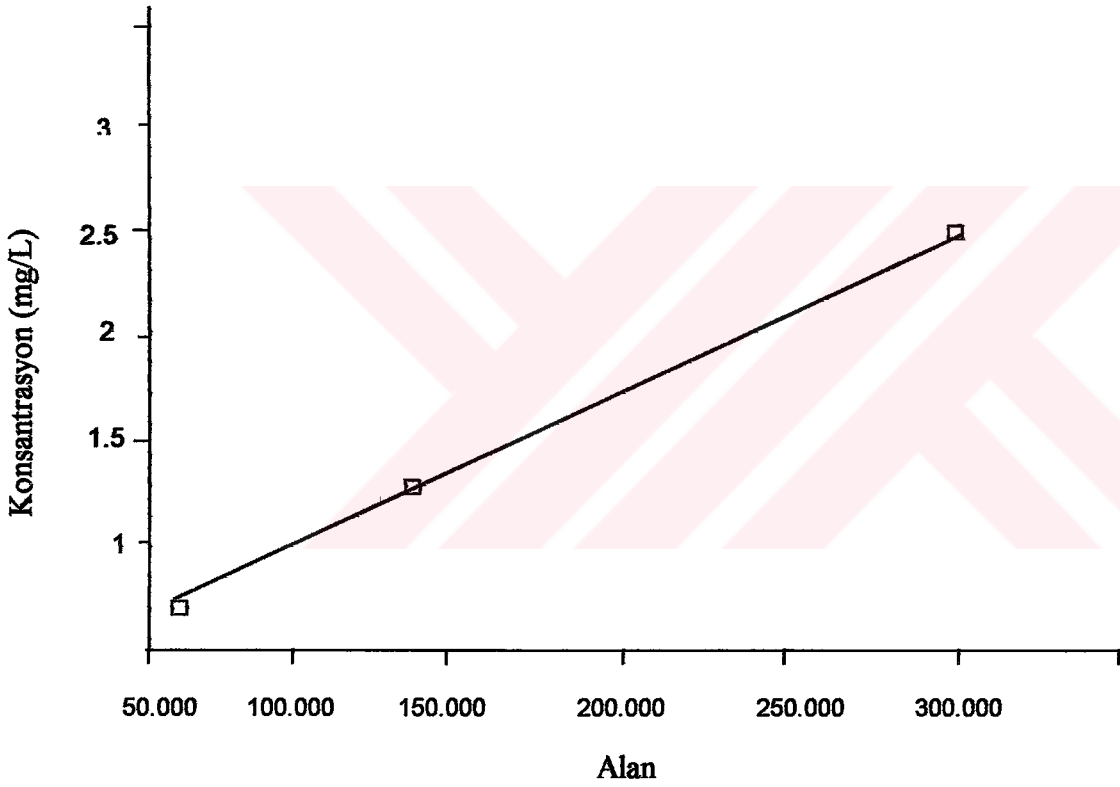
↓  
Daha sonra kartuş 1.5 ml metanol ile yıkandı. Bu aşamadan sonra elüsyon aşamasına geçildi.

↓  
0.15 ml propanol ile 2 kez elüsyon yapıldı.

Elüe edilen materyalin 50µ/lt'si HPLC'ye enjekte edildi.

### Standartların Hazırlanması

25 mg ubikinon (koenzim Q<sub>10</sub>) standardı 250 ml n-hexan içinde çözülerek 100 mg/L'lik stok standart çözeltisi hazırlandı. Daha sonra 100 mg/L'lik ana stok çözeltiden 1ml alınıp 9 ml n-hexan eklenerek 10 mg/L'lik ara stok standart çözeltisi hazırlandı. 10 mg/L'lik standart çözeltisinin 3 farklı dilüsyonu yapılarak, 0.625, 1.25, 2.5 mg/L'lik standart çözeltiler elde edildi. Bu çözeltilerin her birinden 1ml alınarak ekstraksiyon işlemi uygulandı ve standartların HPLC cihazına enjeksiyonuyla kalibrasyon grafiği elde edildi (Şekil 17).



Şekil 17: Plazma ubikinon analizinde kalibrasyon eğrisi örneği.



### 3.6. KAN ATP ANALİZİ

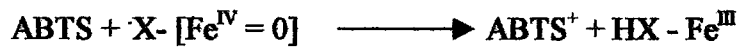
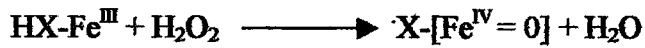
ATP düzeyi Sigma Diagnostics kiti ile tayin edildi. Kan ATP analizi aynı gün içinde yapıldı. Kanın %12'lik triklorasetik asit (TCA) solüsyonu ile deproteinizasyon işleminin ardından fosfogliseratkinaz (PGK) ve gliseraldehid fosfat dehidrojenaz (GAPD) enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlarla NADH'nin NAD'ye oksitlenmesine bağlı azalan absorpsiyon 340 nm de ölçülerek ATP değerleri hesaplandı.



### 3.7. DİĞER PLAZMA ANALİZLERİ

#### 3.7.1. Plazma Total Antioksidan Kapasite Ölçüm Yöntemi

Plazma total antioksidan kapasitesi Randox total antioksidan status kiti ile ABTS (Azino-diethyl-benzthiazoline sulphate) metoduyla çalışıldı. Bu metod ABTS'nin  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve peroksidaz (metmyoglobin-HX- $\text{Fe}^{\text{III}}$ ) ile inkübasyonu sonucu oluşan radikal kationun ( $\text{ABTS}^+$ ) verdiği mavi rengin 600 nm'de ölçümüne dayalıdır. Renk şiddetinde plazmada bulunan antioksidanların konsantrasyonlarıyla orantılı değişiklik oluşmaktadır.



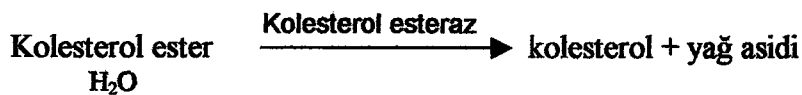
### 3.7.2. Trigliserid Ölçüm Yöntemi

Trigliseridin lipoprotein lipaz tarafından gliserol ve yağ asidine dönüşümünü izleyen, gliserol kinaz, gliserol fosfat oksidaz ve peroksidaz enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlarla trigliserid ölçümü enzimatik olarak gerçekleştirildi.



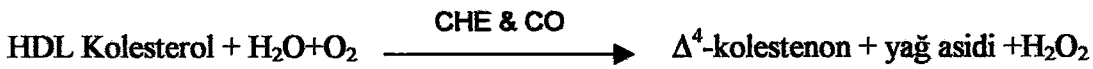
### 3.7.3. Kolesterol Ölçüm Yöntemi

Kolesterol düzeyi, kolesterol esteraz, kolesterol oksidaz ve peroksidaz enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlarla enzimatik olarak tayin edildi.



### 3.7.4. HDL Kolesterol Ölçüm Yöntemi

HDL kolesterol ölçümü  $\beta$  lipoprotein antikorlarıyla HDL Kolesterol ve LDL Kolesterol ve şilomikronların reaksiyonu sonucu oluşan antijen antikor kompleksini izleyen kolesterol esteraz (CHE), kolesterol oksidaz (CO) ve peroksidaz (POD) enzimlerinin katalizlediği tepkimeler ile enzimatik olarak gerçekleştirildi.



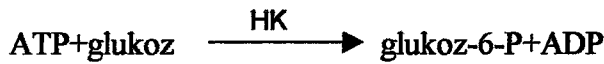
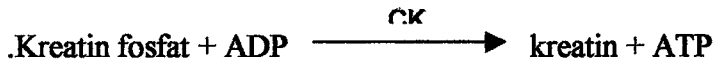
### 3.7.5. LDL Kolesterol Ölçüm Yöntemi

LDL kolesterol Friedewald formülüyle hesaplandı:

$$\text{LDL kolesterol} = \text{Total kolesterol} - (\text{HDL kolesterol}) - \text{Trigliserid}/5$$

### 3.7.6. CK Ölçüm Yöntemi

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



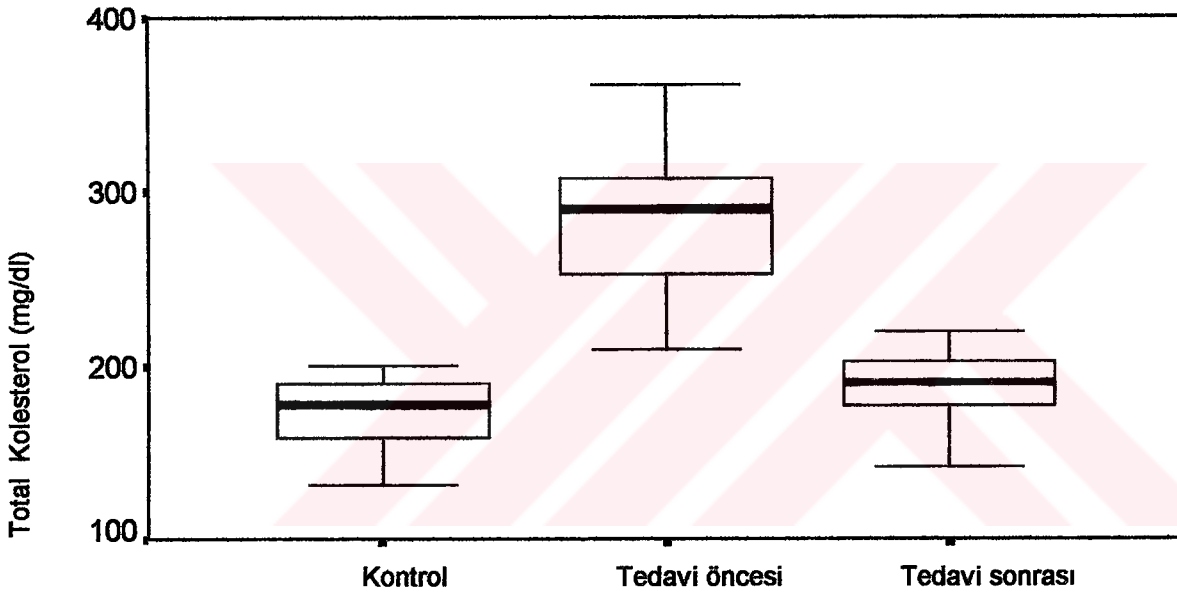
### 3.7.7. Myoglobin Ölçüm Yöntemi:

Plazma myoglobin analizi immünokimyasal teknikle Elecsys immünoassay otoanalizöründe myoglobin kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

### 3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Gruplar arası farklılıklar, kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda, t testi (independent samples t test), tedavi öncesi ve tedavi sonrası grubun karşılaştırmalarında wilcoxon testi (wilcoxon signed ranks test) ile, korelasyonlar “Pearson” korelasyon analizi ile SPSS for MS Windows 6.0 Programı kullanılarak değerlendirildi.

Sonuçların grafik ile gösterilmesinde “Box-plot” grafiği kullanıldı. Bu grafiğin yorumlanması aşağıda örnekle açıklanmıştır.



**Şekil 21:** “Box-plot” grafiğinde olguların dağılımı gösterilmekte olup; kutunun alt sınırı 25. persentili, kutunun üst sınırı 75. persentili, kutunun yüksekliği çeyrekler arası (interquartile range), kutunun içindeki yatay çizgi ise “median”ı göstermektedir. Kutunun ortasından geçen ve kutuya dik olan çizgiler ise minimum ve maksimum değerleri göstermektedir. “Box-plot” grafiğinde “median” merkezi eğilim hakkında; kutunun yüksekliği ise dağılım hakkında bilgi verir.

## DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

### 4. BULGULAR

#### 4.1. Kontrol Grubunun Bulguları

**Tablo 5:** Kontrol grubunun bulguları

Test No	Trigliserid (mg/dl)	Kolesterol (mg/dl)	HDL Kolesterol (mg/dl)	LDL Kolesterol (mg/dl)
1	99	157	57	85
2	105	143	53	69
3	58	181	55	114
4	105	200	52	140
5	132	188	37	125
6	114	159	35	101
7	69	132	38	80
8	213	176	39	94
9	61	178	50	116
10	117	158	35	103
11	203	188	41	106
12	75	192	51	126
13	94	200	49	134
14	128	195	57	118
15	84	162	38	107

**Tablo 5:** Devamı

Test no	Ubikinon (mg/L)	Total Anti ok. Status (mmol/L)	ATP ( $\mu$ mol/L)
1	0.5	1.2	58.5
2	0.7	1.1	58.8
3	0.5	1.0	54.4
4	0.6	1.1	59.8
5	0.8	1.1	59.4
6	0.6	1.0	54.6
7	0.6	1.2	59.4
8	0.5	1.3	54.6
9	0.7	1.4	57.1
10	0.6	1.0	55.2
11	0.6	1.2	55.8
12	0.6	0.9	57.5
13	0.6	0.9	60.6
14	0.8	1.1	56.1
15	0.6	1.3	59.0

#### 4.2. Tedavi öncesi grubun bulguları

**Tablo 6:** Tedavi öncesi grubun bulguları

Test No	Trigliserid (mg/dl)	Kolesterol (mg/dl)	HDL Kolesterol (mg/dl)	LDL Kolesterol (mg/dl)
1	116	241	46	172
2	225	218	44	155
3	231	260	37	177
4	160	290	61	197
5	278	333	54	223
6	285	253	40	186
7	170	297	55	208
8	238	298	40	210
9	203	261	60	146
10	132	232	50	156
11	399	362	49	217
12	168	254	53	287
13	90	209	37	154
14	303	327	50	216
15	390	308	35	196
16	147	292	55	208
17	332	329	52	211

**Tablo 6:** Devamı

Test no	Ubikinon (mg/L)	Total Anti ok. Status (mmol/L)	ATP ( $\mu$ mol/L)	Myoglobin (ng/ml)	CK (U/L)
1	0.9	1.2	58.1	45.22	78
2	1.1	1.3	50.6	54.07	101
3	1.5	1.5	59.3	36.23	76
4	1.5	0.9	47.3	36.28	83
5	1.2	1.8	58.3	29.96	45
6	1.7	1.6	54.9	40.79	56
7	1.1	1.6	46.0	33.97	104
8	0.9	1.3	63.3	49.61	165
9	0.8	1.7	45.2	33.96	76
10	1.2	1.2	48.3	39.52	63
11	1.7	1.2	65.2	26.77	61
12	1.5	1.6	49.2	40.17	80
13	0.9	1.4	66.4	44.62	92
14	1.0	1.1	43.0	31.25	65
15	1.5	0.9	47.1	48.53	231
16	1.6	1.0	57.1	36.99	119
17	1.7	1.0	62.8	30.73	79



### 4.3. Tedavi sonrası grubun bulguları

**Tablo 7:** Tedavi sonrası grubun bulguları

Test No	Trigliserid (mg/dl)	Kolesterol (mg/dl)	HDL Kolesterol (mg/dl)	LDL Kolesterol (mg/dl)
1	102	190	36	134
2	217	190	53	94
3	108	197	43	130
4	125	196	56	115
5	193	220	62	119
6	140	162	45	89
7	104	180	56	103
8	185	177	32	108
9	182	183	55	92
10	77	142	49	78
11	257	192	43	98
12	128	203	57	120
13	65	176	59	104
14	225	310	74	191
15	82	171	50	105
16	122	215	69	122
17	290	275	50	175

**Tablo 7 Devamı.**

Test no	Ubikinon (mg/L)	Total Anti Oksidan Kapasite (mmol/L)	ATP ( $\mu$ mol/L)	Myoglobin (ng/ml)	CK (U/L)
1	0.6	0.7	44.6	57.33	138
2	0.8	1.4	60.2	57.98	185
3	0.8	1.1	43.5	56.23	102
4	0.6	1.5	64.7	45.22	90
5	0.8	1.6	48.3	32.36	48
6	1.4	1.0	55.0	45.77	93
7	0.6	1.2	57.3	48.07	207
8	0.7	0.9	59.0	80.54	247
9	0.7	1.3	54.6	35.24	82
10	0.7	0.7	60.8	73.89	233
11	1.5	0.9	54.9	37.40	62
12	1.0	1.0	71.1	55.52	123
13	0.7	0.9	45.0	51.96	157
14	0.6	1.3	55.0	45.40	106
15	1.2	0.8	54.7	94.42	1407
16	1.2	0.7	54.7	53.63	146
17	1.4	0.6	57.1	69.87	118

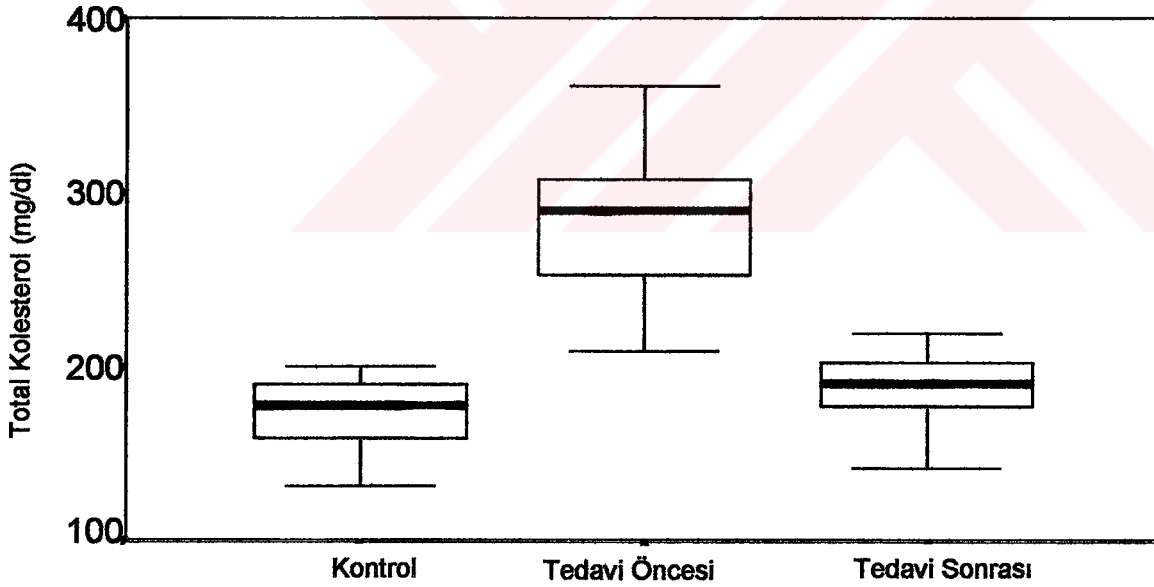
#### 4.4. Kontrol, Tedavi Öncesi, Tedavi Sonrası Grupların Karşılaştırılması

##### 4.4.1. Kolesterol Değerlerinin Karşılaştırılması

Plazma kolesterol düzeyleri tedavi öncesi grupta tedavi sonrasına göre ( $p=0.0003$ ) ve kontrol grubuna göre ( $p=0.0003$ ) yüksek, tedavi sonrası plazma kolesterol değerleri kontrol grubuna göre yüksek ( $p=0.041$ ) olup fark anlamlıdır.

**Tablo 9:** Plazma kolesterol değerleri (mg/dl)

Gruplar	Olgu sayısı	Ortalama	Range	SD
Kontrol	n=15	173.93	132-200	21.07
Tedavi Öncesi	n=17	280.23	209-362	43.77
Tedavi Sonrası	n=17	198.76	142-310	40.36



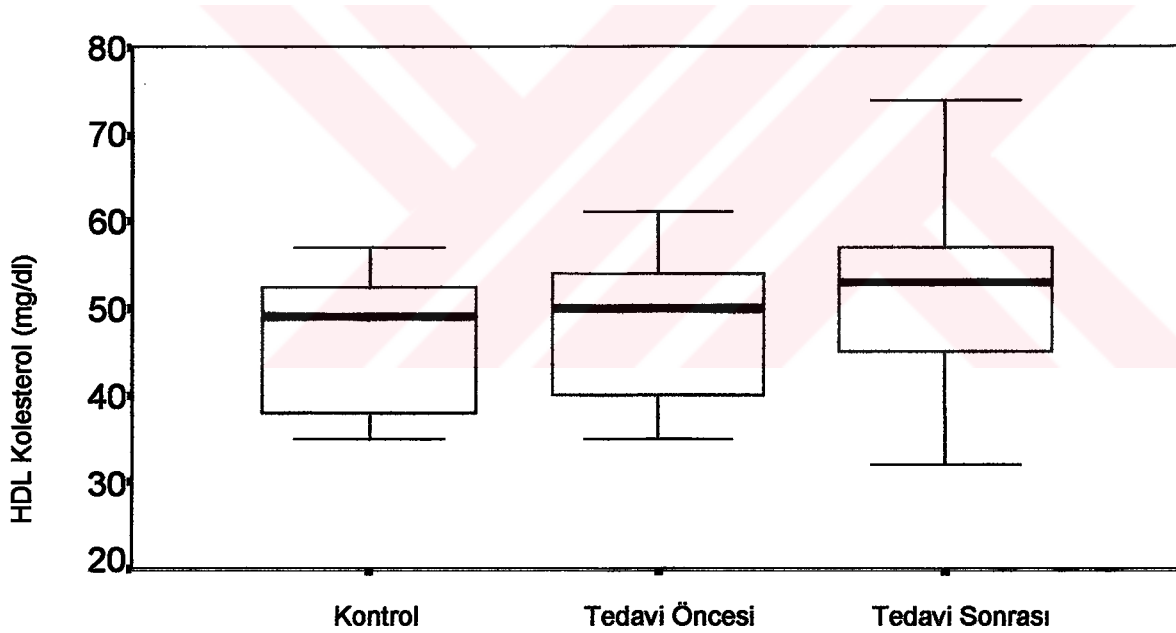
**Şekil 22:** Kontrol ve tedavi gruplarında plazma kolesterol düzeyleri.

#### 4.4.2. HDL Kolesterol Değerlerinin Karşılaştırılması

Tedavi gruplarında ve kontrol grubunda yapılan analizlerde tedavi sonrası grupta HDL kolesterol değerleri ortalaması tedavi öncesine göre yükselmekle birlikte istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık saptanamamıştır.

**Tablo 9:** HDL kolesterol değerleri (mg/dl)

Gruplar	Olgu sayısı	Ortalama	Range	SD
Kontrol	n=15	45.80	35-57	8.37
Tedavi Öncesi	n=17	48.11	35-61	8.12
Tedavi Sonrası	n=17	52.29	32-74	10.81



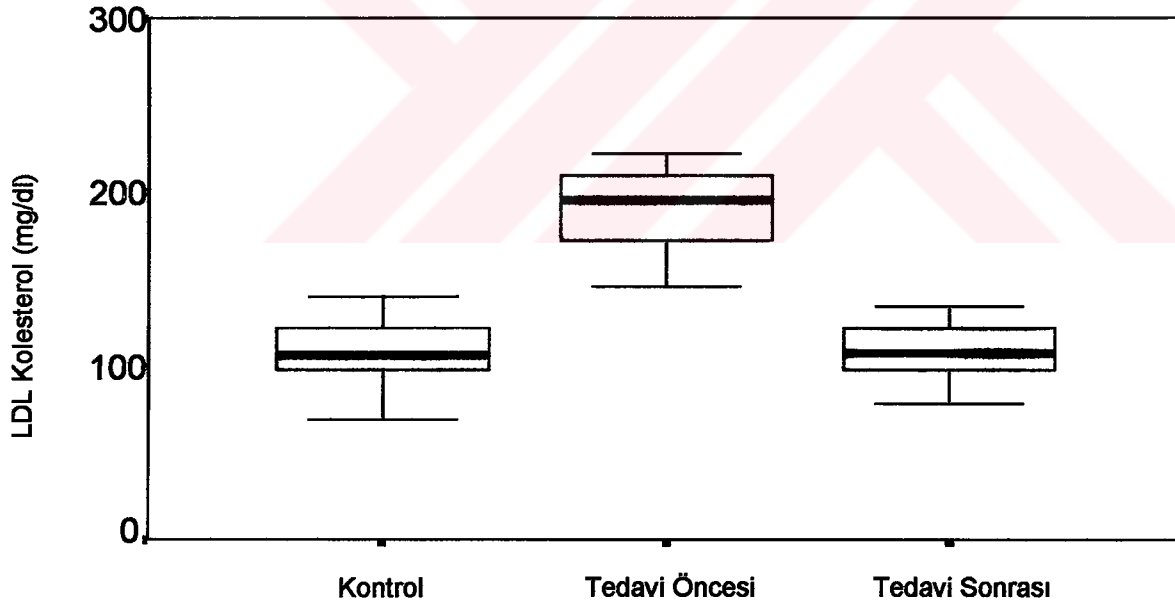
**Şekil 23:** Kontrol ve tedavi gruplarında plazma HDL kolesterol düzeyleri.

#### 4.4.3. LDL Kolesterol Değerlerinin Karşılaştırılması

Yapılan plazma LDL kolesterol analizlerinde tedavi öncesi grubun LDL kolesterol değerleri, tedavi sonrası gruba ( $p=0.0003$ ) ve kontrol grubuna göre ( $p=0.000$ ) anlamlı yüksek bulunmuştur. Kontrol grubu ve tedavi sonrası grup arasında anlamlı farklılık saptanamamıştır.

**Tablo 10:** LDL kolesterol değerleri (mg/dl)

Gruplar	Olgu sayısı	Ortalama	Range	SD
Kontrol	n=15	107.86	69-140	20.03
Tedavi Öncesi	n=17	189.35	146-223	25.23
Tedavi Sonrası	n=17	116.26	78-191	29.30



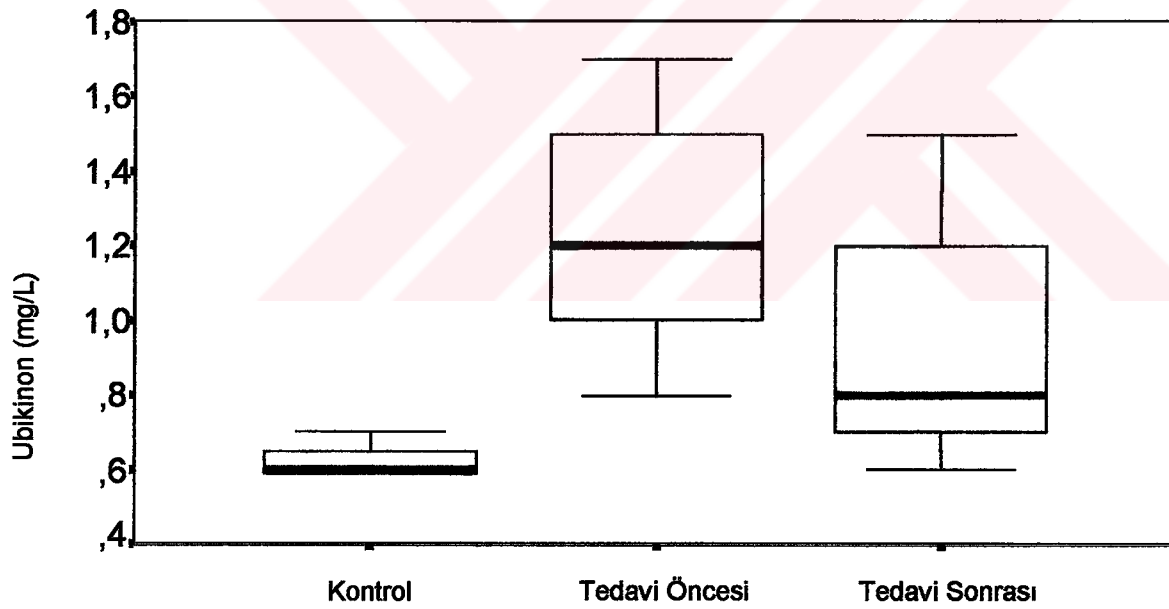
**Şekil 24:** Kontrol ve tedavi gruplarında plazma LDL kolesterol düzeyleri.

#### 4.4.4. Ubikinon Değerlerinin Karşılaştırılması

Plazma ubikinon değerleri tedavi öncesi grupta tedavi sonrasına göre yüksek olup aradaki fark anlamlıdır ( $p=0.0003$ ), tedavi öncesi ( $p=0.000$ ) ve tedavi sonrası ( $p=0.002$ ) grubun kontrol grubu ile yapılan karşılaştırılmasında her iki grupta kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur.

**Tablo 11:** Ubikinon değerleri (mg/L).

Gruplar	Olgu sayısı	Ortalama	Range	SD
Kontrol	n=15	0.62	0.5-0.8	0.09
Tedavi Öncesi	n=17	1.28	0.8-1.7	0.32
Tedavi Sonrası	n=17	0.90	0.6-1.5	0.31



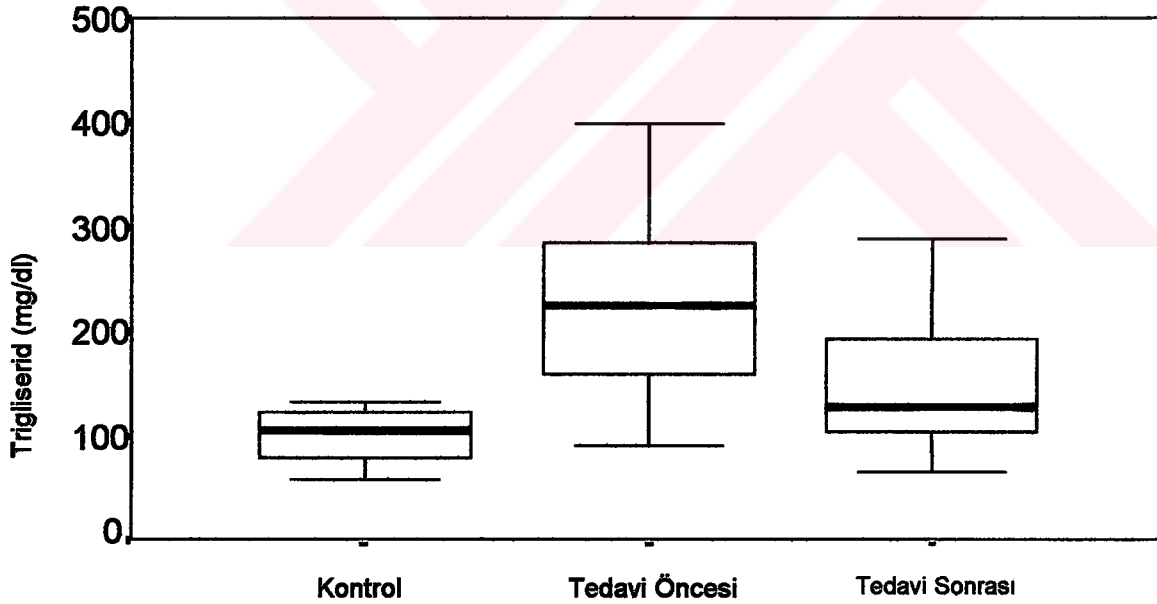
**Şekil 25:** Kontrol ve tedavi gruplarında plazma ubikinon düzeyleri.

#### 4.4.5. Trigliserid Değerlerinin Karşılaştırılması

Tedavi öncesi ve tedavi sonrası grubun kendi aralarında yapılan plazma trigliserid düzeyleri karşılaştırmasında, tedavi öncesi grup tedavi sonrası gruba göre yüksek bulunmuştur ( $p=0.0003$ ). Her iki grubun kontrol grubuyla yapılan karşılaştırılmasında ise hem tedavi öncesi ( $p=0.009$ ) hem de tedavi sonrası ( $p=0.042$ ) grup kontrol grubuna göre yüksek olup aradaki fark anlamlıdır.

**Tablo 12:** Trigliserid değerleri (mg/dl).

Gruplar	Olgu Sayısı	Ortalama	Range	SD
Kontrol	n=15	110.46	58-213	45.70
Tedavi Öncesi	n=17	227.47	90-399	92.65
Tedavi Sonrası	n=17	153.05	65-290	66.35



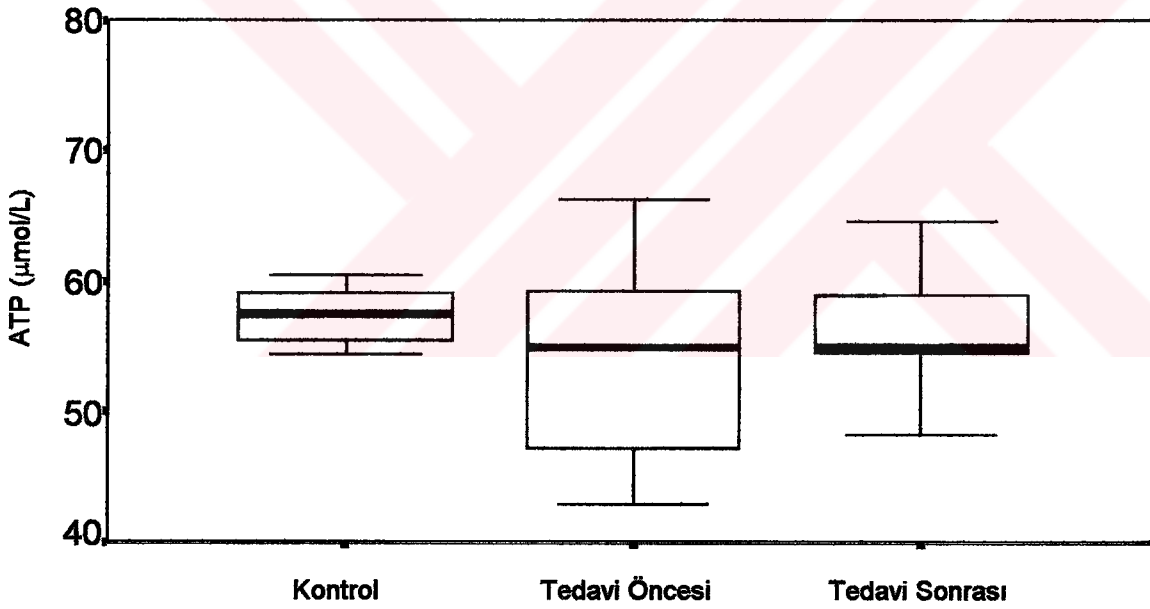
**Şekil 26:** Kontrol ve tedavi gruplarında plazma trigliserid düzeyleri.

#### 4.4.6. ATP Değerlerinin Karşılaştırılması

Kontrol, tedavi öncesi ve tedavi sonrası grupların kendi aralarında yapılan karşılaştırmalarda kan ATP değerleri açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır.

**Tablo 13:** ATP değerleri ( $\mu\text{mol/L}$ )

Gruplar	Olgu sayısı	Ortalama	Range	SD
Kontrol	n=15	57.38	55.2-60.6	2.13
Tedavi Öncesi	n=17	54.24	43.0-66.4	7.65
Tedavi Sonrası	n=17	55.32	43.5-71.1	7.17



**Şekil 27:** Kontrol ve tedavi gruplarında kan ATP düzeyleri.

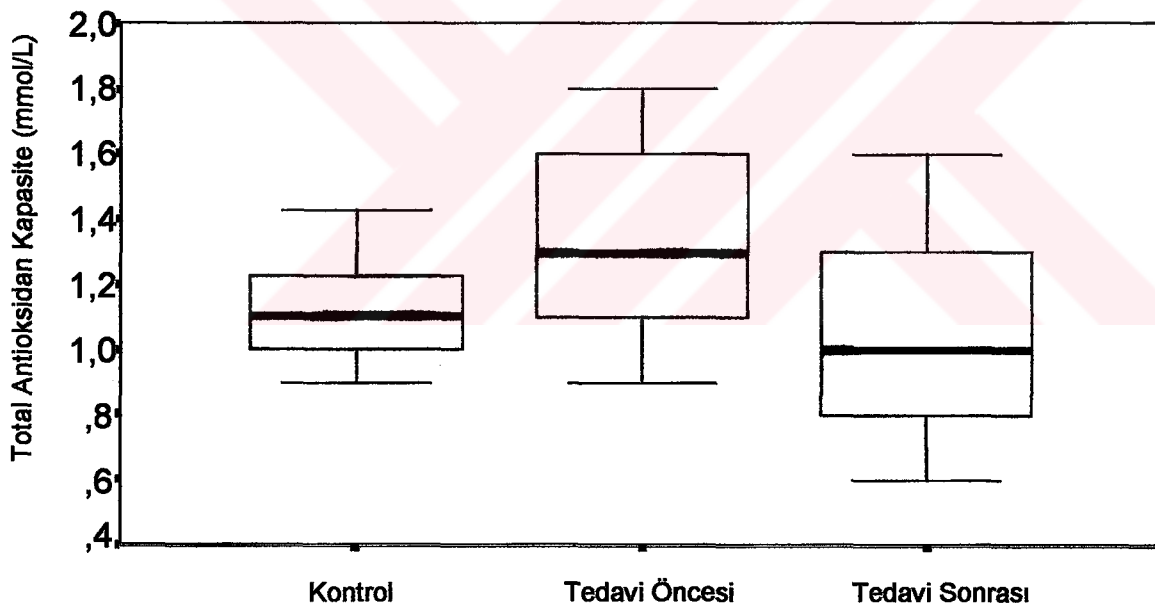


#### 4.4.7. Total Antioksidan Kapasite Değerlerinin Karşılaştırılması

Yapılan plazma total antioksidan kapasite analizinde tedavi öncesi grup tedavi sonrasına ( $p=0.0086$ ) ve kontrol grubuna ( $p=0.030$ ) göre yüksek bulunmuştur. Tedavi sonrası grupla kontrol grubu arasında anlamlı farklılık saptanamamıştır.

**Tablo 14:** Total antioksidan kapasite değerleri (mmol/L)

Gruplar	Olgu sayısı	Ortalama	Range	SD
Kontrol	n=15	1.12	0.9-1.4	0.15
Tedavi Öncesi	n=17	1.31	0.9-1.8	0.28
Tedavi Sonrası	n=17	1.03	0.6-1.6	0.30



**Şekil 28:** Kontrol ve tedavi gruplarında plazma total antioksidan kapasite düzeyleri.

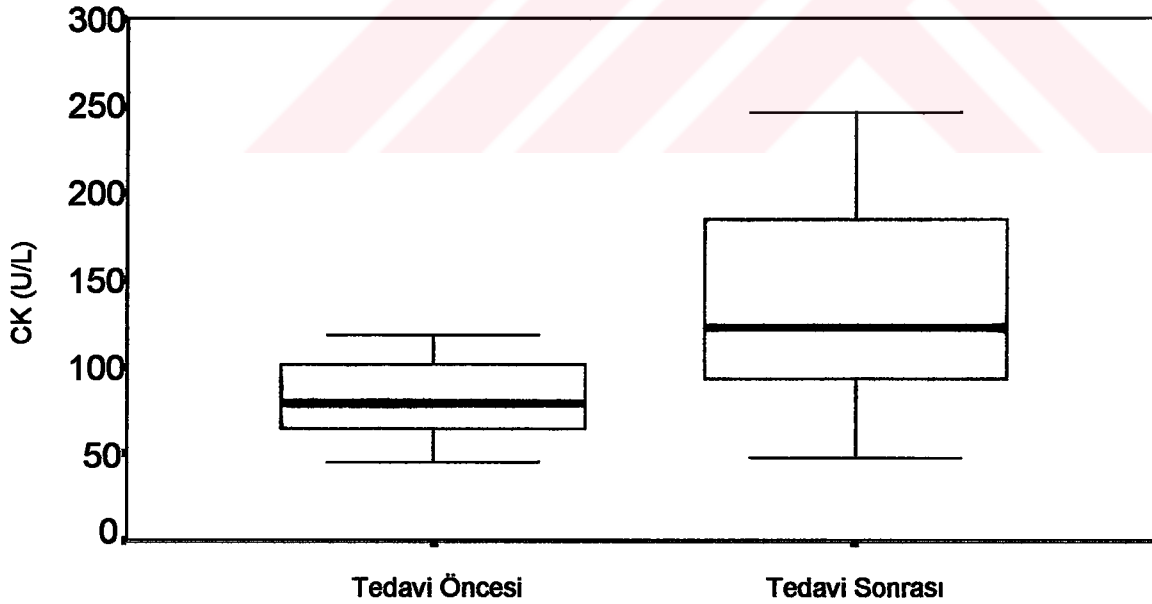
#### 4.4.8. CK Değerlerinin Karşılaştırılması

Yapılan plazma CK analizlerinde tedavi sonrası değerler, tedavi öncesi değerlere göre yüksek olup aradaki fark anlamlıdır ( $p=0.0003$ ). CK karşılaştırılması sadece tedavi öncesi ve tedavi sonrası gruplar arasında yapılmıştır.

**Tablo 15:** CK değerleri (U/L).

Gruplar	Olgu sayısı	Ortalama	Ortanca	Range	SD	SE
Tedavi Öncesi	n=17	92.58	79.0	45-231	45.23	10.94
Tedavi Sonrası	n=17	208.47	123.0	48-1407	314.09	76.18

Tedavi sonrası gruptaki hastalardan bir tanesinde aşırı CK yüksekliği saptandığı için bu grupta ortalama, ortanca, SD, SE değerlerinin bir arada verilmesi uygun bulunmuştur. CK yüksekliği olan bu hasta grup dışı bırakıldığında, tedavi sonrası grubun ortalaması 113.5 U/L olup, tedavi öncesi grupla aradaki fark anlamlılığını korumaktadır ( $p=0.0004$ ).



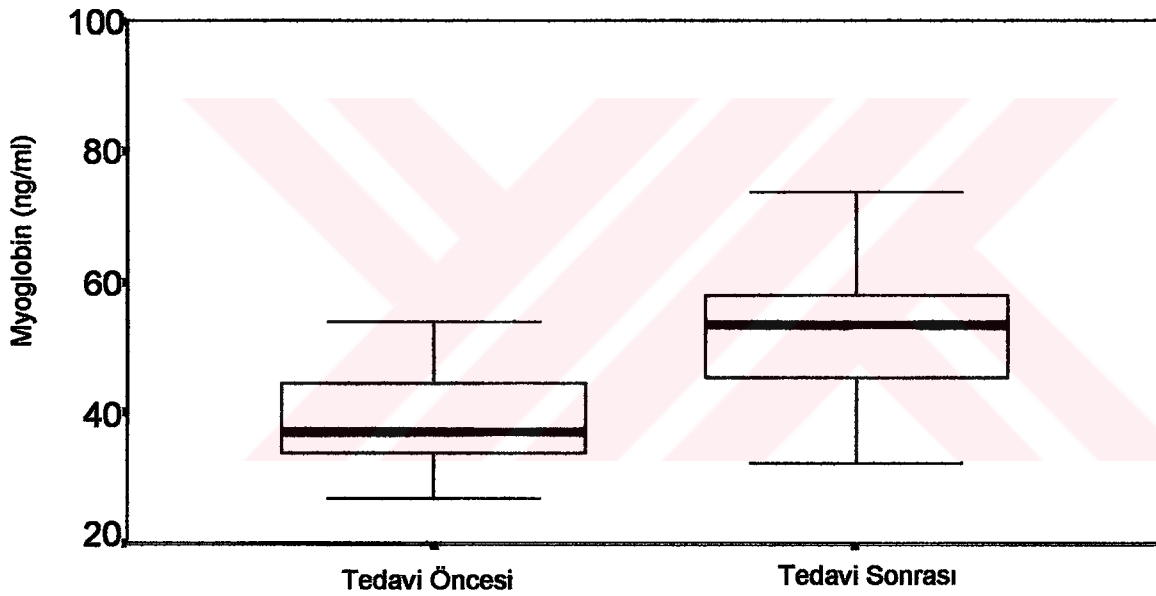
**Şekil 29:** Tedavi öncesi ve tedavi sonrası grupların plazma CK düzeyleri.

#### 4.4.9. Myoglobin Değerlerinin Karşılaştırılması

Plazma myoglobin düzeylerinin karşılaştırması sadece tedavi öncesi ve tedavi sonrası gruplar arasında yapılmıştır. Tedavi sonrası grubun plazma myoglobin değerleri tedavi öncesine göre anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p=0.0003$ ).

**Tablo 16:** Myoglobin değerleri (ng/ml).

Gruplar	Olgu sayısı	Ortalama	Range	SD
Tedavi Öncesi	n=17	38.74	33.96-54.07	7.64
Tedavi Sonrası	n=17	55.34	32.36-94.42	16.47



**Şekil 30:** Tedavi öncesi ve tedavi sonrası gruplarda plazma myoglobin düzeyleri.

Ayrıca çalışma grubu içinde yapılan korelasyon analizinde:

- Tedavi öncesi ( $r=0.5809$ ) ve tedavi sonrası ( $r=0.7139$ ) gruplarda CK ve myoglobin değerleri arasında pozitif korelasyon,
- Tedavi sonrası total antioksidan kapasite ve myoglobin değerleri arasında negatif korelasyon ( $r=-0.5969$ ) saptanmıştır.

## BEŞİNCİ BÖLÜM

### 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

HMG CoA redüktaz inhibitörleri, hiperkolesterolemi tedavisinde yaygın kullanıma sahiptir (16,24). Bu ilaç grubunun kolesterol düşürücü etki ile aterogenez üzerindeki olumlu etkisinin yanı sıra, tedavi edilen gruplarda myopati, görme bozukluğu, karaciğer hasarı, periodontal hastalıklar gibi yan etkilerinin ortaya çıktığı (15,34,72) ve nonkardiyovasküler mortalitede artış olduğu yapılan çeşitli yayınlarda ileri sürülmüştür (9). Total mortalite de anlamlı bir azalma sağlanamaması nedeniyle, kolesterol düşürücü tedavi tartışmaya değer bir konu olarak görülmektedir.

Yapılan çalışmalar, HMG CoA redüktaz inhibitörlerinin kolesterolü düşürürken çeşitli hücrel fonksiyonlar için önemli olan izoprenoidlerin sentezinden sorumlu olan mevalonatu baskılayarak serum ubikinon düzeylerinde de düşüklüğe yol açtığını ortaya koymuş ve bu ilaç grubunun bazı yan etkilerinden ubikinon düzeylerindeki düşüklüğü sorumlu tutmuştur (42,58).

Bu düşüncelerin ışığı altında bizim çalışmamızda şu soruların cevapları bulunmaya çalışılmıştır:

- Kolesterol yüksekliği nedeniyle 2 ay boyunca günde 20 mg HMG CoA redüktaz inhibitörü kullanan kişilerde tedavi öncesine göre serum ubikinon düzeyleri ne kadar değişmektedir?
- Bir yandan hücrel enerjinin sağlanması ve korunmasında rol alırken diğer yandan antioksidan özelliğe sahip ubikinonun olası eksikliğinin kan ATP düzeyi ve total antioksidan kapasite üzerine etkisi nasıldır ?
- Myopati, simvastatin kullanan hastalarda görülebilen bir yan etkidir. Bizim çalışma grubumuzda kas hasarının göstergeleri olan plazma CK ve myoglobin düzeyleri nasıl etkilenmiştir?

Bu plan çerçevesinde kolesterol yüksekliği nedeniyle 2 ay günde 20 mg HMG CoA redüktaz inhibitörü kullanan kişilerde tedavi öncesi ve tedavi sonrasında, ayrıca kontrol grubunda, plazma ubikinon, total kolesterol, HDL kolesterol, LDL kolesterol, trigliserid analizleri, ayrıca plazma total antioksidan kapasite ve kan ATP analizleri yapıldı.

Ubikinon çalışması ile ilgili olarak yayınlarda, kan örneklerinin ekstraksiyon sonrasında HPLC enjeksiyonundan önce bir iki gün saklanabileceği bildirilmesine rağmen (25), bizim yaptığımız denemeler bekleyen örneklerde olasılıkla ubikinonun moleköl yapısındaki bozulmaya bağlı, pik genişliğinin arttığını ve sağlıklı kantitatif sonuçların alınamayacağını gösterdi. Bu gözlemimiz sonucunda yapılan ekstraksiyon işleminin ardından aynı gün içinde HPLC enjeksiyonlarımızı gerçekleştirdik.

ATP analizi sırasında örnekleri deproteinize ettikten sonra hemen yaptığımız çalışmayı, deproteinize edilen örnekleri  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat beklettikten sonra yapılan çalışmayla karşılaştırdığımızda, bekletilen grupta %5-10'luk bir düşüş tespit ettik. Bu nedenle kan alındıktan hemen sonra yapılan deproteinizasyon sonrası aynı gün kan ATP analizleri gerçekleştirildi.

Yapılan total kolesterol ve LDL kolesterol analizlerinde iki ay günde 20 mg simvastatin tedavisi ile hem total kolesterol ( $p=0.0003$ ) hem de LDL kolesterol ( $p=0.0003$ ) değerlerinde bu grup ilaçların güçlü kolesterol düşürücü etkisini savunan diğer çalışmalarda da olduğu gibi (16,60), tedavi öncesine göre anlamlı düşme saptanmıştır.

Plazma ubikinon değerleri tedavi sonrası grupta tedavi öncesine göre anlamlı düşük bulunmakla birlikte ( $p=0.003$ ), hem tedavi öncesi ( $p=0.000$ ), hem tedavi sonrası ( $p=0.002$ ) grupların kontrol grupları ile yapılan karşılaştırılmalarında, her iki grupta kontrole göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Bu bulgular, kolesterol yüksekliği bulunan kişilerde ubikinon değerlerinin normal kolesterol değerlerine sahip olanlara göre yüksek olduğu ve HMG CoA redüktaz inhibitörlerinin mevalonat sentezini baskılayarak ubikinon sentezini azalttığı konusundaki yayınları doğrulamaktadır (35,70) .

Bizim bulgularımızla da doğrulanan ve bir çok yayında belirtilen simvastatin kullanımına bağlı oluşan ubikinon düzeyindeki düşüşün, ubikinonun mitokondrial elektron transport zincirindeki rolü nedeniyle kan ATP düzeyini nasıl etkilediğini araştırdık.

Yapılan bir çalışmada 6 ay boyunca günde 20 mg simvastatin alan hiperkolesterolemik hastalarda, doku ATP düzeyinin tedavi sonrası değişmediği belirtilmiştir (36). Bölümümüzde yapılan bir tez çalışmasında ise simvastatin verilen ratlarda kan ATP düzeylerinde kontrole göre anlamlı düşme tespit edilirken doku ATP düzeylerinde anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir (10). Bu çalışmanın ratlarda yapılan bir çalışma olması ve 10 mg/kg/gün gibi yüksek dozda ilaç uygulanmasının kan ATP düzeyini düşürdüğünü düşünüyoruz.

Bizim çalışmamızda, iki ay boyunca günde 20 mg simvastatin kullanan yüksek kolesterolü kişilerin ATP değerlerinde, tedavi öncesi ve tedavi sonrası grupların kendi aralarında ve kontrol gruplarıyla yapılan karşılaştırılmasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptayamadık. Bu sonuçlar canlılığın sürdürülmesinde zorunlu olan hücresel enerjinin korunmasında metabolizmanın başarılı olduğunu, günde 20 mg 2 ay süre ile simvastatin kullanımı ile ubikinon düzeyinde görülen düşüklüğün bu dengeyi bozmadığını göstermektedir.

Ubikinon bir yandan oksidatif fosforilasyonun bir komponenti olarak görev alırken, diğer yandan redükte formu ubikinolün biyolojik membranlarda invitro ve invivo lipid peroksidasyonunu inhibe ederek antioksidan rol oynadığı gösterilmiştir (13,14,67). Ayrıca ubikinon elektron transport zincirinde serbest radikal uzaklaştırıcı etkiye de sahiptir. Biz bu bilgilerin ışığı altında simvastatin alan hasta grubunda görülen ubikinon düzeyindeki düşmenin, plazma total antioksidan kapasite düzeyini ne derece etkilediğini ölçmek istedik. Yapılan analizde, tedavi öncesi grubun total antioksidan kapasite düzeyi kontrol grubuna ( $p=0.030$ ) ve tedavi sonrası gruba göre ( $p=0.0086$ ) anlamlı yüksek bulunurken, kontrol grubunun tedavi sonrası gruba arasında farklılık saptanamadı. Ayrıca tedavi sonrası grupta myogloblin değerleri ile total antioksidan kapasite değerleri arasında ters yönde bir korelasyon saptandı ( $r=-0.59$ ).

Bu sonuçlar, tedavi sonrasında ubikinon düzeylerinde de anlamlı bir düşme olduğunu göz önüne aldığımızda, ubikinon düzeylerindeki düşmenin total antioksidan kapasitede de düşmeye yol açmış olabileceğini düşündürmektedir. Tedavi öncesinde ubikinon düzeyleri kontrole kıyasla anlamlı yüksek iken , total antioksidan kapasitesinin de kontrole kıyasla anlamlı yüksek olması yine ubikinon ile total antioksidan kapasite arasında doğrudan bir ilişkinin varlığını desteklemektedir. Ancak bunlarla çelişkili olarak, tedavi sonrası grupta ubikinon değerleri kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen bu iki grup arasında total antioksidan kapasite değerleri açısından anlamlı farklılık saptanamamıştır. Kontrol grubu ve tedavi sonrası grup arasında total antioksidan kapasite değerleri açısından anlamlı farklılık olmamakla birlikte, tedavi sonrası grubun total antioksidan kapasite değeri ortalaması kontrole göre hafif düşük olarak bulunmuştur. Bu durum, tedavi sonrası grupta ubikinon düzeyinin düşmesi dışında antioksidan kapasiteyi düşüren başka faktörlerin de olabileceğini akla getirmektedir. Tedavi sonrası grupta myogloblin değerleri ile total antioksidan kapasite değerleri arasında ters yönde bir korelasyon saptandığı daha öncede belirtilmişti( $r=-0.59$ ). Lipofilik olması nedeniyle simvastatin, hepatositler haricinde diğer doku hücrelerine de basit difüzyonla girerek kas hücrelerinde kolesterol sentezini inhibe etmektedir. Hücrelerde oluşan lipid fazın değişikliği membran yapısını ve geçirgenliğini bozmaktadır (50). Redoks siklusuna giren semikinonlar süper oksid radikalleri için fizyolojik oluşum yerleri olarak bilinmekle birlikte membran yapısındaki lipid fazın değişikliği semikinonun oksijene duyarlılığını arttırarak süperoksid radikal oluşumunda artışa neden olmaktadır(45). Olasılıkla kas hücrelerinde artan bu süperoksid radikal oluşumu, tedavi sonrası grupta total antioksidan kapasite düşmesine katkıda bulunmaktadır.

Simvastatinin kullanım dozlarında, myozit ve rabdomiyoliz gibi kasla ilgili yan etkilerinin ortaya çıktığı bildirilmiştir (17). Simvastatin kullanan kişilerde kas yorgunluğu, CK ve myogloblin yüksekliği ile seyreden rabdomiyoliz geliştiği ve ilacın kesilmesiyle semptomların gerilediğini belirten farklı iki olgu sunumunda, ubikinon eksikliğine bağlı azalmış mitokondrial ATP üretiminin mitokondrial disfonksiyon ve myopatiye, ciddi vakalarda  $Na^+-Ca^{++}$  değişiminin bozulmasıyla intrasellüler kalsiyum artışı ve hücre ölümüne neden olabileceği ileri sürülmüştür (42,58).



Ayrıca hem A'nın farnezil grubunun da mevalonat yolu üzerinden oluşması nedeniyle, HMG CoA redüktaz inhibitörlerinin ubikinon sentezi dışında elektron transport zincirinin bir diğer üyesi olan Hem A'nın sentezinde de azalmaya yol açarak mitokondrial hasara bağlı rabdomyoliz gelişimine neden olabileceği bildirilmiştir (42).

Simvastatinin kasa olan toksik etkisine katkıda bulunan bir diğer faktör olarak yine mevalonat yolu üzerinden, dolikol oluşumunu inhibe etmesi gösterilmiştir (50,68). Dolikol glikoprotein sentezindeki taşıyıcı rolüyle önem kazanmaktadır. Proteinlerin izoprenilasyonundaki azalmanın hücre metabolizması üzerine olumsuz etkileri bilinmektedir. Ayrıca sodyum kanalları gibi iyon kanallarının glikozilasyonunda rol alan dolikol hücrel fonksiyonlar için gereklidir.

Son yıllarda kolesterol ve ubikinon sentez yolunun dallanma noktasının altında etkili bir enzim olan squalen sentazi inhibe eden ve squalestatin adı verilen ilaçların geliştirilmesi ubikinon, dolikol, hem A gibi nonsterol bileşiklerin sentezini koruyarak statinlerin neden olduğu yan etkileri bir ölçüde önleyebilecektir (10).

HMG CoA redüktaz inhibitörlerinin, kasa olan toksik etkisini hücrel enerji üretiminde yetersizliğe bağlayan yayınlara yanında (58,64), bu ilaçların kas dokusunda kolesterol sentez inhibisyonu yoluyla da toksik etki gösterdiğini bildiren yayınlar bulunmaktadır (50,68).

Yapılan bir çalışmada HMG CoA redüktaz inhibitörleri içerisinde en lipofilik olan simvastatinin kasa en toksik statin grubu olduğu, kas doku hücrelerine basit diffüzyonla girerek hücrelerdeki lipid fazın değişikliği ile kas hücre membranlarının yapısında ve elektriksel özelliğinde değişikliğe yol açtığı belirtilmiştir (50).

Simvastatin ve pravastatinin myopati oluşturma riskinin karşılaştırıldığı bir çalışmada pravastatinin özellikle karaciğer kolesterol sentezini azaltırken, periferel organlarda kolesterol sentezini etkilemediği bildirilmiştir (50).

Bölümümüzde yapılan bir tez çalışmasında, simvastatin alan ratlarda plazma kolesterolündeki düşmeye paralel olarak eritrosit membranı kolesterol içeriğinde de düşme bulunmuştur. Ayrıca bu etkilere ek olarak, simvastatin alımı ratlarda eritrosit membranı fosfolipid içeriğinde artışa yol açmıştır(10). Hücre membranlarının lipid kompozisyonunda oluşan bu denli değişikliğin fonksiyonel sonuçlarının olmaması uzak bir olasılıktır. Membran kolesterol / fosfolipid oranındaki düşmenin membran akışkanlığını değiştirdiği bilinmektedir. Eritrosit membranı lipid kompozisyonunun diğer hücre membranları ile korelasyon gösterdiğini varsayarsak bu çalışmanın sonuçları simvastatinin kasa olan toksik etkisini kas hücre membranlarındaki lipid fazın değişikliği ile gösterdiğini bildiren yayınları desteklemektedir (50,68).

Simvastatinin, kullanım dozlarında kasa toksik etkilerinin olduğunu bildiren yayınlar olması nedeniyle (17,58), biz de çalışma grubumuzda CK ve myoglobin çalışmaya karar verdik. Yapılan tedavi öncesi ve tedavi sonrası karşılaştırmada hem myoglobin değerlerinin ( $p=0.0003$ ) hem de CK değerlerinin ( $p=0.0003$ ) tedavi sonrası grupta anlamlı yükselme gösterdiğini tespit ettik.

Bu yayınlardaki açıklamalar ve bizim ilaç sonrası grupta elde ettiğimiz ilaç öncesine göre yükselmiş CK ve myoglobin değerleri simvastatinin bizim çalışma grubumuzda da kas hücrelerini etkilediğini ve bu ilacın uzun süreli kullanımının sakıncalı olabileceğini göstermektedir. Simvastatin kullanan bizim çalışma grubumuzdaki hastalardan iki tanesinde kas ağrısı ve yorgunluk şikayetleri bildirilmiştir. Ayrıca beklenmedik bir bulgu olarak, çalışma grubundaki bir hastada 2 aylık ilaç kullanımının ardından ilaç öncesi değerlerin beş katı kadar bir CK yükselmesi ve ilaç öncesi değerlerin iki katı kadar bir myoglobin yükselmesi tespit ettik. Bunun tesadüfi bir kardiyak rahatsızlığın sonucu olabileceğini düşünerek yaptığımız CK-MB çalışmasında CK-MB değerlerini normal sınırlarda bulduk. Simvastatinin başka ilaçlarla birlikte kullanıldığında kasa olan toksik etkisinin arttığını bazı ilaçların HMG CoA redüktaz inhibitörlerinin biliyer atılımını azaltarak plazma düzeyini arttırdığını ve böylece akut toksik etkiye yol açtığını bildiren yayınlar bulunmaktadır (63,64). Bu bilgi ışığında hastamızın başka bir ilaç kullanıp kullanmadığını araştırdık ve simvastatin

ile birlikte aynı zamanda antihipertansif bir ilaca da başladığını öğrendik. Bu sonuçlar bize simvastatinin akut toksik etkisinin ilaç etkileşiminden kaynaklanabileceğini düşündürmekle birlikte, kesin karara varabilmek için hasta üzerinde daha ileri araştırmaların yapılması gerektiği kararına vardık.

Yaptığımız yayın taramasında, simvastatin kullanan insanlarda görülen ubikinon eksikliğinin kan ATP düzeyine ve total antioksidan kapasite üzerine etkisini gösteren başka bir yayına rastlayamadık. Bu çalışmanın bu konuyla ilgili yapılacak ileri araştırmalara ışık tutacağını, kolesterol düşürülmesinde yaygın kullanıma sahip bu ilaç grubunu uzun yıllar kullanan insanlarda yapılacak araştırmaların hastaya en zararsız kolesterol düşürücü ilacın seçimi konusunda hekimi aydınlatacağını düşünüyoruz.



## KAYNAKLAR

1. Avins Andrew and Browner Warren. Lowering risk without lowering cholesterol: Implications for National Cholesterol Policy. Annals of Internal Medicine 1996; 125: 502-505.
2. Beckman Kenneth B and Ames Bruce N. The free radical theory of aging matures. Physiological Reviews 1998; 78: 547-581.
3. Beyer RE. An analysis of role of Coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant. Biochem Cell Biol 1992; 70: 390-403
4. Beyer Robert E, Nordenbrand Kerstin and Ernster Lars. The function of Coenzyme Q in free radical production and as an antioxidant: A Review. Chemica Scripta 1987; 27: 145-153.
5. Burtis Carl A, Ashwood Edward R. High-performance liquid chromatography. In: Tietz Textbook of Clinical Chemistry, second edition, Ch 8, 1994.
6. Cadenas E, Hochstein P, Ernster Lars. Pro and antioxidant functions of quinones and quinone reductases. The role of ubiquinone. Adv Enzymol 1992; 65: 97-146.
7. Clark IA. Tissue damage caused by free oxygen radicals. Pathology 1986; 18: 181-186.
8. Copper GM. The Chemistry of cells. The Cell, Molecular Approach, Ch 2. ASM press Washington, D.C. 1997.
9. Criqui Michael H. Very low cholesterol and cholesterol lowering. Circulation 1995; 90:2591
10. Çalışkan Sezer, Önvural Banu. HMG CoA Redüktaz inhibitörleri ile kolesterol düşürülmesinin kan ve doku ATP düzeyleri ve eritrosit membran lipidleri üzerine etkilerinin araştırılması. Uzmanlık Tezi 1998.
11. Davidson Michael H, Stein Evan A et al. The efficacy and six-week tolerability of simvastatin 80 and 160 mg/day. Am J Cardiol 1997; 79: 38-42.
12. DiMauro Salvatore, Bonilla Eduardo, Davidson Mercy et al. B. Mitochondria in neuromuscular disorders. Biochimica et Biophysica Acta 1998; 1366: 199-210.
13. Ernster L, Andree Forsmark. Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organism. Clin Inves. 1993;71: 60-S65.

14. Ernster Lars, Dallner Gustav. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochimica et Biophysica Acta* 1995; 1271: 195-204.
15. Folkers Karl, Osterborg Anders, Nylander Magnus et al. Activities of vitamin Q<sub>10</sub> in animal models and serious deficiency in patients with cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997; 234: 296-299.
16. Furberg Curt D. Natural statins and stroke risk. *Circulation* 1999; 99: 185-188.
17. Galper Jonas B. Increased incidence of myositis in patients treated with high dose simvastatin. *The American Journal of Cardiology* 1998; 81: 259
18. Gaziano Michael J, Hebert Patricia et al. Cholesterol reduction: weighing the benefits and risks. *Annals of Internal Medicine* 1996; 124: 914-918.
19. Ghirlanda G, Oradei A, Manto A et al. Evidence of plasma CoQ<sub>10</sub>-Lowering effect by HMG-CoA reductase inhibitors:A double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Pharmacol* 1993; 33: 226-229.
20. Goldstein Joseph L, Brown Michael. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990; 343: 425-430.
21. Gotto Antonio M. Cholesterol Management in theory and practice. *Circulation* 1997;96: 4424-4430.
22. Gotto Antonio M. Lipid lowering, regression and coronary events. *Circulation* 1995; 92: 646-656.
23. Gotto Antonio M. Overview of Current Issues in Management of Dyslipidemia. *Am J Cardiol* 1993, 71:3B-8B.
24. Gould Lawrence A, Rossouw Jacques E et al. Cholesterol reduction yields clinical benefit impact of statin trials. *Circulation* 1998; 97: 946-952.
25. Grossi G, Bargossi A M, Fiorella P L, and Piazzini S. Improved high-performance liquid chromatographic method for the determination of coenzyme Q<sub>10</sub> in plasma. *Journal of Chromatography* 1992; 593: 217-226.
26. Gutteridge JMC and Halliwell B. Iron and oxygen radicals in brain. *Ann Neurol* 1992; 32: 516-521.
27. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995;41(12): 1819-1828.

28. Haliwell B. Oxidants and the central nervous system:some fundamental questions. Acta Neurol Scand 1989; 126: 23-33.
29. Hebert Patricia R, Gaziano Michael, Chan Ki Sau et al. Cholesterol lowering with drugs, risk of stroke, and total mortality. JAMA 1997; 278: 313-321.
30. Ikerjiri Y, Mori E, Ishii K et al. Idebenone improves mitochondrial oxidative metabolism in a patient with MELAS. Neurology 1996; 47: 583-585.
31. Jones Peter, Kafonek Stephanie et al. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia ( The curves study). Am J Cardiol 1998; 81:582-587.
32. Kagan Valerian, Serbinova Elana and Packer Lester. Antioxidant effects of ubiquinones in microsomes and mitochondria are mediated by tocopherol recycling. Biochemical and Biophysical Research Communications 1990; 169: 851-857.
33. Kitagawa K, Matsumoto M, Oda T et al. Free radical generation during brief period of cerebral ischemia may trigger delayed neuronal death. Neuroscience 1990;35(3): 551-558.
34. Laaksonen R, Ojala J P, Tikkanen M J. Serum ubiquinone concentrations after short- and long-term treatment with HMG-CoA reductase inhibitors. Eur J Clin Pharmacol 1994; 46: 313-317.
35. Laaksonen Reijo, Jokelainen Kalle, Sahi Timo et al. Decreases in serum ubiquinone concentrations do not result in reduced levels in muscle tissue during short-term simvastatin treatment in humans. Clinical Pharmacology Therapeutics 1995; 57:62-65.
36. Laoksonen Reijo, Jokelainen Kalle, Laakso Juha et al. The effects of simvastatin treatment on natural antioxidants in low- density lipoproteins and high- energy phosphates and ubiquinone in skelatal muscle. Am J Cardiol 1996; 77: 851-854.
37. LaRosa JC, Hunninghake D, Bush D et al. The cholesterol facts. Circulation 1990,81: 1721-1731.
38. Larsen M L, Illing D R. Drug treatment of dyslipoproteinemia. Med Clin NA 1994;78: 225-246.
39. Lehninger A L, Nelson D L, Cox M M. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. In: Principles of Biochemistry, second edition, Ch 20. Worth Publishers 1993.

40. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Lipid Biosynthesis In: Principles of Biochemistry, second edition. Ch 20. Worth Publishers 1993.
41. Lenaz G, Fato R, Castelluccio C. The function of Coenzyme Q in mitochondria. Clin Invest 1993; 71: 66-70.
42. Manoukian Anthony A, Bhagavan Nadhipuram V, Hayashi Taguji et al. Rhabdomyolysis secondary to lovastatin therapy. Clin Chem 1990; 36 (12): 2145-2147.
43. Matthews Russell T, Yang Lichuan, Browne Susan et al. Coenzyme Q<sub>10</sub> administration increases brain mitochondrial concentrations and exerts neuroprotective effects. Proc Natl Acad Sci. 1998; 95: 8892-8897.
44. Mooney Anthony. Treating patients with hypertriglyceridaemia saves lives: triglyceride revisited. Current Medical Research and Opinion 1999; 15: 65-77.
45. Nohl Hans, Gille Lars, and Staniek Katrin. The biochemical, pathophysiological, and medical aspects of ubiquinone function. Ann N Y Acad Sci 1998 Nov 20; 854: 425-434.
46. 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.
47. Okamoto Tadashi, Matsuya Takeshi, Fukunaga Yuko et al. Human serum Ubiquinol-10 levels and relationship to serum lipids. Internat J Vit Nutr Res. 1989; 59: 288-292.
48. Palomaki Ari, Malminiemi Kimmo, Solakivi Tiina and Malminiemi Outi. Ubiquinone supplementation during lovastatin treatment: effect on LDL oxidation ex vivo. Journal of Lipid Research 1998; 39: 1430-1436.
49. Pedersen J Z and Finazzi Agro A. Protein- radical enzymes. FEBBS Letters 1993; 325(1,2): 53-58.
50. Pierno Sabata, De luca Annamaria, Tricarico Domenico 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. The J of Pharmacology and Experimental Therapeutics 1995; 275: 1490-1496.
51. Plehn Jonathan F, Davis Barry R et al. Reduction of stroke incidence after myocardial infarction with pravastatin. Circulation 1999; 99: 216-223.



52. Pogue Douglas H, Moravec Schomisch Christine, Roppelt Christine et al. Effect of lovastatin on cholesterol content of cardiac and red blood cell membranes in normal and cardiomyopathic hamsters. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1995; 273: 863-869.
53. Reilly P M, Schiller HJ and Bulkey GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *The American Journal of Surgery* 1991; 161:488-502.
54. Rica-Evans C A, Burdon RH et al. Free radicals and antioxidants in normal and pathological processes. In *Free Radical Damage and its Control*, Elsevier Science Press, England 1994; 361-381.
55. Rice-Evans C A, Burdon RH et al. Antioxidants and free radical scavengers. In *Free Radical Damage and its Control*, Elsevier Science Press, England 1994;113-129.
56. Rice-Evans C A , Burton RH et al Formation of free radicals and mechanisms of action in normal biochemical process and pathological states. In *Free Radical Damage and its Control*,Elsevier Science Press, England 1994;131-153.
57. Richter C. Reactive oxygen and DNA damage in mitochondria. *Mutation Res* 1992; 275: 249-255.
58. Rosenberg A D, 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: 1089-1091.
59. Rosendorff Clive. Statins for prevention of stroke. *The Lancet* 1998; 351: 1002.
60. 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.
61. Shults Clifford W, Haas Richard H, Passov David et al. Coenzyme Q<sub>10</sub> levels correlate with the activities of complexes I and II/ III in mitochondria from Parkinsonian and nonparkinsonian subjects. *Ann Neurol* 1997; 42: 261-264.
62. Sinatra Stephen T. "Care," cancer and coenzyme Q<sub>10</sub>. *Journal of the American College of Cardiology* 1999; 33: 897-903.

63. Smith P F, Eydelloth S, Grossman S J et al. Myopathy associated with HMG-CoA reductase inhibitors (HMGRIs) and cyclosporin A: evaluation in a rat model. European Heart Journal 1992;13(supp B): 2-6.
64. Smith Peter F, Eydelloth Ronald S, Grossman Scott J et al. HMG-CoA Reductase inhibitor-induced myopathy in the rat: cyclosporine an interaction and mechanism studies. JPET 1991; 257: 1225-1235.
65. Smith GD, Shipley J, Marmet MG et al. Plasma cholesterol concentration and mortality. JAMA 1992; 267: 70-76.
66. Treasure C B, Klein J L, Weintraub WS et al. Beneficial effect of cholesterol lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. N Eng J Med 1995; 332: 481-487
67. Upston Joanne M, Terents Andrew C, Stocker Roland. Tocopherol-mediated peroxidation of vitamin E as a potential antiatherogenic supplement.The FASEB Journal 1999; 13: 977-994.
68. Veerkamp JH, Smit JWA, Benders AAGM, Oosterhof A. Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on growth and differentiation of cultured rat skeletal muscle cells. BBA 1996; 1315: 217-222.
69. Watson Paul S, Scalia Gregory M, Galbraith Andrew. Lack of effect of Coenzyme Q<sub>10</sub> on left ventricular function in patients with congestive heart failure. The Journal of the American College of Cardiology 1999; 33: 1549-1553.
70. Watts G F, Castelluccio C , Evans Rice C. Plasma coenzyme Q (Ubiquinone) concentrations in patients treated with simvastatin. J Clin Pathol 1993; 46: 1055-1057.
71. Witztum J L. Drugs used in the treatment of hyperlipoproteinemias. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Edition. Ch 36. Eds: Hardman J G, Limbird L E. McGraw-Hill, New York 1996.
72. Wolterbeek R, Stricker BH. Side effects of cholesterol synthesis inhibitors. Ned Tijdschr Geneesk 1993; 137(19): 973-977.