

SİMVASTATİN VE MEVASTATİN'İN ANJİOGENEZ ÜZERİNE OLAN
ETKİLERİNİN KORYOALLANTOİK MEMBRAN MODELİNDE
ARAŞTIRILMASI

ZELİHA ÖDEMİŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

2011

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİMVASTATİN VE MEVASTATİN'İN ANJİOGENEZ ÜZERİNE
OLAN ETKİLERİNİN KORYOALLANTOİK MEMRAN MODELİNDE
ARAŞTIRILMASI

ZELİHA ÖDEMİŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Tijen KAYA TEMİZ

SİVAS
2011

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Farmakoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Üye

Üye

Üye

Üye(Danışman)

ONAY

Bu tez çalışması, tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tijen KAYA TEMİZ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24.09.2008 tarihli ve 007 sayılı toplantısında kabul edilen Fen/Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

ÖZET

***SİMVASTATİN VE MEVASTATİN'İN ANJİOGENEZ ÜZERİNE
OLAN ETKİLERİNİN KORYOALLANTOİK MEMBRAN MODELİNDE
ARAŞTIRILMASI***
ZELİHA ÖDEMİŞ

Yüksek Lisans Tezi, Farmakoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Tijen KAYA TEMİZ

2011, 67 sayfa

Kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde önemli bir yeri olan aterosklerotik sürecin uzun zamandan beri artmış serum kolesterol seviyeleri ile ilişkisi bilinmektedir. Bu ilişki kolesterol seviyelerini düşürecek ilaçların klinikte kullanıma girmesine yol açmıştır. Yapılan büyük ölçekli klinik çalışmalarda hiperkolesterolemisi ve ateroskleroza olan hastalarda statinlerin koroner arter hastalığı riskini azalttığı ortaya konmuştur.

Statinler, hidrosimetilglutaril-koenzim A (HMG-Co A)'nın yapısal analoglarıdır. Etki mekanizmaları HMG-CoA redüktaz enziminin parsiyel inhibisyonu olarak düşünülmektedir. Bu enzim sterol biyosentezinin ilk basamağında yer almaktadır. Klinik kullanımda statinlerin endotel fonksiyonundaki önemli rolleri de dahil olmak üzere tanımlanmış antiinflamatuvar, antiagregan, antikoagülan, düz kas hücresi ve plak stabilitesi üzerine etkileri ve hemostatik etkilerini de içeren bir dizi pleiotropik etkileri yüzünden klasik endikasyonları dışında da kullanımları söz konusu olabilir.

Bu çalışmada klinik tedavide sık olarak kullanılan statinlerden simvastatin ve mevastatinin anjiogenez üzerindeki etkileri döllenmiş tavuk yumurtaları üzerinde, koryoallantoik membran modelini kullanarak kıyaslanmıştır. Pozitif kontrol olarak FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Ajansı) tarafından onaylanan tek antianjiogenetik ajan olan bevasizumab kullanılmıştır. Çalışmamızda hem simvastatin hem de mevastatin antianjiogenetik özellik göstermiştir. Bu antianjiogenetik etki özellikle yüksek konsantrasyonlarda belirginken, düşük konsantrasyonlarla birlikte azalmıştır. Simvastatin benzer

konsantrasyonlarda mevastatinle aynı antianjiyojenik etkiyi gösterirken, düşük dozlarda mevastatinin daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Simvastatin ve mevastatinin kombine olarak uygulanması, bu ajanların tek başlarına meydana getirdiği antianjiyojenik etkiye benzer bir etki meydana getirmiştir. Yani statin kombinasyonu ek bir antianjiyojenik etki meydana getirmemiştir. Elde ettiğimiz bulgulara dayanarak mevastatinin simvastatinden daha güçlü bir antianjiyojenik ajan olduğu söyleyenebilir.

Anahtar Kelimeler: Simvastatin, mevastatin, CAM, anjiogenez

ABSTRACT

It is well known that atherosclerotic process which takes an important part in cardiovascular diseases is associated with increased plasma cholesterol levels. This relationship let the drugs used in treatment of high cholesterol levels come into use in clinic practice. The wide spread clinical studies show that statins lower risk of coronary artery disease in patients with hypercholesteremia and atherosclerosis.

Statins are the structural analog of hidroxymethy glutaryl-coenzyme A (HMG-Co A). It is thought that the main effect mechanism of statins is partial inhibition of HMG-Co A reductase. This enzyme takes part in the first step of sterol biosynthesis. In addition to their antilipidemic features, statins are used for additional indications because of their endothelium protective, antiinflammatory, antiaggregant, anticoagulant, smooth muscle and plaque stabilizing features.

In this study we aimed to investigate the effects of commonly used statins, simvastatin and mevastatin, on angiogenesis in impregnate chicken eggs by using chorioallantoic membrane model (CAM). Bevacizumab, the unique FDA approved antiangiogenic drug was used as positive control. In our study we showed that both simvastatin and mevastatin have antiangiogenic effect. This antiangiogenic effect was prominent in higher concentrations and weakened with decreasing concentrations. Although simvastatin and mevastatin showed similar antiangiogenic effect at high concentrations, mevastatin show stronger antiangiogenic effect than simvastatin at lower concentration. The antiangiogenic effect of simvastatin and mevastatin combination was similar when compared to the groups in which simvastatin and mevastatin used alone which means that combination of simvastatin and mevastatin caused any additional antiangiogenetic effect. It may be speculated that mevastatin may be stronger antiangiogenic agent than simvastatin.

Key words: Simvastatin, mevastatin, CAM, angiogenesis

TEŐEKKÖR

Bu alıőmada bana yardımcı olan başta tez danıőmanım sayın Prof. Dr. Tijen KAYA TEMİZ'e, tez alıőmalarım sırasında emeğini esirgemeyen Uzman Dr Ahmet ALTUN 'a ve eğitimim sırasında emeği geçen Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ve Öğretim elemanlarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ	vii
SİMGE VE KISALTMALAR.....	viii
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Anjiyogenez	4
2.1.1. Anjiyogenez Mekanizması.....	4
2.1.2. Anjiyogenez ve Kanser	7
2.1.3. Değişik Fizyolojik ve Patolojik Süreçlerde Anjiyogenez.....	10
2.2. KAM Modeli.....	11
2.4. Lipid Profili Düzenleyici Ajanlar Olarak Statinler	14
2.4.1. Statinler	14
2.4.2. Statinlerin pleiotropik etkileri	18
2.4.3. Statinler ve Anjiyogenez.....	19
2.4.4. Simvastatin.....	22
2.4.5. Mevastatin	24
2.5. Bevasizumab	27
3. GEREÇ ve YÖNTEM	30
3.1. Pelletlerin Hazırlanması.....	30
3.2. KAM Deneyi.....	30
3.3. İstatistiksel Değerlendirme	38
4. BULGULAR.....	39
5. TARTIŞMA	44
KAYNAKLAR	52

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Anjiyogenezin başlangıç evreleri.....	6
Şekil 2.2. Tümör anjiyogenezi aşamaları.....	9
Şekil 2.3. Tavuk embriyosu ve koryoallantoik membranın stereoskopik mikroskop altındaki görünümü.....	12
Şekil 2.4. Asetil KoA'dan kolesterole dönüşüm şeması. KoA: koenzim A, PP: pirofosfat	16
Şekil 2.5. Simvastatinin kimyasal yapısı.....	23
Şekil 2.6. Mevastatinin kimyasal yapısı.....	27
Şekil 3.1. Döllenmiş tavuk yumurtasının şematik gösterimi.....	31
Şekil 3.2. Döllenmiş tavuk yumurtalarının silinerek kuluçkaya alınması.....	32
Şekil 3.3. Kuluçkanın 5. gününde yumurtaların açılması.....	32
Şekil 3.4. Farklı kuluçka günlerinde olan tavuk embriyoları.....	33
Şekil 3.5. Erken dönemdeki tavuk embriyosunun ve damar yapılarının stereoskopik mikroskop görüntüsü.....	33
Şekil 3.6. Koryoallantoik membran modeli.....	34
Şekil. 3.7. Koryoallantoik membran modeli.....	345
Şekil. 3.8. Koryoallantoik membran modeli.....	35
Şekil 3.9. Koryoallantoik membran modeli.....	35
Şekil 3.10. Koryoallantoik membran modeli.....	36
Şekil 4.1. Simvastatin'in $10^{-4}M$, $10^{-5}M$ ve $10^{-6}M$ konsantrasyonlarda antianjiyogenik etki puanları.....	39
Şekil 4.2. Mevastatin'in $10^{-4}M$, $10^{-5}M$ ve $10^{-6}M$ konsantrasyonlarda antianjiyogenik etki puanları.....	40
Şekil 4.3. Simvastatin ve mevastatinin tek başlarına $10^{-4}M$, $10^{-5}M$ ve $10^{-6}M$ konsantrasyon oluşturan miktarlarının 1:1 oranındaki kombinasyonunun antianjiyogenik etki puanları.....	41

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1. KAM modeliyle çalışmanın avantaj ve dezavantajları.....	14
Tablo 2.2. Doğal ve sentetik statinler.....	16
Tablo 3.1. Koryoallantoik membran üzerinde anjiyogenik etkinin değerlendirilmesi için kullanılan skor değerleri.....	36
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan ilaç gruplarında uygulama sayısı.....	38
Tablo 4.1. Antianjiyogenik etki puanlarının karşılaştırılması.....	43

SİMGE VE KISALTMALAR

HMG-CoA :Hidroksi metil glutaril koenzim A

VEGF : Vascular endothelial growth factor

ESM : Esktraselüler matriks

MMP : Matriks metallo proteinaz

BM : Bazal membran

bFGF : Basic Fibroblast Growth Factor

TNF a : Tumor necrosis factor

uPA : Ürokinaz tip plazminojen

tPA : Doku tip plazminojen

PA :Plazminojen aktivatör

TGF a : Transforming growth factor alpha

TGF b : Transforming growth factor beta

PDGF : Platelet-derived growth factor

PIGF-1 : Plasental Growth Factor 1

KAM :Koryoallontoik membran modeli

DDL : Düşük dansiteli lipoprotein

Apo B : Apolipoprotein B

YDL :Yüksek dansiteli lipoprotein

PP : Pirofosfat

FPF : Forsenil pirofosfat

GGPF : Geranil geranil pirofosfat

eNOS : Endoteryal Nitrik Oksit Sentaz

mRNA : Messenger ribonucleic acid

LDL : Low-density lipoprotein

PI-3kinaz : Fosfoinozidid-3kinaz

CYP 3A4 : Sitokrom P450 izoenzim 3A4

kDa : Tissue plasminogen activator

1.GİRİŞ

Anjiogenez, var olan damarsal yapılardan yeni damarların oluşma süreci olarak tanımlanmaktadır. Anjiogenez, esas olarak embriyogenez aşamalarında aktif olarak devrede olan bir sistem olmasına rağmen erişkin yaşamında da yara iyileşmesi, menstrüel siklus gibi birçok fizyolojik ve başta tümörler olmak üzere, romatoid artrit, retinopatiler, psöriazis ve intraplak anjiogenez gibi patolojik süreçte önemli rol oynamaktadır.

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH) içinde insan hayatını tehdit eden birçok hastalığı barındıran geniş bir hastalık grubunu temsil etmektedir. Bu geniş hastalık grubunu oluşturan rahatsızlıkların etyolojileri farklılık gösterse de temelde genetik faktörler, beslenme şekli, fiziksel inaktivite gibi sebepler ortak görünmektedir.

KVH'lar her yıl milyonlarca insanı etkileyerek yüksek oranda mortalite ve morbidite görülmesine neden olmaktadır. Yıllık ölümler göz önüne alındığında tüm ölüm nedenleri arasında KVH'lar birinci sırayı almaktadır. Olayın maddi boyutu göz önüne alındığında; tüm dünya çapında en yüksek maliyete sahip ilaçlar KVH'ların tedavisinde kullanılan ilaçlardır. Bu ilaçlar içerisinde de statinler birinci sırayı almaktadır. KVH'ların her geçen yıl artan oranları tüm dünya çapında milyarlarca dolarlık kayba neden olmaktadır.

Daha önce de belirtildiği üzere KVH'lar geniş bir hastalık grubudur ve bu hastalıkların sebepleri birbirinden farklı olmakla birlikte hepsinin birinci basamak tedavisinde yaşam tarzı değişikliği bulunmaktadır. Kimi zaman sadece bu yeterli olsa da çoğu zaman ilaç tedavisine gerek duyulmaktadır. KVH'ların birçoğunun ana bileşenlerinden birisi bozulmuş lipit profilidir. Bu amaçla ilk basamak tedavide kullanılan en önemli ilaçlar statinlerdir. Statinler KVH'larda en önemli risk faktörü olan düşük dansiteli lipoproteini en fazla düşüren ilaç grubudur.

Statinler, 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-KoA) redüktaz enziminin substratı olan HMG-KoA'ya ve onun yarı indirgenmiş metabolitine yapısal olarak benzediklerinden; adı geçen enzimi kompetitif bir şekilde inhibe

ederler. Bu olay sonucu, karaciğer hücrelerindeki kolesterol ve lipoprotein düzeyinin düşmesi, bu hücrelerin yüzeyindeki DDL (düşük dansiteli lipoprotein) reseptörlerinin dansitesinde (yoğunluğunda) artmaya (reseptör upregulasyonuna) yol açar. Böylece, söz konusu ilaçlar hem lipoprotein sentezini azaltmak ve hem de apo-B (apolipoprotein B) içeren lipoproteinlerin (başta aterojenik DDL olmak üzere) karaciğer hücrelerine ve diğer hücrelere girişini ve orada yıkımını arttırmak suretiyle kanda DDL kolesterolü ve total kolesterol düzeyini düşürürler.

Son dönemde yapılan çalışmalar statinlerin lipid profili düzenleyici etkilerinden daha ziyade değişik sistemler üzerine yapmış oldukları farklı etkiler üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalar statinlerin aynı zamanda antioksidan, antiinflamatuar, antitrombotik ve antitümöral etkilerinin de olduğunu göstermektedir. Tüm bu özelliklerin yanında statinlerin anjiogenez üzerindeki etkileri de ilgi çekmektedir. Çünkü kanda total kolesterol ve DDL düzeylerinin yükselmesinin tek tehlikesi damar duvarında meydana gelen bozulma ve plak oluşumu değildir. İnsan vücudundaki küçük çaplı damarlar lümenlerinden geçen kandan difüzyon yolu ile beslenirler. Oysa daha geniş çaplı büyük damarların difüzyon ile beslenemeyecek bölgeleri için küçük kılcallar oluşturarak bu bölgeyi kendilerinin beslemesi gerekmektedir. Damar duvarında plak yapısı oluşup damar çapında bir daralma meydana getirdiğinde, damar, küçük kılcalları bu tıkanıklığı aşmak amacı ile kullanmak ister ve plak içerisinde küçük kılcal damarlar oluşmaya başlar. Bu süreç plak içi anjiogenez olarak adlandırılır. Anjiogenez birçok fizyolojik süreçte olumlu sonuçlar doğurmak için çalışsa da plak içerisinde gelişen damarlar çok kırılabilir ve kanamaya yatkındır. Plak içinde kanama meydana gelmesi plakta yırtılma olmasına ve plaktan bazı parçaların kopmasına neden olur. Bu kopan parçaların ilerdeki daha küçük damarları tıkararak inme gibi çeşitli komplikasyonların meydana gelmesine neden olur.

Bu yüzden antilipidemik özellikleri olan statinlerin anjiogenez üzerindeki etkilerini araştırılması oldukça önemlidir. Statinlerin anjiogenez

zerindeki etkilerinin bilinmesi değişik durumlarda ilaç seçiminde önemli rol oynayabilir.

Bu amaçla biz bu çalışmamızda anjiogenez üzerindeki etkileriyle ilgili çelişkili çalışmalar bulunan simvastatin ve anjiogenez üzerindeki etkileriyle ilgili araştırma bulunmayan mevastatinin anjiogenez üzerindeki etkilerini doza bağımlık olarak Koryoallantoik membran modeli (KAM) kullanarak araştırmayı amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Anjiyogenez

Anjiyogenez daha önceden var olan vasküler sistemden yeni kan damarı oluşumu sürecidir. Embriyogenez süresince yeni kan damarı gelişimi esas olarak vaskülogenez ve anjiyogenez ile meydana gelir (1). Vaskülogenez terimi, anjiyoblast olarak adlandırılan kök hücrelerden kaynaklanan endotelial hücrelerin primer kapiller pleksusu oluşturmak üzere farklılaşarak bir araya gelmesini tanımlar. Bu primitif ağ oluşumunun tomurcuklanma, dallanma ve intussusseptif büyüme şeklindeki farklılaşmasına anjiyogenez denir ve böylelikle mevcut kapiller damarlardan yeni kapiller damarlar meydana gelir. Arteriyogenez bu damar tomurcuklarının sonraki dönemde damar duvarının diğer elemanları ile birlikte stabilizasyonunu ve geniş kan damarlarının oluşumunu ifade eder.

Erişkinlerde, anjiyogenez yara iyileşmesi, doku tamiri ve menstrual siklus gibi birçok fizyolojik süreçte tetiklenir. Patolojik anjiyogenez ise başta tümörler olmak üzere kollajen doku hastalıkları, retinopatiler ve psöriasis gibi hastalıklarda meydana gelir (2). Tümörlerin en hassas oldukları noktaları kanlanmalarındır ve tümörler anjiyogeneze bağımlı oldukları için anjiyogenezin bloke edilmesinin bir tedavi yöntemi olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (3).

2.1.1. Anjiyogenez Mekanizması

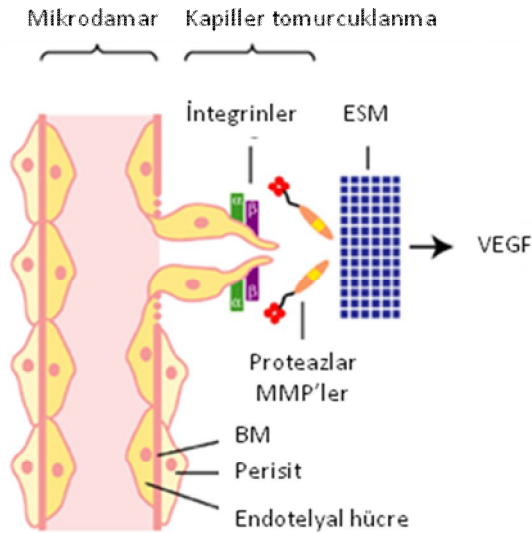
Anjiyogenez süreci pozitif ve negatif etkili moleküller arasındaki denge ile kontrol edilir. Pozitif etkili proanjiyogenik moleküller, eğer baskın hale gelirse anjiyogenez süreci tetiklenir ve yeni damar oluşumu meydana gelir. Bu kavram, "anjiyogenik anahtar (switch)" olarak adlandırılır (4).

Anjiyogenez bir dizi olayı içeren çok basamaklı bir süreçtir. Anjiyogenez, temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), tümör nekroz faktör alfa (TNF α) ve VEGF gibi anjiyogenik faktörlerin endotel aktivasyonu yapmak üzere çevre dokudan salınımı ile başlar (5). Bazal membranın proteolitik

enzimler tarafından yıkılması bu basamaklardan ilkidir. Endotel hücreleri yayılma etkisi göstermeyen tek bir tabaka halinde bulunurlar, anjiyogenez sürecinde göç etmek ve çoğalmak üzere uyarıldıklarında membran ve hücreler arasında bir bölünme meydana gelir ve sayıları artarak yayılmaya başlarlar. Endotel hücrelerinden salınan anjiyogenik büyüme faktörleri komşu dokulara difüzyon yolu ile geçerler. Bu büyüme faktörleri çevre kan damarlarındaki endotel hücrelerinde bulunan özgün reseptörlere bağlanırlar. Hücre içi sinyal kaskadının başlamasıyla bazal membran ve ekstrasellüler matriks hasarına yol açan serin proteazlar ve matriks metalloproteinazlar gibi proteolitik enzimlerin salınımı gerçekleşir ve endotel hücrelerinin damar duvarı dışına kaçıışı başlar. Ürokinaz-tip (uPA) ve doku-tip (tPA) plazminojen aktivatörleri plazminojeni plazmine çeviren serin proteazları grubuna aittirler (6). Endotel hücrelerinin invazyon ve göç süreçleri, plazminojen aktivatör (PA) ve matriks metalloproteinaz (MMP) sisteminin işbirliği içinde aktive olmasını gerektirir. Endotel hücre aktivasyonu, proliferasyonu ve göçü ikinci basamak olarak değerlendirilir. Bu yeni immatür damarlar endotelyal hücrelerin migrasyonu ve büyümesini sağlamak için endotelyum üzerinde boşluklar içerirler (7). Anjiyogenik uyarı, proteolitik yıkımı takiben endotel hücreleri aktive eder. Bu süreçte en etkili anjiyogenik faktör VEGF'dir (8). Kapiller oluşumu ve damar olgunlaşması anjiyogenezin üçüncü basamağıdır. Prolifere olan endotel hücreleri integrin $\alpha\beta 5$ 'in yardımıyla çevre matrikse göç ederler ve komşu damar tomurcuğunu oluştururlar (9). Kapiller filizlenmenin ucunda yeni oluşmuş ekstrasellüler matrikste yıkılma ortaya çıkar, böylece yayılımın devam etmesi sağlanır. Endotel hücre çoğalmasından sonra ekstrasellüler matriks bileşenlerinin depolanması ve bir araya getirilmesi için ekstrasellüler proteoliz mutlaka lokal olarak inhibe edilmelidir. Endotel hücrelerinin çoğalması ve ilerlemesi sırasında hücre içi ve hücreler arası boşluklar oluşmaya başlar. Hücreler anjiyogenez alanına göç ettikçe damar tomurcuğu tüp şeklini alır ve sonrasında damar lümenini oluşturur (5). Böylece, ekstrasellüler matriks proteolizinin birbirini sırayla izleyen aktivasyon ve inhibisyonları sonucunda kapillerler oluşur (Şekil 2.1).

Proteolitik yıkılma ve endotel hücresi göçünden sonra yeni oluşan kapillerler bazal membranı oluştururlar. Endotel hücrelerinin yeni kapiller yapılar oluşturabilmeleri için birbirlerine ve ekstrasellüler matrikse tutunmaları gerekir. Yeni matriks oluşumu için ekstrasellüler matriks proteinleri olan fibronektin, laminin ve kollajen üretilir (10). Yeni damar yapımı tamamlandıktan sonra anjiyogenik faktörlerde azalma görülürken, anjiyogenez inhibitörlerinde artış gözlenir. Endotel hücreleri tekrar stabil haldedirler ve damarlar kan akımını başlatmaya hazır hale gelmiş olurlar. Yeni damarların tam olarak oluşmaları yaklaşık yedi gün sürer (11).

Endotelyal hücreler lenf damarlarının oluşumuna da katkıda bulunurlar. Lenfatik damarlanma embriyogenez esnasında kan damarları gelişiminden kısa süre sonra gelişir ve kan damarları ile aynı kökene sahip olduğu düşünülür (12, 13). Venöz endotelyal hücrelerin lenfatik uyarılara duyarlı hale geldiği ve diferansiye olarak lenfatik tomurcukları oluşturduğu varsayılır. Bununla birlikte lenfanjiyoplastların veya prekürsörlerin varlığı da kanıtlanmıştır (14).



Şekil 2.1. Anjiyogenezin başlangıç evreleri. VEGF = Vasküler endotelyal büyüme faktörü, ESM=Ekstrasellüler matriks, MMP=Matrks metalloproteinaz, BM=Bazal membran (Expert Reviews in Molecular Medicine, Cambridge University Press, 2003).

2.1.2. Anjiyogenez ve Kanser

Diyabetes mellitus, romatoid artrit ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok patolojik durumun anjiyogenezin düzenlenmesindeki değişikliklerle ilişkili olmasına karşın, anjiyogenez ile ilgili gelişmeler esas olarak onkoloji alanındaki ilerlemelerle sağlanmıştır (15-17). Tümör anjiyogenezi, ilk olarak tümör metabolitlerine bağlı basit bir dilatasyon olarak düşünülmüş ve tümör hiperemisi olarak adlandırılmıştır. Sonraki yıllarda tümörün mevcut damarlarla mı beslendiği yoksa yeniden damarlanmanın mı olduğu tartışılmış, yeniden damarlanma olduğunu kabul edenler bile bunun tümör gelişimi için gerekli olmadığını, basit bir reaksiyon olduğunu ileri sürmüşlerdir (6). Bununla birlikte, doku hasarı sonrası oluşan yeni damarlanmanın bir süre sonra durduğu ve gerilediği, ancak tümöral dokularda damarlanmanın sürekli arttığı tespit edilmiştir (18). Folkman ve ark. (3) 1971 yılında “tümör gelişimi anjiyogeneze bağımlıdır” diyerek anjiyogenez konusunda asıl gelişimi başlatmıştır.

Tümörün büyümesi sırasında, tümöre besin, oksijen ve büyüme faktörleri sağlamak amacıyla mikrodamarların sayısında belirgin artış görülür. Tümörlerin yeni kan damarları oluşumu gerçekleşmeksizin sadece 1-2 mm³ hacme kadar büyüyebildikleri gösterilmiştir (3, 19). Tümör dokusunun oksijen ve besin ihtiyaçlarını 0,5 mm³ hacme kadar difüzyon yoluyla sağlayabildiği, ancak 0,5 mm³'ten daha büyük boyutlara ulaştığında artık anjiyogeneze bağımlı hale geldiği gösterilmiştir (20, 21). Anjiyogenez, bu noktada tümör oluşumunda kilit rol oynar ve kanser gelişiminde prognostik bir faktör olduğu kabul edilir (22).

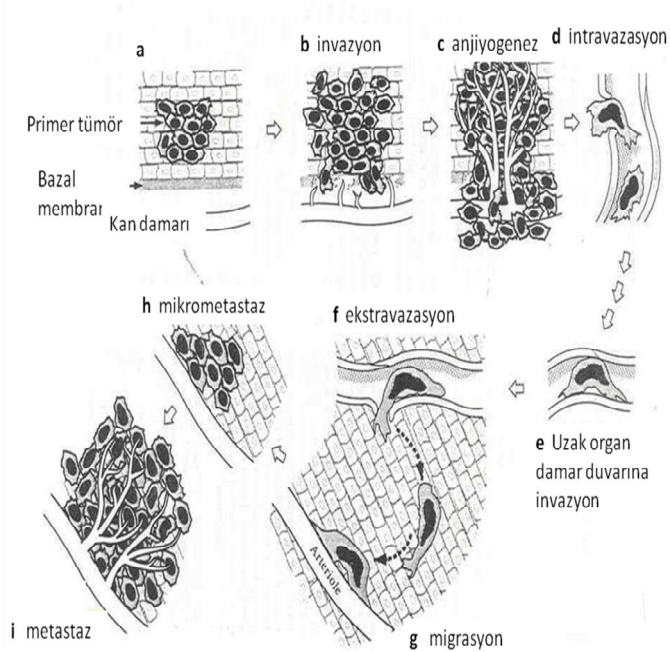
Tümör anjiyogenezi fizyolojik anjiyogeneze göre farklılıklar göstermektedir. Anjiyogenezi uyaran ve inhibe eden faktörler arasındaki dinamik denge bozulmakta, bu dengenin bozulmasında ise tümör ve endotel hücreleri temel rol oynamaktadırlar. Bir ya da birden fazla anjiyogenik büyüme faktörü aşırı eksprese olmadıkça, tümör büyümesinin olamayacağı gösterilmiştir (6). Anjiyogenezi uyarmak için yalnızca anjiyogenik faktörlerin artması yeterli olmayıp, tümörün anjiyogenik özellik kazanması için anjiyogenez inhibitörlerinin de azalması gereklidir (23, 24).

Neovaskularizasyon hakkında birçok mekanizma tanımlanmıştır. Bunlardan biri, var olan kan damarlarından endotelial hücrelerin önce proliferasyonu sonra migrasyonunu takiben tübüler vasküler yapılara organize olmalarını içeren tomurcuklanma anjiyogenezidir. Bir diğeri ise var olan kan damarlarının lümeni içerisinde transvasküler doku perdesinin oluşumu ve takiben kan damarının bu perde ile ayrılarak iki yeni damar oluşturmasını ifade eden intussusseptif anjiyogenezdir (25). Yeni damarlar, dolaşan endotelial progenitör hücreleri kullanarak da gelişebilirler. Şimdi artık kapsamlı veriler bu hücrelerin varlığını ve yeni damar oluşumuna olan katkılarını desteklemektedir (26, 27). Günümüzde çalışmalar alternatif bir tümör kanlanma desteği olarak bilinen vaskülojenik taklit üzerine odaklanmıştır. Vaskülojenik taklit, tümör hücrelerinin kendileri için yine tümör hücreleri tarafından çevrilen vaskülojenik yapılarca ikincil bir sirkülasyon sistemi oluşturulması sürecidir. Bu süreç anjiyogenezden bağımsızdır. Endotelial özelliklerin kazanılması ve dediferansiyasyonu ile tümör hücrelerinin tübüler dolaşım sistemi oluşturabilme kapasitesi edindikleri varsayılmaktadır. Tümör hücreleri sadece endotelial hücrelerin morfolojilerine benzemekle kalmaz aynı zamanda bazı vasküler belirteçleri eksprese etmek gibi fenotipik özelliklerini de kazanmışlardır. Bu tipteki neovaskularizasyon tedavi süreci içerisinde akılda tutulmalıdır çünkü vasküler taklidin dominant hale gelmesi durumunda geleneksel antianjiyogenik tedavilere yanıt alınamayabilir. Vaskülojenik taklit kavramı ilk olarak melanomalarda tanımlanmıştır (28). Ancak, bu şekilde oluşan vasküler ağın tümör kan akımına katkıda bulunduğu ilişkin kanıtlar yetersiz olduğundan bu gözlem yoğun eleştirilere maruz kalmıştır. Bununla birlikte, birçok araştırma grubu vaskülojenik taklidin ardındaki moleküler mekanizmaları ve kan akımına olan katkısına ilişkin kanıtları araştırmaktadır.

Tümör hücrelerinin metastaz yapabilmesi için vasküler sisteme girmesi, burada canlı kalabilmesi, tekrar damar sisteminden dışarı çıkabilmesi, hedef organda büyüebilmesi ve anjiyogenezi uyarabilmesi gerekir (Şekil 2.2). Anjiyogenezin tümörün yayılmasındaki rolünün yanı sıra metastazı kolaylaştırdığı varsayımını destekleyen deneysel ve klinik kanıtlar

bulunmaktadır (24, 29). Klinik veriler metastatik özelliğin anjiyogenezin şiddetine bağlı olduğunu göstermektedir (30, 31). Tümör hücresi anjiyogenik iken metastaz yaparsa, saptanabilir tümör oluşturma ihtimali daha fazladır. Ayrıca, metastatik kaskadın başında olduğu kadar sonunda da anjiyogeneze ihtiyaç vardır. Tümör hücresi başarıyla metastaz yapmış olsa bile hedef organda hemen damarlanmayabilir ve mikroskopik düzeyde kalabilir (32).

Anjiyogenez ile ilgili çalışmalar arttıkça kanser tedavisi ile ilgili yeni yaklaşımlar da ortaya çıkmıştır. Tedavide antianjiyogenik ilaçların kimyasal tedavi ve ışın tedavisi ile kombine edilmesi gündeme gelmiştir. Anjiyogenez inhibitörlerinin, kemoterapik tedavi ile birleştirilmesi daha etkili sonuçlar vermiştir. Bu durum, anjiyogenez inhibitörlerinin hücre hedeflerinin sitotoksik ajanlardan farklı olması ile açıklanmıştır. Ayrıca yan etkiler daha az izlenmiştir (33). Anjiyogenez inhibitörleri, farklı mekanizmalar ile etki göstermektedirler (34). Bunlar arasında, matriks yıkılımının engellenmesi, anjiyogenez aktivatörlerinin inhibisyonu veya endotel hücrelerinin doğrudan inhibisyonu gibi etkiler yer almaktadır.



Şekil 2.2. Tümör anjiyogenezi aşamaları.

2.1.3. Değişik Fizyolojik ve Patolojik Süreçlerde Anjiyogenez

Anjiyogenez yara iyileşmesi ve epitelizasyonu için çok önemli bir basamaktır. Yaralanan dokunun iyi beslenmesi ve yeterli kan akımının sağlanması iyileşmeyi etkileyen önemli bir parametredir. Anjiyogenez olmazsa oksijen ve besin desteği olmayacaktır, dolayısıyla yara yerine makrofaj ve fibroblastların invazyonu da gerçekleşemeyecektir. Anjiyogenez, hipoksi, büyüme faktörleri, matriks komponentleri ve metabolik durum gibi birçok faktörden etkilenebilmektedir (35). Yara yerinde oksijen basıncının düşük olması ve laktik asit birikimi, trombosit ve makrofajların transforme edici büyüme faktörü alfa (TGF- α), transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β), TNF- α gibi anjiyogenik faktörler salgılamalarını stimüle eder (36). Anjiyogenez için endotel hücre göçü önemlidir ve kemotaktik faktörler çok büyük öneme sahiptirler. Bu faktörler trombosit kökenli maddeler, heparin ve fibronektin olup, endotel hücrelerinin hareketini artırır. Endotel hücreleri tarafından üretilen fibronektin ve kollajen gibi maddeler de bu hücre hareketine yardımcı olurlar. Platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) damar düz kası gelişimini uyarır. Kollajen sentez ve yıkımı da vasküler bazal membran oluşumunu düzenler (37). Yara iyileşmesinde inflamatuvar hücre infiltrasyonu, proliferasyonu ve matriks oluşumu sonrası skar dokusu gelişir.

Bozulmuş anjiyogenez regülasyonu diyabetes mellitustaki birçok patolojinin nedenidir (15). Diyabetes mellituslu hastalarda retina ve böbrek vaskülopatisi, yetersiz yara iyileşmesi, transplante edilen organın rejeksiyon riskinin artması ve koroner kollateral oluşumunda yetersizlik gibi durumlar gözlenir. Diyabetes mellitusta gelişen bozulmuş anjiyogenik yanıtı açıklamak için bir çok mekanizma öne sürülmüştür: birincisi, endotelial ve vasküler düz kas bozuklukları ile karakterize vasküler disfonksiyonun varlığı, ikincisi, proteinlerin nonenzimatik glikozilasyonuna ve yeni kan damarlarının bozulmuş yapılanmasına neden olan kronik hiperglisemi maruziyeti ve son olarak diyabetin büyüme faktörü sinyali (38, 39) ve/veya ekspresyonunu (40) etkileyerek vasküler büyüme faktörlerinin lokal dengesini bozmasıdır. VEGF diyabetik retinopatide esas rolü oynar ve ekspresyonu bFGF, plasenta büyüme

faktörü 1 (PIGF-1), TNF, TGF- β , interlökin-1 (IL-1) gibi birçok faktör tarafından artırılır. Anormal anjiyogenezin eşlik ettiği diyabetik nefropatide VEGF lokal düzeyinin çok yükseldiği ve anjiyotensin II ekspresyonunun artmış olduğu tespit edilmiştir (22). Diyabetik ayak ülserleri, bası yaraları gibi kronik yaraların bulunduğu durumlarda kan akımındaki bozulma yara iyileşmesinde gecikmeye neden olabilir (35, 41). Son dönemde yeni kan damarı oluşumunu indüklemek ve lokal iskeminin dokularda neden olduğu olumsuz etkilerden kaçınmak amacıyla anjiyogenez ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (35, 42).

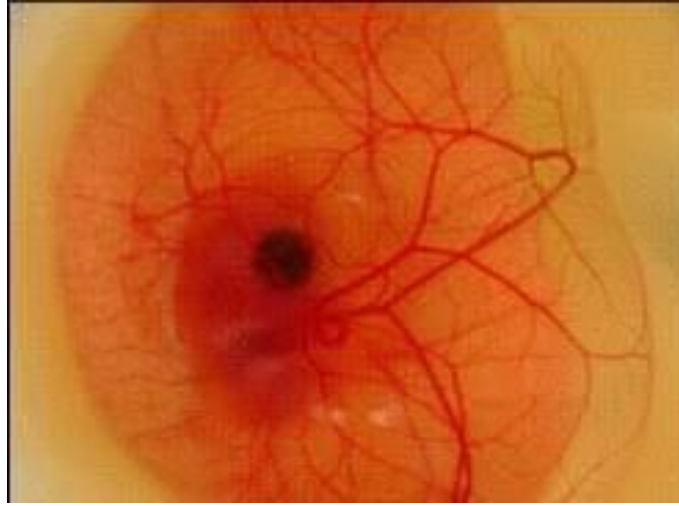
Romatoid artrit ve diğer inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde yeni damar oluşumu önemli rol oynar (16). Romatoid artritin sinovyumunun yüksek vaskülarize bir fenotipte olduğu bilinmektedir. İnflamasyon alanında lökositler ekstravaze olarak değişik eklemlerin sinovyumuna hasar verir. Anjiyogenik faktörlerin aşırı salınımı sinovite neden olacaktır. Diğer patolojilerde olduğu gibi burada da anjiyogenik faktörler olan VEGF, bFGF, TGF- β , TNF- α , IL-1 ve anjiyopoetinler önemli rol oynamaktadır.

2.2. Koryoallantoik membran modeli (KAM) Modeli

Anjiyogenezde kullanılan başlıca in vivo modeller tavuk embriyosu KAM modeli, tavşan kornea modeli (“micropocket”), rodent mezenter modeli, sünger (“sponge”) implant modeli, matrijel ve klasik tümör modeli ve zebrafish modelidir. Uygulanması en kolay, basit, tekrarlanabilir ve anjiyogenik yanıtın kantitatif ölçümüne imkan veren çalışma modellerinin tavuk embriyosu KAM modeli ve tavşan kornea modeli olduğu kabul edilmektedir (43, 44).

KAM modeli, ilk olarak 1956 yılında kanser ve metastaz konularında, sonrasında ise 1976 yılında Folkman (45) tarafından anjiyogenez çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır. Tavuk embriyosu modeli, tümör gelişimi, anjiyogenez ve tümör hücresi disseminasyonu üzerine in vivo çalışmalarda değerli bir yöntemdir. Doku kompozisyonu ve KAM’ın deneysel müdahaleler için kolay ulaşılabilir olması, tavuk embriyosu KAM modelini tümör hücrelerinin davranışını mikroskopik olarak izlemek için uygun bir yöntem haline getirmektedir (Tablo 2.1). Tavuk embriyosu model sistemi,

spontan metastaz modelinde tümör hücre intravazasyonu, deneysel metastaz modelinde tümör hücre kolonizasyonu ve kollajen modelinde tümörce indüklenmiş anjiyogenez gibi kanser hücresi disseminasyonunun spesifik evre ve yönlerinin ayrıntılı analizine imkan tanır. Ekstraembriyonik bir membran olan KAM, hem anjiyogenez hem de antianjiyogenez çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.3). KAM, tavuk embriyosu fizyolojisinde gaz alış-verişini sağlayan solunum organı ve atık ürünler için mesane işlevleri yürütmektedir (46).



Şekil 2.3. Tavuk embriyosu ve koryoallantoik membranın stereoskopik mikroskop altındaki görünümü.

Bu model sistemlerinin özü, primer tümör ve anjiyogenez için eşsiz bir ortam sağlayan özel bir dokunun, KAM'ın kullanılmasıdır. Tavuk embriyosu inkübasyonu sırasında, 5.-6. günlerde KAM, korion ve allantoisin birleşimi ile oluşur (46, 47). Embriyonun akciğerleri işlevini gören KAM hızla gelişir ve inkübasyonun 12. gününde tüm embriyoyu çevreler. KAM oldukça ince bir yapıdır, nadiren üç tabakanın toplam kalınlığı 100 μm 'u geçer. Parafin kesitlerinin hematoksil-eozin ile boyanması, bir veya iki katlı epitelyal tabaka ve sıklıkla eritrositlerce doldurulmuş olan ince sirküler açıklıklar olarak görünen kapiller pleksustan oluşan ektoderm, stromal hücreler, kollajen lifleri

ve ektodermin hemen altında yerleşik bulunan terminal kapillerler de dahil farklı çaplarda kan damarlarından oluşan mezoderm ve tek hücre tabakalı düz endodermi ortaya koyar. Ektoderm kapiller pleksus, tavuk embriyo metastazı ve anjiyogenez modelleri için KAM'ın en önemli histolojik özelliklerinden biridir.

KAM'da anjiyogenez, gelişimsel olarak 3 safhadan oluşur:

- Erken faz (5. günden 7. güne kadar)
- Ara faz (8. günden 12. güne kadar)
- Geç faz (12. veya 13. günden itibaren)

Kapiller ağın filizlenmeye başladığı dönem erken faza denk gelir. Ara fazda filizlenme sona erer ve mikrovasküler ağ gelişimi başlar. Geç fazda ise koryoallantoik ögeler genişlemesini tamamlar ve koruyucu bir membrana dönüşür. KAM modelinde uygulamalar 5. günden itibaren yapılabilir (48). Diğer bir görüş ise damarlanmanın olgunlaştığı 12. günden sonraki dönemin anjiyogenez çalışmaları için daha uygun olduğunu savunur (49).

Tablo 2.1. KAM modeliyle çalışmanın avantaj ve dezavantajları.

Avantajlar	Dezavantajlar
Teknik olarak basittir	Oksijen değişikliklerine hassastır
Ucuzdur	Yeni damar oluşumunun ayırt edilmesi güçtür
Temini kolaydır	Memeli olmayan bir modeldir
Geniş taramalar için uygundur	Embriyoniktir
Noninvaziv gözleme uygundur	Non-spesifik inflamatuvar reaksiyonlar vavındır
Sonuçları kolay ve çabuk değerlendirilebilir	Metabolik aktivasyona ihtiyaç duyan ilaç çalışmaları için uygun değildir
Memeli ksenograflarla uyumludur	
Etik kurul onayı gerektirmez	
Cerrahi girişimler için oldukça uygundur	

Kaynak 50'den alıntılanmıştır.

2.4. Lipid Profili Düzenleyici Ajanlar Olarak Statinler

2.4.1. Statinler

Statinler, 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-KoA) redüktaz enziminin substratı olan HMG-KoA'ya ve onun yarı indirgenmiş metabolitine yapısal olarak benzediklerinden; adı geçen enzimi kompetitif bir şekilde inhibe ederler (51). Bu olay sonucu, karaciğer hücrelerindeki kolesterol ve lipoprotein düzeyinin düşmesi, bu hücrelerin yüzeyindeki DDL (düşük dansiteli lipoprotein) reseptörlerinin dansitesinde (yoğunluğunda) artmaya (reseptör upregulasyonuna) yol açar. Böylece, söz konusu ilaçlar hem lipoprotein sentezini azaltmak ve hem de apo-B (apolipoprotein B) içeren lipoproteinlerin (başta aterosjenik DDL olmak üzere) karaciğer hücrelerine ve diğer hücrelere

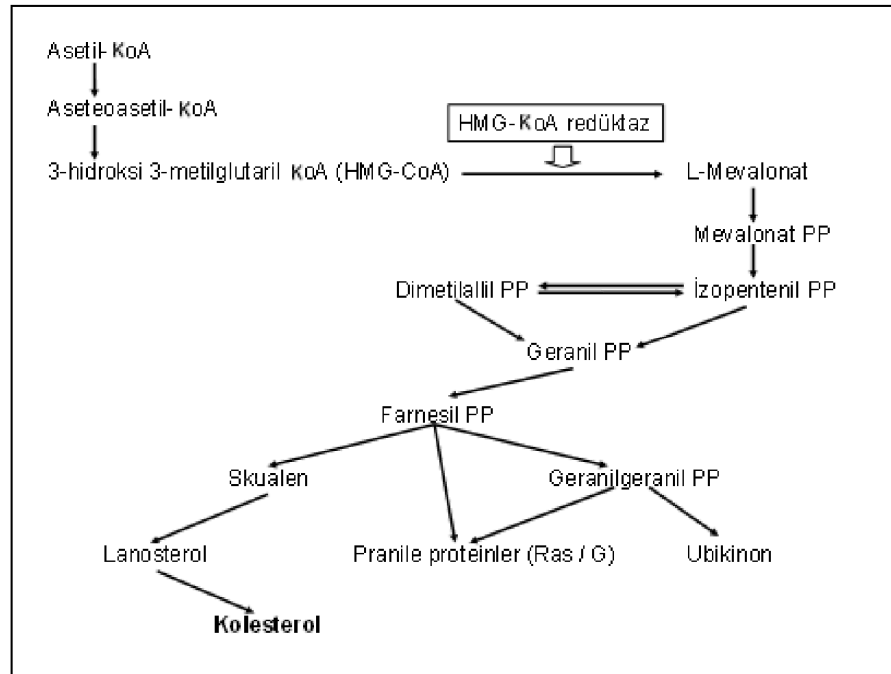
girişini ve orada yıkımını arttırmak suretiyle kanda DDL kolesterolü ve total kolesterol düzeyini düşürürler. Hipertrigliseridemiye de bir dereceye kadar düşürebilirler. Öte yandan antiaterojenik nitelikte olan YDL (yüksek dansiteli lipoprotein) düzeyinde artma yaparlar. Ancak hipertrigliseridemiye düşürücü ve YDL kolesterolünü yükseltici etkinlikleri diğer bir hipolipidemik ilaç grubu olan fibrat türevlerine göre daha düşüktür.

Statinler hiperkolesterolemi, familyal apo-B100 eksikliği ve hipertrigliseridemi ile hiperkolesteroleminin birlikte olduğu karma hiperlipidemiye bağlı koroner kalp hastalığı ve inmeye karşı primer ve özellikle sekonder profilaksi için kullanılırlar. Bu amaçla, statinler genellikle düşük dozda kullanılırlar. Statinlerin DDL düzeyinde yaptıkları düşme, iyon değiştirici reçinelerin yaptığından fazladır. Bu bakımdan halen en güçlü etki yapan ilaçlardır. Ailesel olmayan hiperkolesterolemi olgularında, lovastatin ile yapılan incelemeler bu ilacın DDL kolesterolü ve total kolesterol düzeyini % 31-40 oranında düşürdüğünü göstermiştir. Heterozigot ailesel hiperkolesterolemi olgularında da buna yakın (% 23-35) oranda düşme meydana gelir. Seyrek görülen ve diğer ilaçlara yeterli cevap vermeyen homozigot ailesel hiperkolesterolemili çocuk ve genç erişkinlerde total kolesterol düzeyinde yaptıkları düşme daha azdır (% 6-20); bu olgularda hepatositlerin DDL reseptörlerinin oluşmadığı dikkate alınır, cevabın düşük oluşu, söz konusu ilaçların terapötik etki mekanizmasında DDL reseptörü upregulasyon'unun katkısının önemini gösterir. Bu ilaçlar normal kimselerde de plazma kolesterol düzeyinde belirgin düşme yaparlar. Halen bir kısmı kullanımda olan farklı moleküler yapıda statinler bulunmaktadır. Mevastatin bu ilaçların bir prototipi olarak kabul edilmektedir (Tablo 1).

Tablo 2.2. Doğal ve sentetik statinler.

Doğal/Yarı Sentetik	Sentetik
Mevastatin	Fluvastatin
Lovastatin	Atorvastatin
Simvastatin	Serivastatin
Pravastatin	Rosuvastatin
	Pitavastatin
	Nisvastatin
	Krinvastatin

Oral olarak alınan statinler etkilerini HMG-KoA redüktaz enzimini kompetitif bir şekilde inhibe ederek gösterirler. Bu enzim HMG-KoA'nın L-mevalonat'a dönüşmesini katabolize eder ve bunun inhibisyonu sonucu statinler L-mevalonat'ın oluşturacağı kolesterolü önlemiş olur (Şekil 1).



Şekil 2.4. Asetil KoA'dan kolesterole dönüşüm şeması. KoA: koenzim A, PP: pirofosfat

Statinler elde edilişleri, karaciğer metabolizması, fizikokimyasal özellikleri ve spesifik aktivitelerine göre çeşitli şekillerde sınıflandırılmıştır (52).

Farmakolojik özelliklerine göre 9 farklı HMG-CoA redüktaz inhibitörü mevcuttur (53, 54, 55). Bunlar lovastatin, mevastatin (compactin), pravastatin, simvastatin, fluvastatin, atorvastatin, rosuvastatin, pitavastatin ve cerivastatindir. Lovastatin, pravastatin, mevastatin ve simvastatin mantar fermantasyonundan sonra elde edilen doğal statinlerdir. Fluvastatin, atorvastatin, rosuvastatin, pitavastatin ve cerivastatin ise kimyasal sentez yoluyla elde edilir (53, 54). 2001 yılında 31 hastanın rabdomiyolizin (kas liflerinin bütünlüğünün bozulması) neden olduğu akut renal yetmezlik nedeniyle ölmesi nedeniyle cerivastatin dünya farmasötik marketinden kaldırılmıştır. Sonuç olarak şu anda klinik kullanımında sadece 8 statin vardır. Bunlar; lovastatin, mevastatin, simvastatin, pravastatin, atorvastatin, rosuvastatin, pitavastatin ve fluvastatindir (53, 52, 55).

Statinlerin elde ediliş yolunun farklı davranış mekanizması yaratabileceği ileri sürülmüştür. Fakat sentetik olarak üretilen statinlerin doğal statinlerden daha az etkili olduğunu gösteren herhangi bir bilgi mevcut değildir (54).

Doğal statinler kimyasal yapılarına bağlı olarak oldukça benzer olmalarına rağmen bunların arasından simvastatinin, lovastatin ve pravastatinden yaklaşık olarak iki kat daha güçlü olduğu bildirilmiştir (56, 53).

Karaciğer metabolizması:

Bütün statinler için hedef organ karaciğerdir ve hepatositleri hedeflemektedirler (52, 54). Üretim şekli ne olursa olsun bütün statinler karaciğer yoluyla benzer şekilde metabolize olurlar (54). Fluvastatin ve lovastatininin %70'inden fazlası, simvastatinin %80'inden fazlası ve pravastatinin %46'sı karaciğerde tutulmaktadır. Statinlerin çoğu dolaşımda düşük konsantrasyonda bulunurlar. Atorvastatinin %12, pravastatinin %17, fluvastatinin % 20-30, simvastatin ve lovastatinin %5, cerivastatinin

%60'ından fazlası dolaşımda bulunur (57, 52, 54). Dolaşıma geçen statinlerin farmakolojik etkisi oldukça düşüktür (58).

Fizikokimyasal özellikleri:

Lovastatin, simvastatin, atorvastatin ve cerivastatin lipofiliktir (53,59). Pravastatin ve rosuvastatin oldukça hidrofiliktir (53). Fluvastatin ise her iki özelliğe de sahiptir (52). Simvastatin ve atorvastatin gibi lipofilik statinler hücre içine girmek için hücre membranından kolayca geçebilirler. Hidrofilik statinlerin ise hücre içerisine girebilmek için spesifik taşıyıcı mekanizmalara ihtiyacı vardır (56).

2.4.2. Statinlerin pleiotropik etkileri

Statinlerin inhibe ettiği HMG-CoA redüktaz reaksiyonunun ürünü olan mevalonat, sadece kolesterol için değil aynı zamanda farnesil pirofosfat (FPF) ve geranilgeranil pirofosfat (GGPF) gibi birçok nonsteroidal izoprenoidik bileşikler için de öncüdür. Klinik çalışmalara ve yapılan diğer temel çalışmalara göre bu enzimin inhibisyonu nedeniyle statinlerin kolesterol düşürme etkilerinden bağımsız olarak çeşitli yararlı etkileri bulunmaktadır. Bu yararlı etkiler ‘‘pleiotropik etkiler’’ olarak adlandırılmaktadır (53, 60, 52). Statinlerin pleiotropik etkileri nedeniyle klasik endikasyonları dışında da kullanımları söz konusu olabileceği belirtilmiştir (61). Statinlerin tanımlanmış başlıca pleiotropik etkileri şunlardır:

1. Koroner arter hastalığı riskinde azalma (56).
2. Aterosklerotik lezyonların boyutunda ve miyokard infarktüsü geçirme riskinde azalma (53).
3. Trombosit agregasyonu ve trombus birikiminde azalma (56).
4. Anjiogenezde artma (56).
5. Anjiogenezde azalma (56).
6. Alzheimer hastalığında azalma (56,53).
7. Antiinflamatuvar özellik (56).
8. T lenfosit aktivasyonunda azalma (immunosupresif özellik) (56).

9. Kemik oluşumunda artma(kemik anabolik özellik) (56).
10. Osteoklast oluşumunda azalma (56).
11. Antioksidan etki (60).
12. Tümör hücrelerinin gelişimini ve metastazını engelleme(antitümör etki) (53, 60, 52).
12. Serebral damarlarda ateroskerozu azaltarak felç ve iskemik atak insidansında azalma (62, 60).
13. Nefropati gelişiminde azalma (63).
14. Diyabet gelişiminde azalma (63).

2.4.3. Statinler ve Anjiogenez

HMGCöA redüktaz inhibitörleri olarak da bilinen statinler koroner arter hastalığı riski olan hastalarda sıkça reçete edilen ilaçlardır. Son dönemde yapılan çalışmalar statinlerin koroner arter hastalığının hem pirimer hem de sekorder önlenmesinde faydalı olduklarını göstermektedir (64). Ayrıca çalışmalar statinlerin kolesterolü düşürmek dışında da kardiyovasküler sistemi koruyucu ek etkilerinin olabileceğini göstermektedir (65). Statin uygulamasının kısa sürede vazomotor yanıtları güçlendirdiği gösterilmiştir (66, 67). Hayvan çalışmaları da statinlerin vasküler endotelial hücreler üzerinde olumlu etkilerinin olduğunu göstermektedir (68,69). Bu kavram normokolestolemik hastalarda statinlerin stroka karşı koruyucu olduğunu (70), statinlerin iskemik reperfüze edilen kalbi koruduğunu (71) ve mikrosirkülasyonda vasküler inflamatuvar yanıtları azalttığını (72) gösteren çalışmalar ile desteklenmektedir. Bu hipotez iskemik reperfüze edilen myokardiyumda HMGCöA redüktaz inhibiyonunun eNOS bağımlı bir mekanizma ile myokart hasarını önlediğini gösteren bir çalışma ile uyumludur (73,74). Endotel kaynaklı nitrik oksit büyük kan damarlarında temel gevşetici faktördür. eNOS'un salınımı aterojenik damarlarda (75) ve iskemi reperfüzyon hasarından sonra bozulur (72).

Statinlerin Pro-anjiogenik etkileri:

Birçok hayvan çalışmasında statinlerin düşük dozlarının anjiogenezi aktive ettiği gösterilmiştir (76, 77, 78, 79). Çalışmalardan biri statinlerin iskemiye bağlı kolletral büyümesindeki artışta eNOS'un önemli bir faktör olduğunu göstermiştir (77). Statinler ayrıca in-vitro Akt bağımlı mekanizmalar ile kemik iliği kaynaklı endotelial progenitör hücrelerin büyümelerini artırmakta ve endotelial progenitör hücrelerin neovaskülerizasyon sahasındaki bütünleşmelerine katkıda bulunmaktadır (79, 80, 81). Statin uygulamaları hücrelerin apoptoz benzeri sessiz bir duruma geçmelerini engeller, endotelial progenitör hücrelerin proliferasyonlarını artırır (82), stabil koroner arter hastalarında dolaşımdaki CD34 pozitif endotelial progenitör hücreleri prolifer eder (83). Benzer bir çalışmada Walter ve arkadaşları statin tedavisinin endotelial progenitör hücreleri mobilize ettiğini ve hayvan modelinde karotid balon hasarı oluşturulmasının ardından endotelizasyonu hızlandırdıklarını göstermişlerdir.

Statinlerin Anti-anjiogenik Etkileri:

Statinlerin yukarıda belirtilen anjiogenik etkilerine karşın, HMGCoA redüktaz inhibitörü serivastatin'in (25 ng/ml) endotel hücre migrasyonunu inhibe ettiği (84), endotel hücre proliferasyonunu in-vitro, anjiogenezi de in-vivo olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (85). Serivastatinin bu etkisini kolesterolden bağımsız bir şekilde, Rho/fokol adezyon kinaz/Akt sinyal yolağı üzerinden yaptığı düşünülmektedir (85). Bu bulgular Park ve arkadaşlarının (86) statinlerin (5 micromol) küçük bir guanozin trifosfat bağlayıcı protein olan RhoA ile etkileşime girerek anjiogenezi inhibe ettiğini gösterdikleri çalışmaları ile uyumludur.

Statinlerin Bifazik Etkileri:

Son dönem çalışmalar statinlerin anjiogenez üzerinde in-vivo olarak doza bağımlı, bifazik bir etkilerinin olduğunu göstermektedir (78). Düşük dozlarda statinler anjiogenezi indüklerken yüksek dozlarda inhibe etmektedirler. Antianjiogenik veriler ile statinlerin iyi bilinen klinik faydaları arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarabilmek amacıyla atorvastatinin endotel hücre

migrasyonu, anjiogenez ve eNOS aktivasyonu üzerindeki etkileri doza bağımlı olarak araştırılmıştır (80). Bu araştırma sonuçları atorvastatinin düşük dozlarının endotelial hücrelerde ve endotelial progenitör hücrelerde PI 3-kinaz-Akt yolağı ve eNOS un Akt bağımlı sinyal yolağı ile aktivasyonunun anjiogenik süreci tetiklediğini göstermektedir. Buna karşın atorvastatinin yüksek dozlarının endotelial hücrelerde apoptozis yaparak anjigenezi inhibe ettiği gösterilmiştir.

Statinlerin Rho'nun geraniil-gerani'asyonunu engellediği bilinmektedir (87) ve bu da eNOS ekspresyonunda artışa neden olmaktadır (88,89). İlginç şekilde Urbich ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada eNOS mRNA'sının statinlerin yüksek dozlarında stabilize olabildiğini göstermişlerdir (80). Bu veriler statinlerin pro-anjiogenik etkilerine transkripsiyon seviyelerindeki artıştan daha ziyade eNOS'un fosforilasyonunun aracılık ettiğini göstermektedir. Bu hipotez Kureishi ve arkadaşlarının çalışmaları ile de uyumludur. Kureishi ve arkadaşları (76) yapmış oldukları çalışmalarda statinlerin eNOS fosforilasyonunu ve NO üretimini artırdıklarını fakat toplam eNOS protein seviyelerine bir katkıda bulunmadıklarını göstermiştir. Statinlerin endotelial hücre biyolojileri üzerindeki bifazik aktiviteleri mevalonik asitten köken alan biyosentetik yolların özellikleri ile açıklanabilir. Kolesterol ek olarak, mevalonik asit ubiğin ve benzer yapıdaki birçok hücrel komponent için prekürsör görevi yapmaktadır. Mevalonattan köken alan ara ürünler non-sterol ürün oluşumunu katalize eden enzimler için kolesterol biyosentetik enzimlerden daha yüksek bir afiniteye sahiptir. Üstelik düşük doz statinler kolesterol sentezini güçlü şekilde etkilemektedirler ve hücrel rutin fonksiyonların yerine getirilmesi ile görevli non-sterol moleküller üzerinde bir etkileri bulunmamaktadır (90). Sadece yüksek doz statinler non-sterol ürünlerin sentezini de inhibe etmektedir.

Lipitlerin hücre sinyal mekanizmalarındaki önemi her geçen gün daha iyi anlaşılmaktadır (91,92). Bu bağlamda, yağ asitleri Akt aktivasyonunu engellemekte ve statin-bağımlı kolesterol azalması Akt aktivasyonunu artırmakta, aktive olmuş endotelial hücrelerdeki farklı membran

parçacıklarının translokasyonlarını sağlamaktadır (93). Bu verilerin bir kısmı endotel hücrelerdeki kolesterol havuzunun ani bir şekilde değişmesi Akt sinyal yolağının regülasyonu ile ilişkili olabilir. Bu veriler endotel hücrelerdeki kolesterol havuzundaki değişimlerin serumdaki LDL tarafından sağlanan kolesterol ürünlerinden daha ziyade statinler aracılığı ile inhibe edilen endojen kolesterol sentezinden etkilendiğini göstermektedir.

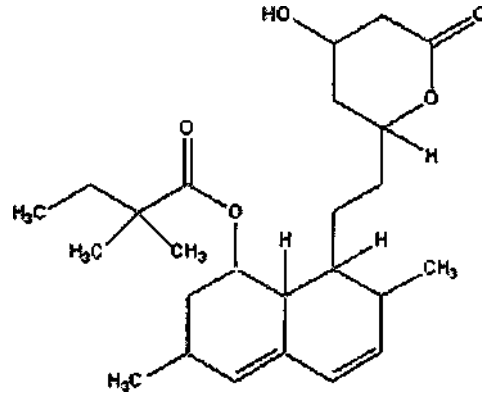
Üstelik endotel hücrelerdeki kolesterol sentezinin statinler tarafından inhibe edilmesi membranlardaki kolesterol konsantrasyonunu da etkileyecektir. Bu olay da ilgili bölgelerde Akt birikimine yol açacaktır. Bu etkilere muhtemelen PI 3-kinazın aracılık ettiği düşünülmektedir (76) çünkü membradaki Akt aktivitesi PI 3-kinaz inhibitörleri ile engellenebilmektedir (93).

2.4.4. Simvastatin

Simvastatin, karaciğerde hidroliz sonucu aktif metaboliti olan p-hidroksiasid formuna dönüşerek etkisini gösteren ve CYP3A4 enzimleri ile metabolize edilen bir ön ilaçtır (94, 95).

Simvastatin, hiperkolesterolemi tedavisinde kullanılan, 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-KoA) redüktaz inhibitörü bir ön-ilaçtır. *Aspergillus terreus*' un fermantasyon ürününden sentetik olarak elde edilmektedir. İnaktif lakton formunda olan simvastatin, oral yoldan uygulandıktan sonra hidroliz edilerek aktif olan (3-hidroksi asid şekline dönüştürülür (94, 96).

Simvastatinin açık kimyasal adı butanoik asit, 2,2-dimetil - 1,2,3,7,8,8a -heksahidro - 3,7 -dimetil -8- [2-(tetrahidro-4-hidroksi-6-okso-2H-piran-2-il)-etil] -1-naftalenil ester, [1S*-[1a,3a,7(3,8p (2S*,4S), -8aP)]]'dir. Kapalı formülü C₂₅H₃₈O₅ olan simvastatinin molekül ağırlığı 418.57 gramdır. Beyaz, nonhigroskopik kristal toz şeklindedir. Kloroform, metanol ve etanoldeki çözünürlüğü iyi iken suda çözünmez. Lipofilik özellikteki simvastatinin pH 7 deki pKa değeri 5.5, lakton şeklinin yağ/su dağılım katsayısı (logP_{oct/su}) 4.7, hidroksi asit şeklinin ise 2.1'dir (97, 94, 98).



Şekil 2.5. Simvastatinin kimyasal yapısı

Simvastatin, insanda, hepatik ve ekstrahepatik kolesterol biyosentezinde hız-kısıtlayıcı basamağı oluşturan HMG-KoA'nın, mevalonata dönüşmesini katalize eden HMG-KoA redüktaz enzimini kompetitif olarak inhibe ederek etki gösterir. İnhibisyon sonucunda karaciğer hücrelerindeki kolesterol ve lipoprotein düzeyinin düşmesi, bu hücrelerin yüzeyindeki düşük dansiteli lipoprotein (DDL) reseptörlerinin yoğunluğunun artmasına neden olur. Bu şekilde kolesterolün karaciğer ve diğer hücrelere girişi ve burada yıkımı artar. Ayrıca, kolesterolün dokulardan karaciğere geri taşınmasını ve metabolizmasını sağlayarak, plazmanın kolesterol ve trigliseridlerden temizlenmesinde rol oynayan yüksek dansiteli lipoprotein (YDL) düzeylerini artırır. Sonuç olarak kandaki total ve DDL kolesterol düzeyi azaltılmış olur (99, 95).

Oral yoldan, lakton şeklinde uygulanan simvastatin, gastrointestinal kanaldan yaklaşık olarak %60-80 oranında absorbe edilerek karaciğer ve plazmada, karboksiesterazlar tarafından, inaktif lakton formundan aktif B-hidroksi asid metabolitine dönüştürülür. Absorpsiyon oranının yüksek olmasına karşın, simvastatinin, sağlıklı gönüllülere oral olarak uygulanmasını takiben, B-hidroksi asid formunun absölu biyoyararlanımı %5'dir (95). Biyoyararlanımının düşük olması, gastrointestinal sıvılardaki çözünürlüğünün

ve mukozal membranlara permeabilitesinin düşük olmasına bağlansa da, başlıca nedeni barsak duvarı ve karaciğerde CYP3A4 enzimleri aracılığıyla ilk-geçiş etkisine uğramasıdır. Ayrıca, P-gp'ye bağlı sekresyonun da biyoyararlanımının düşük olmasında rolü olduğu düşünülmektedir (100,101). Sağlıklı gönüllülerde ve hiperkolesterolemili hastalarda yapılan çalışmalar, simvastatin uygulanmasından sonra, aktif metabolitlerinin plazmadaki maksimum konsantrasyonlarına (C_{max}) 1.1 ile 3 saat arasında ulaştıklarını göstermektedir (95). Etkiden sorumlu başlıca metabolit olan hidroksi asid simvastatinin plazmadaki maksimum konsantrasyonu (C_{max}) 58.1u.g/L, maksimum konsantrasyona ulaşma süresi (t_{max}) ise 1.2 saattir. Az yağlı diyet simvastatinin intestinal emilimini etkilemez iken daha yağlı diyetin ne şekilde etkilediği bildirilmemiştir (97).

Hiperkolesteroleminin eşlik ettiği homozigot ve heterozigot familial (primer) hiperkolesterolemi, hipertrigliseridemi ile hiperkolesteroleminin birlikte olduğu karma hiperlipidemilerde kullanılır. Uzun süreli denemelerde ateroskleroz gelişmesini yavaşlatarak koroner arter hastalığı gelişme riskini azaltırlar. Akut myokard enfeksiyonu geçirmiş hastalar da dahil, koroner arter hastalığı bulunanlarda, sekonder profeksi sağladıkları, kardiyovasküler olay insidansını ve mortaliteyi azalttıkları gösterilmiştir. Serebral damarlarda ateroskleroz gelişmesini yavaşlatarak inme ve geçici iskemik atak insidansını azaltırlar (99,95).

2.4.5. Mevastatin

Mevastatin 1978 yılında *Aspergillus terreus* (102), 1979 yılında da *Monascus ruber* (103) isimli mantarlardan elde edilen, lovastatin, mevinolin ve monacolin K isimleriyle de bilinen bir moleküldür. Mevastatin kolesterol biyosentezindeki hız kısıtlayıcı basamak olan (3S)-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) redüktazı inhibe ederek hiperkolesterolemi tedavisinde kullanılan bir ajandır (103). Mevastatin doğal bir statin olduğu için yarı sentetik statinlerin sentezlenmesinde de kullanılabilir.

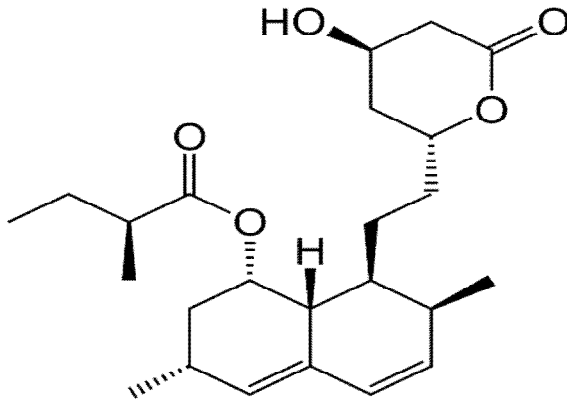
Seksenli yılların başlarında gerçekleştirilen küçük çaplı klinik çalışmalar mevastatinin yüksek riskli hastalarda kullanıldığı zaman dramatik bir LDL kolesterol düşüşü sağladığını göstermiştir. Yan etkilerinin de düşük olması sebebiyle, mevastatinin etkinliğiyle ilgili daha geniş klinik çalışmalar yapılmıştır. Tolerabilitesinin de iyi olmasının anlaşılmasından sonra mevastatin FDA tarafından onaylanmıştır. Mevastatin FDA tarafından onaylanan ilk statin olması bakımından da önem taşımaktadır (104).

Mevastatin HMG-CoA'nın mevalonata dönüşümünü katalizyelen enzim olan HMG-CoA redüktazı kompetitif olarak inhibe ederek mevalonat oluşumunu engeller. Mevalonat bloklar oluşturarak kolesterol oluşumunu sağladığı için mevastatin bu döngüde araya girerek kolesterol sentezini baskılamış olur. Mevastatinin doğal olarak bulunan formu tam olarak aktif bir form değildir. Organizma içinde hidrolize olarak β -hidroksi asit formuna dönüşür ki bu form asıl aktif olan formudur (105).

Mevastatin total kolesterolü düşürmesinin yanında dolaşımda bulunan LDL parçacıklarının da azalmasını sağlamaktadır. Mevastatin tedavisi boyunca Apoprotein B seviyeleri kademeli olarak düşmektedir. Mevastatin LDL düşürücü etkisini LDL'nin prekürsörü olan VLDL'yi düşürerek göstermektedir. Ayrıca mevastatin hücre membranlarındaki LDL reseptörlerinin miktarını artırarak dolaşımdaki LDL'nin hücre içine alımını da artırmaktadır. Ayrıca mevastatinin minimal de olsa HDL'yi artırabildiği ifade edilmektedir. Fakat tüm lipit profili üzerindeki etki düşünülecek olursa, HDL'yi artırıcı etki önemsiz gibi görünmektedir. Hem mevastatin hem de metabolitleri plazma proteinlerine yüksek oranda (>%95) bağlanmaktadır. Hayvan çalışmaları mevastatinin kan beyin bariyerini de geçebildiğini göstermektedir (106).

Son dönemde yapılan çalışmalar diğer statinler gibi mevastatinin de belirli kanser türlerinde kemopeventiv ve kemoterapötik olarak kullanılabileceğini ifade etmektedir (107). Temel de diğer statinler gibi mevastatin de proteazom aktivitesini azaltır. Bu da p21 ve p27 gibi siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin birikimine ve meme kanseri gibi kanser

türlerinde G1 fazında blokasyon oluşmasına neden olur. Bu özellikleri nedeniyle mevastatin kanser araştırmalarında deneysel olarak kullanılmaya başlanmıştır (108).



şekil 2.6. Mevastatinin kimyasal yapısı

2.5. Bevasizumab

Solid tümörlerin varlığını sürdürebilmesi, büyümesi, invazyon ve metastaz yapmasındaki öneminden dolayı, anjiyogenezin inhibe edilmesine yönelik tedaviler tümör tedavisinde gittikçe artan bir biçimde yer almaktadır. Bu amaçla kullanılan ilaçlar içerisinde en çok tercih edilenleri VEGF ve VEGF reseptörleri inhibitörleridir, bunlar VEGF'ye ve VEGF reseptörlerine bağlanan monoklonal antikorlardır (73). Bevasizumab rekombinant humanize edilmiş monoklonal bir IgG1 antikorudur ve VEGF'nin nonspesifik bir inhibitörüdür.

Anjiyogenik faktörler arasında endotelial hücre mitojenlerinin en potent ve spesifik olanı VEGF'dir (74, 75). VEGF, greft edilmiş ve doğal olarak oluşmuş tümörlerce en çok üretilen, damar endotel hücrelerine özgü, homodimerik glikoprotein yapısında, 45 kiloDalton (kDa) büyüklüğünde heparin-bağlayıcı bir büyüme faktörüdür (76). VEGF, anjiyogenez ve lenfanjiyogenezini stimüle eder ve vasküler permeabiliteyi artırır (77). Ayrıca, endotel hücrelerinin migrasyonunu stimüle eder ve MMP'lar ile uPA ve tPA salınımını uyararak hücre dışı matriks yıkımına yol açar. Bu durum tümör invazyon ve metastazına neden olur (78). VEGF reseptörlerinin aktivasyonu hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile ederek endotel hücrelerinin

proliferasyonunu, migrasyonunu ve farklılaşmasını sağlar (79). VEGF ile uyarım sonucu oluşan NO, endotel hücre migrasyonunda rol alır (80, 81).

VEGF, yedi üyeden oluşan bir büyüme faktörü ailesini temsil eder: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F ve PlGF-1 ve 2 (8, 82). Bu faktörlerin VEGF reseptörlerine bağlanma özellikleri farklıdır.

VEGF-A. Genellikle yalnızca VEGF olarak ifade edilir. VEGF-A, 43-46 kDa ağırlığında homodimerik bir glikoproteindir (83, 84). Anjiyogenezle en güçlü ilişkisi olan ve üzerinde en çok çalışma yapılan faktördür, patolojik anjiyogenezde de rol oynar ve hipoksi ile aktive olduğu gösterilmiş tek VEGF üyesidir. Bu nedenle anti-VEGF tedavilerin çoğu bu faktör üzerine yoğunlaşmaktadır (85). VEGF-A'nın içerdikleri aminoasit sayısına göre adlandırılan üç ana izoformu mevcuttur. Bunlardan VEGF121 ve VEGF165 dolaşımda bulunan asıl formlardır (86-88).

VEGF-B. Endotel hücre fonksiyonunu düzenler. Hücre dışı matriks degradasyonu, hücre adezyonu ve göçünde rol oynar. Kalp, iskelet kası ve pankreasta fazla miktarda bulunur (89).

VEGF-C ve VEGF-D. Lenfanjiyogenezini düzenlerler (90). VEGF-C aynı zamanda yara iyileşmesi üzerine etki eder (85).

VEGF-E ve VEGF-F. VEGF-A'nın insan dışı canlılardaki homologlarıdır (91).

PlGF-1 ve 2. Hematopoetik kök hücre toplanması için gereklidir (92). Endotel hücrelerinde en çok bulunan VEGF üyesi olan PlGF, VEGF-A'ya bağlı endotel hücre çoğalmasını indükler (85, 93).

VEGF ailesi üyeleri VEGF reseptörlerine bağlanarak etki ederler. Bu reseptörler ilk kez endotel hücreleri üzerinde saptanmışlardır (89). Endotel hücrelerinde transmembran proteini olarak bulunan bu reseptörlerin VEGF eksprese eden hücrelerle yakın komşuluk içerisinde olmaları, VEGF'nin jukstakrin/parakrin sinyal yolağıyla fonksiyon gösterdiğine işaret etmektedir (3). VEGF reseptörleri; VEGF reseptör 1 (VEGFR-1, Flt-1 ya da fms-benzeri tirozin kinaz-1), VEGF reseptör 2 (VEGFR-2, Flk-1/KDR ya da fetal liver

kinaz-1/ kinase domain region), VEGF reseptör 3 (VEGFR-3, Flt-4, fms-like tyrosine kinase 4), nörofilin-1 ve nörofilin-2 reseptörleridir (89, 94-96).

VEGFR-1'in pozitif ve negatif anjiyogenik etkisi vardır (97). Endotel hücrelerinde, makrofajlar, monositler, hematopoetik kök hücreleri, damar düz kas hücreleri, perisitler, osteoblastlar, ve kolorektal tümör hücrelerinde bulunur (89). VEGFR-2, VEGF-A'nın anjiyogenik, mitojenik ve vasküler permeabilite artışı etkilerinden sorumludur. Endotel hücre büyümesi, farklılaşması ve göçünü düzenler (97). Endotel hücrelerinde, megakaryositlerde, hematopoetik kök hücrelerde, damar düz kas hücrelerinde, retina öncesi hücrelerde ve bazı tümör hücrelerinde (küçük hücreli olmayan akciğer tümörleri, nöroblastom, meme ve mide kanserlerinde) bulunur (89). VEGFR-3, primer olarak lenfatik damarlardaki anjiyogenik etki ile ilişkilidir (93, 98, 99). Nörofilin-1, VEGF165'in VEGFR-2'ye ilgisini artırma işlevinde bulunur (91). Endotel hücrelerinde, nöronlarda ve aynı zamanda tümör hücrelerinde bulunur (89, 100). Nörofilin-2, VEGF165, VEGF145 ve PlGF'yi bağlar (89). VEGF-A, VEGFR-1 ve VEGFR-2'ye, VEGF-B, VEGFR-1'e, VEGF-C ve VEGF-D, VEGFR-1 ve VEGFR-2'ye, PlGF ise VEGFR-1'e bağlanır.

VEGF düzeyi, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER-2), RAS, SRC onkogenleri, p53 gen mutasyonu, PDGF, TGF- β , insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), TNF- α , interlökin-1 β (IL-1 β), interlökin-6 (IL-6), interlökin-10 (IL-10), interlökin-13 (IL-13), hipofiz hormonları ve nitrik oksit (NO) gibi birçok endojen ajan ile düzenlenmektedir (76, 91, 101). Salınımı oksidatif stres ile artan hipoksiyle indüklenebilir transkripsiyon faktörü-1 (HIF-1) de VEGF salınımına yol açar (74, 75, 101,109).

Bevasizumab insan IgG1 iskeleti (% 93) ve fare VEGF-bağlayan tamamlayıcı-belirleyici bölgeler içerir (% 7), bu bölgeler VEGF-A izoformlarının endotel hücre yüzeyinde yer alan reseptörlere (VEFR-1) bağlanmasını engelleyerek VEGF'nin biyolojik aktivitelerini inhibe eder. Kanser tedavisinde kullanılmak üzere onay almış ilk antianjiyogenik ajan olan bevasizumabın, faz I çalışmalarında kemoterapi ile birlikte kullanıldığında serum VEGF seviyelerini ölçülemeyecek seviyelere kadar düşürdüğü ve farklı

tümörlerde büyümei inhibe ettiği saptanmıştır (110). Faz III randomize çalışmalarda bevasizumabın ilerlemiş kolorektal kanser, meme kanseri ve küçük hcreli dışı akciğer kanserinde kemoterapi ile kombine edildiğinde, yalnızca kemoterapiyle karşılaştırıldığında terapötik yarar sağladığı gösterilmiştir (110-114). Kolorektal kanserli hastalarda 5-florourasil, lökoverin ve oksaliptatin tedavisine eklendiğinde sağ kalımı artırdığının gösterilmiş olmasından sonra, 2006 yılında bevasizumabın metastatik kolon ve rektum kanseri tedavisinde kullanımı onaylanmıştır. İleri evre metastatik meme kanserinin tedavisinde de kemoterapiye ek olarak kullanılmaya başlanan ilacın renal hcreli karsinom, pankreas kanseri, over kanseri ve hormona yanıt vermeyen prostat kanserinde klinik etkinliğine dair çalışmalar devam etmektedir (114). Bevasizumab, genel olarak güvenli kabul edilen bir ilaç olup, kombine edildiği kemoterapötik ilaçların yan etkilerinde ciddi bir artışa neden olmaz. En sık bildirilen yan etkiler proteinüri, hipertansiyon, tromboz, kanama eğilimi ve yara iyileşmesinde gecikmedir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Pelletlerin Hazırlanması

Anjiyogenez üzerindeki etkilerini değerlendirmek üzere çalışmamızda birer statin olan, simvastatin ve mevastatin (Sigma St. Louis, MO, USA) ve bir VEGF monoklonal antikoru olan bevasizumab (Altuzan® 400 mg/16 ml flakon, Roche Müstahzarları Sanayi Anonim Şirketi, İstanbul) kullanılmıştır. İlaçlardan simvastatin ve mevastatin steril distile suda çözülerek hazırlanırken, bevasizumabın kendi sunum formu çözünmüş infüzyon solüsyonu şeklinde idi. İlaçların uygulamasında üç değişik konsantrasyon (10^{-4} M, 10^{-5} M ve 10^{-6} M) kullanılmıştır. Bu konsantrasyonlar ön çalışmalarda denenen değişik konsantrasyonlarda elde edilen submaksimal etki sağlayan konsantrasyonu (10^{-4} M) ve klinikte reçete edilen ilaçların vücutta ulaşmış oldukları etkin konsantrasyon olan 10^{-6} M konsantrasyonu da içermesi bakımından tercih edilmiştir. İlaçların önce 10^{-4} M konsantrasyonları hazırlanmıştır. Daha dilüe konsantrasyonlar 10^{-4} M'lık stok solüsyonun seyreltilmesi ile elde edilmiştir. Simvastatin ve mevastatinin 1:1 kombinasyonları, simvastatin ve mevastatinin tek başlarına 10^{-4} M konsantrasyon oluşturan miktarlarının yarısının birlikte uygulanmasıyla oluşturulmuştur. Diskin 10 µL'lik final hacminde 10^{-4} M'lık ilaç konsantrasyonunu sağlayacak ilaç miktarını bulabilmek için klasik molarite formülü kullanılmıştır ($M=m/V$). Her çalışma setinde kayıplar da göz önüne alınarak yaklaşık olarak 90 disk hazırlanarak uygulanmıştır. Bu nedenle, her ilaç için yaklaşık 1 mL'lik agar ve ilaç karışımı hazırlanmıştır (10 µLx100=1mL).

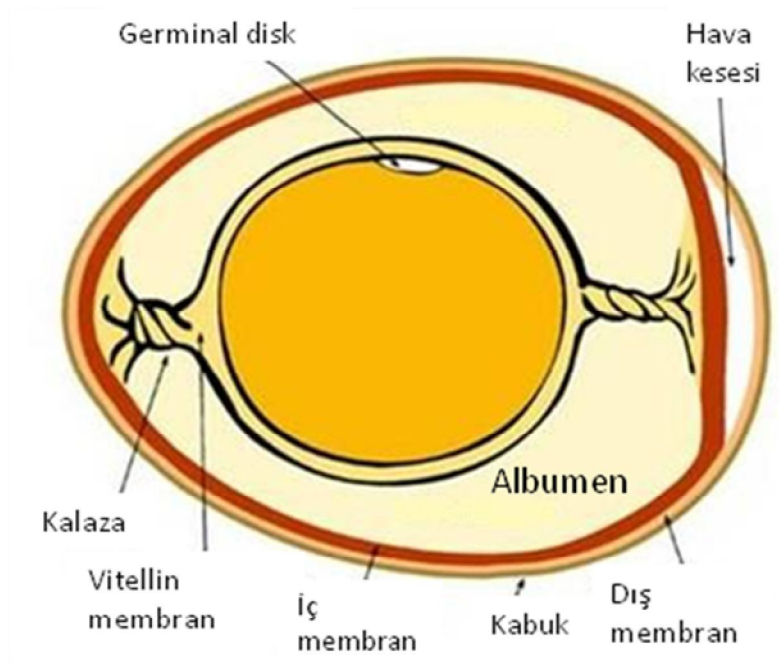
Kolay uygulama için, solüsyonların pelletleri 5 mm çaplı sirküler paslanmaz çelik yüzeyde 10 µl'lik damlalar şeklinde hazırlanmış ve hızla oda ısısına bırakılarak katılaştırılmıştır.

3.2. KAM Deneyi

Ross 308 cinsi döllenmiş tavuk yumurtaları Yemsel Tavukçuluk Hayvancılık Yem Hammaddeleri Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi'nden

(Kayseri) edinilmiştir. Çalışmamız için Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurul'undan 07.01.2010 tarihli ve 6 sayılı etik kurul onayı alınmıştır.

Dölllenmiş tavuk yumurtaları 37,5 °C'de %80 rölatif nemli ortamda horizontal pozisyonda inkübe edilmiştir (Şekil 3.1 ve 3.2). Kuluçkanın beşinci gününde yumurtanın künt tarafından enjektör yardımıyla 5-10 ml albumin alınmış ve yumurtanın diğer ucundan 2-3 cm çapında kabuk kesilerek çıkarılmıştır. Kabuktaki bu açıklık laboratuvar filmi ile kapatılarak 72 saat daha inkübe edilmiştir (Şekil 3.3). KAM yaklaşık 2 cm çapa ulaştığında her bir yumurtaya bir pellet olacak şekilde koryoallantoik membran üzerine etken madde içeren pelletler yerleştirilmiştir (Şekil 3.4). İlaç uygulamasından sonra 24 saatlik ek inkübasyon süresi tanınmıştır. Stereoskopik mikroskop altında Bürgermeister ve ark.nın (115) skorlama sistemi (Tablo 3.1) kullanılarak pellet uygulama bölgesindeki damar yapısı değerlendirilmiştir (Şekil 3.5 ve 3.6).



Şekil 3.1. Dölllenmiş tavuk yumurtasının şematik gösterimi.



Şekil 3.2. Dölllenmiş tavuk yumurtalarının silinerek kuluçkaya alınması.



Şekil 3.3. Kuluçkanın 5. gününde yumurtaların açılması.

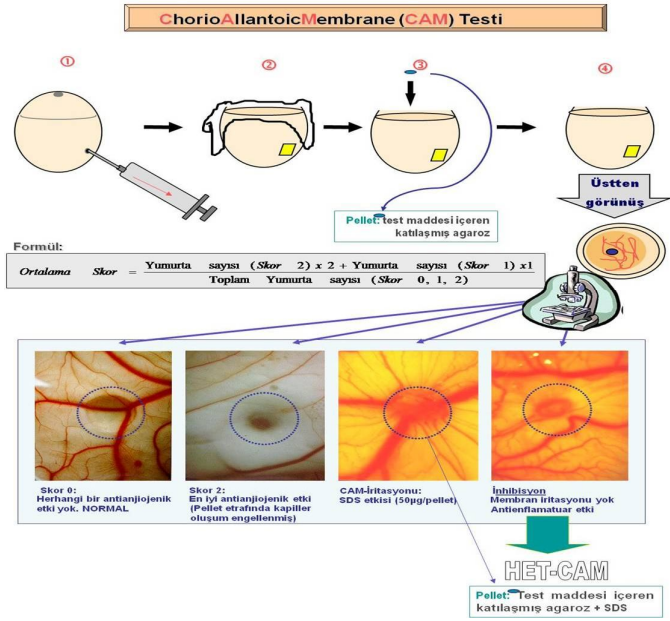


Şekil 3.4. Farklı kuluçka günlerinde olan tavuk embriyoları.

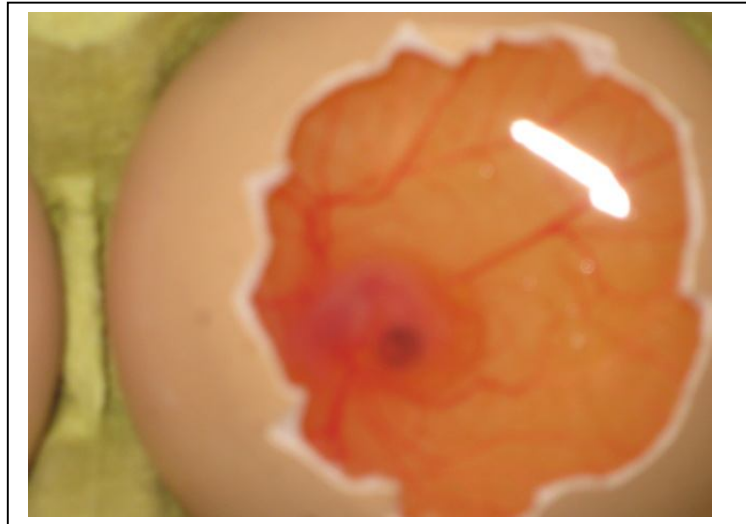


Şekil 3.5. Erken dönemdeki tavuk embriyosunun ve damar yapılarının stereoskopik mikroskop görüntüsü.

Şekil 1. Koryon allantoik membran (CAM) testinin şematik gösterimi



Şekil 3.6. Koryoallantoik membran modeli.



Şekil. 3.07. Koryoallantoik membran modeli.



Şekil. 3.08. Koryoallantoik membran modeli.



Şekil 3.09 Koryoallantoik membran modeli.



Şekil 3.10. Koryoallantoik membran modeli.

Tablo 3.1. Koryoallantoik membran üzerinde anjiyogenik etkinin değerlendirilmesi için kullanılan skor değerleri.

Skor	Etki	İzlenim/Açıklama
0	Yok	Normal embriyo oluşumu, çevre kapillerlere göre değişiklik yok
0,5	Zayıf	Kapiller damarsız alan yok. Kapillerlerin yoğunluğu azalmış ancak pelletten çok daha geniş değil.
1	Orta	Kapillersiz alan az veya kapiller yoğunluk belirli bir alanda azalmış. Etkiler pellet alanının 2 katından fazla değil.
2	Kuvvetli	Pelletin etrafında en az iki kat mesafe olacak şekilde kapillersiz alan mevcut.

Her bir test bileşiğinin her bir konsantrasyonu için 15 yumurtaya uygulama yapılmıştır. Her deney grubu için sadece agar içeren pelletlerin

uygulandığı negatif kontrol yumurtaları da değerlendirmeye alınmıştır. Bu anjiogenez modelinde pozitif kontrol, antianjiogenetik özelliği olduğu bilinen bir molekül olmalıdır. Bu molekül uygulandığında antianjiogenetik etkinlik gözlenmesi modelin düzgün şekilde çalıştığına, deney için kullanılan ilaçlar antianjiogenetik özellik göstermezse bunun deney düzeneğindeki hatadan değil, ilacın gerçekten antianjiogenetik özelliğe sahip olmamasından kaynaklandığına işaret etmektedir. Yapılan pilot çalışmalardan elde edilen veriler ışığında çalışmamızda pozitif kontrol olarak bevasizumab 10^{-6} M konsantrasyonda kullanılmıştır. Tüm testler iki kez tekrarlanmıştır. Sonuç olarak toplam 360 uygulama değerlendirmeye alınmıştır. İlaç gruplarına göre yapılan uygulama sayısı Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan ilaç gruplarında uygulama sayısı.

	10⁻⁴ M	10⁻⁵ M	10⁻⁶ M
Simvastatin	15+15	15+15	15+15
Mevastatin	15+15	15+15	15+15
Simvastatin+Mevastatin	15+15	15+15	15+15
Pozitif Kontrol (Bevasizumab)			15+15
Toplam	330		

Uygulama sonrası koryoallantoik membran dışına çıkan ve irritasyon gözlenen yumurtalar değerlendirme dışı bırakılmıştır.

Koryoallantoik membran üzerinde kullanılan etken maddelerin değerlendirilmesi için Bürgermeister ve ark. tarafından geliştirilen ortalama skora sistemi kullanılmıştır (109). Ortalama skorun belirlenmesi için kullanılan denklem şudur:

$$\text{Ortalama skor} = [\text{Yumurta sayısı (Skor 2)} \times 2 + \text{Yumurta sayısı (Skor 1)} \times 1] / [\text{Toplam Yumurta Sayısı (Skor 0, 1, 2)}]$$

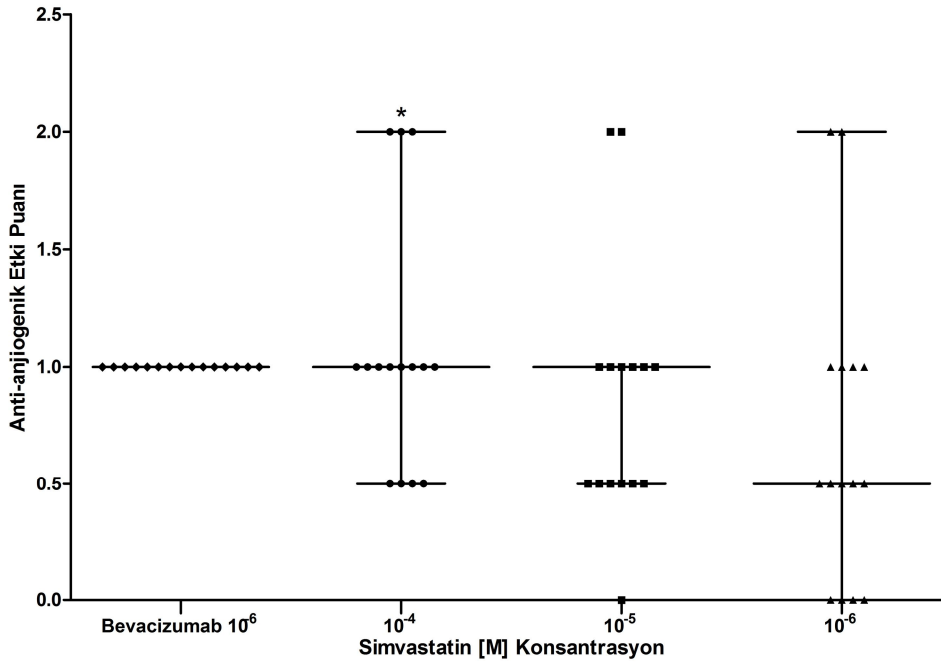
Bu ortalama skor sistemine göre skor<0,5: antianjiyogenik etki yok, skor 0,5-1: zayıf düzeyde antianjiyogenik etki, skor>1: güçlü antianjiyogenik etki olarak değerlendirilmektedir.

3.3. İstatistiksel Değerlendirme

Veriler n (%) ve ortanca-%25-75 interkuartil aralık olarak ifade edilmiştir. Kolmogorov-Smirnov testi ile normal dağılıma uymadıkları tespit edilen verilerin analizi için Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testleri kullanılmıştır. Yanılma düzeyi 0,05 olarak alınmıştır.

4. BULGULAR

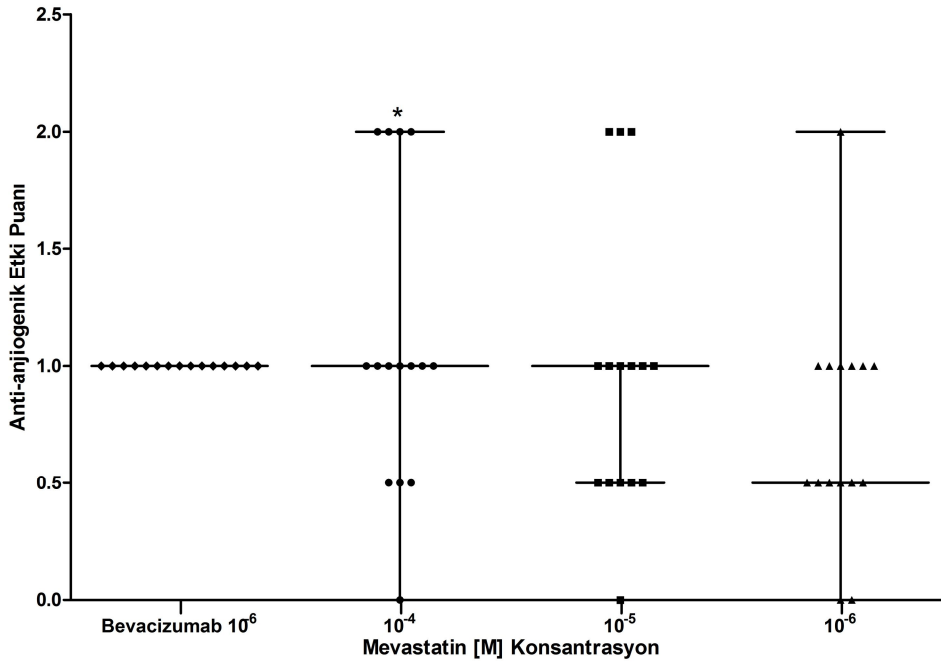
Çalışımızda negatif kontrol olarak sadece agar içeren diskler kullanılmıştır. Negatif kontrol yumurtalarının hiç birinde anjiogenez engellenmemiş ve anti-anjiogenetik etki puanı “0” olarak bulunmuştur. Pozitif kontrol olarak ise FDA onaylı bir anti-anjiogenetik ajan olan bevasizumab kullanılmıştır. Bevasizumabın bu deney modelindeki en uygun antianjiogenetik konsantrasyonunu bulmak için bevasizumabın 10^{-4} M, 10^{-5} M ve 10^{-6} M konsantrasyonlarıyla pilot deneyler yapılmış ve antianjiogenetik skor değerleri sırasıyla 1,58; 1,55 ve 1,00 olarak bulunmuştur. Bu veriler ışığında bevasizumabın 10^{-6} M konsantrasyonunun kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.1. Simvastatin'in 10^{-4} M, 10^{-5} M ve 10^{-6} M konsantrasyonlarda antianjiyogenetik etki puanları. Veriler skatter grafikte ortanca (interkuartil %25-75 aralık) olarak sunulmuştur.

Şekil 4.1’de simvastatinin 10^{-4} M, 10^{-5} M ve 10^{-6} M konsantrasyonlarda antianjiyogenik etki puanları gösterilmiştir. Scatter grafikte de işaretlendiği gibi simvastatin konsantrasyonlarının birbirleriyle karşılaştırılması sonucunda aşağıdaki anlamlı farklılıklar saptanmıştır.

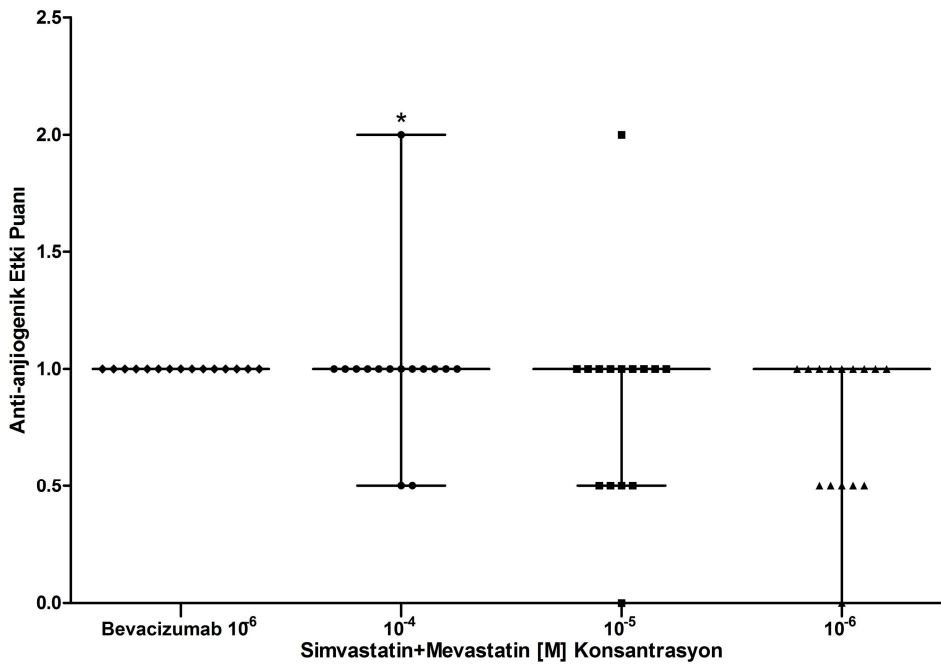
Simvastatinin 10^{-4} M konsantrasyonda antianjiyogenik etki puanının, 10^{-5} M ve 10^{-6} M konsantrasyonlardan istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu ($p<0,05$) bulunmuştur. Bulgularımız, kullandığımız araştırma modelinde simvastatinin 10^{-4} M konsantrasyonda belirgin olmak üzere antianjiyogenik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Simvastatinin 10^{-4} M, 10^{-5} M ve 10^{-6} M konsantrasyonları için antianjiyogenik ortalama skor değerleri sırası ile 0.93, 0.66 ve 0.53 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.2. Mevastatin’in 10^{-4} M, 10^{-5} M ve 10^{-6} M konsantrasyonlarda antianjiyogenik etki puanları. Veriler scatter grafikte ortanca (interkuartil %25-75 aralık) olarak sunulmuştur.

Şekil 4.2’de mevastatinin 10^{-4} M, 10^{-5} M ve 10^{-6} M konsantrasyonlarda antianjiyogenik etki puanları gösterilmiştir. Scatter grafikte de işaretlendiği gibi mevastatin konsantrasyonlarının birbirleriyle karşılaştırılması sonucunda aşağıdaki anlamlı farklılıklar saptanmıştır.

Mevastatinin 10^{-4} M konsantrasyonda antianjiyogenik etki puanının 10^{-5} M ve 10^{-6} M konsantrasyonlardan istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu ($p<0,05$) bulunmuştur. Bulgularımız, kullandığımız araştırma modelinde Mevastatinin 10^{-4} M konsantrasyonda belirgin olmak üzere antianjiyogenik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Mevastatinin 10^{-4} M, 10^{-5} M ve 10^{-6} M konsantrasyonları için antianjiyogenik ortalama skor değerleri sırasıyla 1,0; 0.80 ve 0.66 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.3. Simvastatin ve mevastatinin tek başlarına 10^{-4} M, 10^{-5} M ve 10^{-6} M konsantrasyon oluşturan miktarlarının 1:1 oranındaki kombinasyonunun antianjiyogenik etki puanları. Veriler scatter grafikte ortanca (interkuartil %25-75 aralık) olarak sunulmuştur.

Şekil 4.3'te simvastatin+mevastatin kombinasyonunun 10^{-4} M, 10^{-5} M ve 10^{-6} M konsantrasyonlarda antianjiyogenik etki puanları gösterilmiştir. Scatter grafikte de işaretlendiği gibi simvastatin+mevastatin kombinasyonu konsantrasyonlarının birbirleriyle karşılaştırılması sonucunda aşağıdaki anlamlı farklılıklar saptanmıştır.

Simvastatin+ mevastatin kombinasyonunun 10^{-4} M konsantrasyonda antianjiyogenik etki puanının 10^{-5} M ve 10^{-6} M konsantrasyonlardan istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu ($p<0,05$) bulunmuştur. Bulgularımız, kullandığımız araştırma modelinde simvastatin+mevastatin kombinasyonunun 10^{-4} M konsantrasyonda belirgin olmak üzere antianjiyogenik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Kombinasyonun 10^{-4} M, 10^{-5} M ve 10^{-6} M konsantrasyonları için antianjiyogenik ortalama skor değerleri sırasıyla 0.96; 0.77 ve 0.59 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.1. Antianjiyogenik etki puanlarının karşılaştırılması.

	Konsantrasyon		
	10^{-4} M	10^{-5} M	10^{-6} M
Bevasizumab	1,58**	1,55**	1,00**
Simvastatin	0.93	0.66	0.53
Mevastatin	1,0	0.80*	0.66*
Simvastatin+Mevastatin	0.96	0.77	0.59

* Simvastatin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı ($p<0.05$).

** Tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı ($p<0.05$)

Hem simvastatinin hem de mevastatinin her üç dozunun da anti anjiyogenik etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Her iki ilaçta da bu etki 10^{-4} M konsantrasyonda belirgindir ve bu iki ilacın 10^{-4} M konsantrasyonlarının meydana getirmiş olduğu anti anjiyogenik etki gücü arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ancak azalan konsantrasyonlar birbirleri ile karşılaştırıldığında mevastatinin 10^{-5} M ve 10^{-6} M konsantrasyonlarda simvastatine göre istatistiksel olarak daha anlamlı bir anti anjiyogenik etki

meydana getirdiği saptanmıştır ($p<0.05$) (Tablo 4.1). Simvastatin ve mevastatinin 1:1 kombinasyon uygulamasının ise tek başına uygulanmalarından farklı bir etki meydana getirmediği saptanmıştır ($p>0.05$).

5. TARTIŞMA

Anjiogenez mevcut vasküler oluşumlardan yeni vasküler yapıların teşkil etmesi olarak tanımlanmıştır (110). Anjiogenez iki farklı mekanizma ile gerçekleşir. Bunlar, tomurcuklanma mekanizması ve damar içi doku yapılanmasıdır. Damar içi doku yapılanması, doku kıvrımlarının damar içine invazyonu sonucu damar lümenin bölünmesi şeklinde tanımlanır. Tomurcuklanma mekanizması ise endotel hücre göçü, çoğalması ve damar lümeni gelişimi gibi basamaklardan oluşur ve mevcut büyük damarlardan tomurcuklanma şeklinde küçük kan damarlarının oluşması olarak tanımlanır (111, 112). Anjiogenez vücutta fizyolojik olarak, yara iyileşmesi, menstrüel siklus ve embriyogenez gibi durumlarda görülürken, patolojik olarak ise başta tümörler olmak üzere romatoid artrit, retinopatiler ve psöriazis gibi hastalıklarda görülür (113, 114). Bunlardan başka serebrovasküler malformasyonlarda da anjiogenik faktörlerin anormal şekilde üretildiği görülmektedir (115).

Anjiogenez oluşurken birçok olay basamaklar şeklinde birbirini izler. İlk önce anjiogeneze neden olan bir etken ya da uyarı oluşmakta (örneğin hipoksi ya da iskemi) daha sonra bu etkenden dolayı anjiogenik faktörlerin salınması ve bu faktörlerin bazal membranın parçalanmasına, endotel hücrelerinin aktivasyonuna, adezyonuna, göçüne, çoğalmasına ve tüp oluşumuna neden olması ve sonuç olarak mevcut damar ağından yeni kan damarlarının oluşması şeklinde gerçekleşmektedir. Böylece bu yeni oluşan tüp yapıda, bazal membranın oluşması ve buna perisitlerin de katılması ile yeni bir fonksiyonel kapiller oluşumu tamamlanmaktadır (116).

Hipoksi ve henüz tam olarak belirlenememiş bazı uyaranlar, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), transforme edici büyüme faktörü, (TGF-b), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), angiopoetin gibi anjiogenik faktörlerinin salınmasına neden olurlar. Ekstraselüler matriks (ECM) ve matriksi çevreleyen hücrelerden, endotel hücrelerinden, tümör hücrelerinden salınan bu büyüme faktörleri, sitokinler ve

bunların reseptörlerinin endotel hücrelerini uyarılmaları sonucunda anjiogeneze neden olan metabolik süreç başlamaktadır (117). Daha sonra bu süreç damar endotelini döşeyen kollajen, laminin gibi glikoproteinlerden ve heparin sülfat gibi proteoglikanlardan oluşan bazal membranın proteolitik yıkımı ile devam eder. Mevcut damarları indüklemek için ekstraselüler matriksin ve bazal membranın parçalanması gerekir. Bu amaç için endotel hücrelerden, tümör hücrelerinden ve inflamatuvar hücrelerden serin proteaz ve matriks metalloproteinaz (MMPs) salgılanır (118, 119). Büyüme faktörleri tarafından aktive edilen bu proteolitik enzimler, bazal membranın ve ekstraselüler matriks (ECM) bileşenlerinin yıkımına neden olurlar (118, 120). ECM'deki proteolitik yıkımı takiben endotel hücreleri yıkılan matriks içine göçe başlar (120). Normalde endotel hücreleri yayılma etkisi göstermeyen tek bir tabaka oluştururlar. Ancak anjiogenez sırasında çoğalıp yayılma gösterirler. Çoğalan endotel hücreleri, integrinler aracılığı ile diğer endotel hücreler ile sıkı bağlantı kurarlar ve böylece tüp oluşumunu gerçekleştirirler (118, 121). Daha sonra çoğalma durur, hücreler morfolojilerini değiştirerek bir lümen oluşturacak şekilde birbirlerine sıkıca tutunur. Çoğunlukla perisitlerin ve vasküler düz kas hücrelerin endotele katılması ve yeni bazal membranın sentezlenmesi ile anjiogenez tamamlanır (122). Kapiller filizlenme oluşuktan sonra yine bu filizlenmenin ucunda yeni oluşmuş ECM'de yıkılma ortaya çıkar ve bu sayede daha ileri yayılım mümkün olur. Damar olgunlaştıktan ve uygun anjiogenez ortaya çıktıktan sonra anjiogenik faktörlerde azalma görülürken, anjiogenez inhibitörlerinde artış gözlenir. Böylece endotel hücreleri sessiz bir hale bürünür ve damarlar kan akımını başlatmaya hazır hale gelmiş olur (120).

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH) iskemik kalp hastalığı, koroner arter hastalığı (örneğin kalp krizi), serebrovasküler hastalıklar (örneğin inme) artmış kan basıncı, hipertansiyon, romatizmal kalp hastalığı ve kalp yetmezliği gibi birçok hastalığı içinde barındıran geniş spektrumlu bir hastalıklar grubudur. KVH'nın en önemli nedenleri sağlıksız beslenme, sigara ve fiziksel inaktivitedir.

KVH'lar 17 milyon, yıllık ölüm sayısı ile ölüm nedenleri arasında birinci sırayı almaktadır. Bu sayı tüm ölümlerin yaklaşık %30'una karşılık gelmektedir. Bunların 7.6 milyonunun nedeni kalp krizi, 5.7 milyonunun nedeni ise inmedir. KVH'lara bağlı ölümlerin %80'i düşük ve orta gelir düzeyine sahip ülkelerde gerçekleşmektedir (123). 1990-2020 yılları arasında iskemik kalp hastalıklarının gelişmiş ülkelerde; kadınlarda %29, erkeklerde %48, gelişmekte olan ülkelerde; kadınlarda %125, erkeklerde %127 artacağı öngörülmektedir (124).

KVH'lıkların sebepleri multifaktöriyel olsa da herhangi bir tedavi protokolünün temelinde yaşam tarzı değişikliği gelmektedir. Bu çoğu zaman hasta uyumu nedeni ile mümkün olmamakta, kimi zaman ise tek başına yeterli gelmeyip farmakoterapi zorunlu hale gelmektedir. Daha öncesinde geçirilmiş KVH'lık olsun yada olmasın birçok komplikasyonun oluşumundan sorumlu olan kolesterolün düşürülmesi farmakoterapinin ana hedeflerinden birisidir (125). Statinler Düşük dansiteli lipoprotein (DDL) düşürülmesinde ilk tercih ilaçlardır. Aynı zamanda total kolesterolün düşürülmesinde de fayda sağlarlar. Bu da karsiyovasküler riski ile direkt olarak ilişkilidir (126).

Tüm statin moleküllerinin ortak noktası sahip oldukları HMG benzeri yapıya sahip olan dihidroksiheptenoic acid zinciridir. Bu zincir HMG-CoA redüktaz enzimi için yalancı bir substrat oluşturarak enzimin aktif bölgesine bağlanır ve kompetitif bir inhibisyona neden olur. Bu inhibisyon neticesinde Asetil CoA'dan mevalonik asit sentezi gerçekleşemez ve kolesterol sentezi inhibe olur. Hücre içinde sentezlenen kolesterolün azalması karaciğer hücre yüzeyinde bulunan LDL ve VLDL reseptörlerinin sayıca artıp aktifleşmesine neden olur. Bu reseptörler dolaşımda bulunan LDL ve VLDL'yi yakalayıp karaciğer hücrelerine alarak plazmadaki miktarlarının azalmasına neden olur. Yani statinlerin kolesterol düşürücü etkileri bir yandan hücre içi sentezi azaltıp, diğer yandan da dolaşımdaki LDL'nin hücre içine alınmasını sağlayarak gerçekleşir. Tüm statinlerin ortak olarak sahip oldukları dihidroksiheptenoic acid zinciri dışında kalan bölümleri önemli farklılıklar gösterir.(127)

Statinlerin direkt antilipidemik özelliklerinin yanında ekstra etkileri de bulunmaktadır. Kardiyovasküler hastalık oranında, var olan kardiyovasküler hastalıkta mortalite ve morbiditenin azaltılmasında bu ekstra özelliklerin etkiliği olduğu düşünülmektedir. Bu etkiler toplu şekilde pleotropik etkiler olarak adlandırılmaktadır. Bu etkiler arasında trombosit agregasyonunda azalma, antioksidan etki, antiinflamatuvar etki, antitümöral etki ve antianjiyojenik etki yer almaktadır. Bu bağlamda statinlerin etkili olduğu düşünülen fizyolojik olaylardan biri de plak içi anjiogenezdır.

Damar duvarında meydana gelen plak ile ilgili en büyük problem lümeninde meydana getirdiği daralmadan ziyade plakta meydana gelen rüptür sonucu plağın kopup daha distal damarlarda meydana getirdiği tıkanıklıklardır. Plağın rüptüre olmaya karşı hassaslaşmasında etkin olan faktörler; aktif inflamasyon, büyük lipit çekirdek, ince fibröz kapsül, plak içi kanama meydana gelmesi ve plak içi anjiogenez gelişimidir (128).

Vazo vazorum büyük arterlerin advensiyasında yer alan fonksiyonel endarterlerdir. Büyük damarların çapları kalın olduğu için damarın tamamının lümeninden difüzyon ile beslenmesi mümkün olmamaktadır. İşte damarın beslenemeyen kısımlarına kan akımını taşıyan bu end arterlere vazo vazorum ismi verilmektedir (129). Teoriye göre vazo vazorumlar damar duvarında eşit olarak yayılmamıştır. Vazo vazorumdan zengin bölgelerin hem plak oluşumu hem de makrofaj infiltrasyonu için uygun zemin oluşturmaktadır (130). Vazo vazorumların damarın belli bölgelerinde yoğunlaşması o bölgede kolesterol birikimine, hücre infiltrasyonu meydana gelmesine ve inflamatuvar bir sürecin başlamasına neden olmaktadır. Bu uygunsuz ortam hipoksik bir durum yaratarak özellikle bölgede toplanmış makrofajlardan anjiyojenik mediatörlerin salınmasına ve mevcut vazo vazorumlardan plak içinde yeni kanallar oluşmasına neden olmaktadır (131). Oluşan bu yeni damarlar oldukça ince duvarlı ve fragildirler. Bu yüzden nekroz ve kanamaya neden olarak plağın rüptürüne sebep olabilirler. Rüptüre olan plak da koparak daha küçük damarları tıkayarak komplikasyonların oluşmasına sebep olur (132).

Statinlerin anjiogenez üzerindeki etkileri tartışmalıdır. Bazı çalışmalar statinlerin anjiogenezi indüklediğini ifade ederken, bazıları statinlerin antianjiogenik etkileri olduğunu belirtmektedir. Chade AR. ve ark. 2006 yılında yapmış oldukları çalışmada; ratlarda renal iskemi modeli geliştirmişler ve uzun süreli simvastatin tedavisinin bu renal iskemi üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Yapmış oldukları uzun takip sonucunda simvastatin tedavisinin renal anjiogenez ve arteriogenezi artırdığını ve renal fonksiyonların onarılmasına katkıda bulunduğunu bulmuşlardır (133). Nishimoto-Hazuku A. ve ark. 2008 yılında yapmış oldukları bir çalışmada özellikle hipoksik koşullarda simvastatin uygulamasının, yeni damar gelişimi için elzem faktörlerden biri olan VEGF miktarını artırdığını, hatta bunu ekspresyon düzeyinde yaptığını göstermişlerdir. Çalışmalarını, bu artışın mekanizması çözmek üzerine genişlettiklerinde, simvastatin uygulamasının endotelial hücrelerdeki RhoA ekspresyonunu azaltarak ve HIF-1 α ekspresyonunu artırarak VEGF miktarını artırdığını tespit etmişlerdir (134). Zacharek ve ark. 2009 yılında yapmış oldukları çalışmada; inme geçirmeleri sağlanmış ratlarda, simvastatin'in tedavi dozlarında anjiogenezi artırdığını, damarları stabilize ettiğini ve arteriyogenezi artırdığını göstermişlerdir (135). Bu çalışmalara zıt şekilde Zhu XY ve ark. yaptıkları çalışmada simvastatinin bozulmuş myokardiyal perfüzyon ve fonksiyon üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada in-vivo olarak simvastatinin antiinflamatuvar ve dolaşımı destekleyici özelliklerini ortaya koyarken, in-vitro olarak anjiogenez üzerindeki etki, TNF- α ile indüklenmiş bir anjiogenez modeli üzerinde değerlendirilmiştir. Araştırmacılar çalışmalarında simvastatinin TNF- α ile indüklenmiş bir anjiogenezi belirgin şekilde inhibe ettiğini göstermişlerdir (136). Benzer şekilde Ahn KS. ve ark. yaptıkları çalışmada inflasyon ve birçok diğer hücrel olayın en önemli mediatörlerinden biri olan TNF- α 'nın VEGF, MMP-9 ve ICAM-1 gibi anjiogenez oluşumunda önemli rolü olan faktörlerin ekspresyonunu artırdığını, simvastatinin ise bu moleküllerin ekspresyonunu azaltarak antianjiogenik etki meydana getirdiğini göstermişlerdir (137). Luo D.

ve ark. 2007 yılında yapmış oldukları bir çalışmada travmatik beyin hasarına uğramış hastalarda statinlerin etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada simvastatinin travmatik beyin hasarına bağlı gelişen anjiogenezi azaltarak beyin fonksiyonlarının korunmasına katkıda bulunduğu ortaya konmuştur (138). Zhang Y. ve ark. yapmış oldukları çalışmada ise statinlerin, anjiotensin II tarafından indüklenen abdominal aorta anevrizmaları üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmada bu anevrizmaların yırtılmasında o bölgedeki neovaskülerizasyon ve inflamasyonun etkin olduğu ortaya konurken, statinlerin bu neovaskülerizasyon ve inflamasyonu azaltarak anevrizmaların yırtılmasını önlediği bulunmuştur (139). Tüm bu çelişkili çalışmalar arasında biz çalışmamızda simvastatinin CAM modelinde belirgin bir anjiogenez inhibisyonu yaptığını bulduk. Bu inhibisyon yüksek konsantrasyonlarda belirginken, azalan konsantrasyonlarla birlikte azalmıştır.

Mevastatinin anjiogenez üzerindeki etkisi ile ilgili çok az veri bulunmaktadır. Var olan veriler de simvastatinde olduğu gibi çelişkilidir. Wang C. ve ark. 2010 yılında yapmış oldukları bir çalışmada mevastatinin zevrafish intersegmental damarlarındaki anjiogenezi inhibe ettiğini göstermişlerdir (140). Biz de çalışmamızda tek başına mevastatin uygulamasının bizim kullandığımız yüksek konsantrasyonlarda güçlü bir anjiogenez meydana getirdiğini saptadık. Bu antianjiogenik etki benzer konsantrasyonlarda simvastatinin meydana getirmiş olduğu antianjiogenik etkiden belirgin şekilde daha fazlaydı. Hem simvastatin hem de mevastatin ile ilgili yapılan çalışmalarda anjiogenez üzerinde farklı etkilerin bulunması muhtemelen bu çalışmalarda farklı ilaç konsantrasyonları kullanılmasına ve anjiogenez üzerindeki etkinin farklı metotlarla değerlendirmesine bağlı olabilir. Urbich C. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada statinlerin düşük konsantrasyonlarda özellikle proanjiogenik faktörleri artırarak anjiogenezi artırıcı etki gösterirken, daha yüksek konsantrasyonlarda endotelial hücrelerde apoptozisi tetikleyerek antianjiogenik etki gösterdikleri ortaya konmuştur (141). Bu bulgu, bizim çalışmamızda kullanılan konsantrasyonlarda, simvastatin ve mevastatinin göstermiş olduğu antianjiogenik etkiyi açıklamaktadır.

Ayrıca çalışmamızda simvastatin ve mevastatinin tek başlarına uygulamalarının yanında kombine olarak uygulamalarının anjiogenez üzerindeki etkisi de değerlendirilmiştir. Literatür incelendiğinde ne klinik kullanımda ne de deneysel çalışmalarda statinlerin kombine şekilde kullanımı ile ilgili geniş bilgilere rastlanmamaktadır. Bizim çalışmamızda statinlerin kombine olarak uygulanması herhangi ek bir etki meydana getirmemiştir. Bunun muhtemel sebebi bu iki statinin anjiogenez üzerinde meydana getirmiş oldukları etkiyi benzer etki mekanizmaları üzerinden gösteriyor olmalarıdır. Bu sonuç bu iki statinden herhangi birinin ek bir etki mekanizmasının olmadığını da düşündürmektedir.

Sonuç olarak simvastatin ve mevastatin çalışmamızda kullanılan 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} M konsantrasyonlarda antianjiogenik etki gösteren statinlerdir. Statinlerin lipid düşürücü etkileri yanında anti inflamatuvar ve antioksidan özelliklerinden faydalanılmak istendiğinde, anjiogenez inhibisyonu sağlanarak; plak içi antianjiogenik etkiyle, plak rüptürü ve buna bağlı ciddi komplikasyonlardan korunulmak istendiğinde bu iki ajan umut vaat edici seçenekler olacaktır. Tabii ki bu ajanların anjiogenez üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi ve klinikte bu amaçla kullanılabilmesi için insanlar üzerinde yapılacak daha ileri araştırmalara gerek vardır.

KAYNAKLAR

1. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003;9 (6) : 653 -660.
2. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987;235 (4787): 442-447.
3. Folkman J. Tumour angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971; 285(21):1182-1186.
4. Ribatti D, Vacca A, Presta M. The discovery of angiogenic factors: a historical review. *Gen Pharmacol.* 2000;35(5):227-231.
5. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386(6626):671-674.
6. Konukoğlu D, Turhan MS. Anjiyogenezin temel moleküler mekanizmaları ve tümör anjiyogenezi. *Cerrahpaşa tıp dergisi* 2005; 36(1):42-48.
7. Varner JA. The role of vascular cell integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 in angiogenesis. *EXS.* 1997;79:361-390.
8. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9(6):669-676.
9. Asano Y, Ihn H, Yamane K, Kubo M, Tamaki K. 2004 Increased expression levels of integrin alphavbeta5 on scleroderma fibroblasts. *Am J Pathol.* 2004; 164 (4):1275-1292.
10. Haubner R. Alphavbeta3-integrin imaging: a new approach to characterise angiogenesis? *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006;33 Suppl 1:54-63.
11. Greenberg DA, Jin K. From angiogenesis to neuropathology. *Nature* 2005; 438 (7070):954-959.

12. Al-Rawi MA, Mansel RE, Jiang WG. Molecular and cellular mechanisms of lymphangiogenesis. *Eur J Surg Oncol.* 2005;31(2):117-121.
13. Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell.* 2002;1(3):219-227.
14. Schneider M, Othman-Hassan K, Christ B, Wilting J. Lymphangioblasts in the avian wing bud. *Dev Dyn.* 1999;216(4-5):311-319.
15. Martin A, Komada MR, Sane DC. Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. *Med Res Rev.* 2003;23(2):117-145.
16. Bodolay E, Koch AE, Kim J, Szegedi G, Szekanecz Z. Angiogenesis and chemokines in rheumatoid arthritis and other systemic inflammatory rheumatic diseases. *J Cell Mol Med.* 2002;6(3):357-376.
17. Cao Y, Hong A, Schulten H, Post MJ. Update on therapeutic neovascularization. *Cardiovasc Res.* 2005;65(3):639-648.
18. Ide AG, Bake NH, Warren SL. Vascularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am J Roentgenol.* 1939;42:891-899.
19. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995;1(1):27-31.
20. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(6):401-410.
21. McNamara DA, Harmey JH, Walsh TN, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. Significance of angiogenesis in cancer therapy. *Br J Surg.* 1998; 85 (8):1044-1055.
22. Staton CA, Lewis C, Bicknell R (Eds). *Angiogenesis Assays-A Critical Appraisal of Current Techniques.* West Sussex, John Wiley & Sons Ltd; 2006.

23. Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000;21(3):505-515.
24. Fernandez PM, Rickles FR. Tissue factor and angiogenesis in cancer. *Curr Opin Hematol.* 2002;9(5):401-406.
25. Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn.* 2004;231(3):474-488.
26. Ribatti D. The involvement of endothelial progenitor cells in tumour angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2004;8(3):294-300.
27. Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med.* 2004; 8(4) : 498 -508.
28. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol.* 1999; 155(3):739-752.
29. Tonini T, Rossi F, Claudio PP. Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene* 2003;22(42):6549-6556.
30. Manders P, Beex LV, Tjan-Heijnen VC, Geurts-Moespot J, Van Tienoven TH, Foekens JA, Sweep CG. The prognostic value of vascular endothelial growth factor in 574 node-negative breast cancer patients who did not receive adjuvant systemic therapy. *Br J Cancer.* 2002;87(7):772-778.
31. Rosen LS. Clinical experience with angiogenesis signalling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers. *Cancer Control.* 2002; 9(Suppl 2):36-44.

32. Nicolson GL. Organ specificity of tumor metastasis: role of preferential adhesion, invasion and growth of malignant cells at specific secondary sites. *Cancer Metastasis Rev.* 1988;7(2):143-188.
33. Teicher BA, Sotomayor EA, Huang ZD. Antiangiogenic agents potentiate cytotoxic cancer therapies against primary and metastatic disease. *Cancer Res.* 1992; 52(23):6702-6704.
34. Carter SK. Clinical strategy for the development of angiogenesis inhibitors. *Oncologist.* 2000;5(Suppl 1):51-54.
35. Buemi M, Galeano M, Sturiale A, Ientile R, Crisafulli C, Parisi A, Catania M, Calapai G, Impalà P, Aloisi C, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A, Tuccari G, Frisina N. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and healing of ischemic skin wounds. *Shock* 2004;22(2):169-173.
36. Townsend CM, Beauchamp DR, Evers MB, Mattox KL (Eds). *Sabiston textbook of surgery: the biological basis of modern surgical practice.* 17th ed. Philadelphia, Elsevier Saunders; 2004.
37. Hunt TK. Wound Healing. In: Doherty GM (Eds). *Current Surgical Diagnosis and Treatment*, 12th ed. United States of America, McGraw Hill; 2006: 75-88.
38. Waltenberger J. Impaired collateral vessel development in diabetes: potential cellular mechanisms and therapeutic implications. *Cardiovasc Res.* 2001; 49(3):554-560.
39. Boodhwani M, Sodha NR, Mieno S, Xu SH, Feng J, Ramlawi B, Clements RT, Sellke FW. Functional, cellular, and molecular characterization of the angiogenic response to chronic myocardial ischemia in diabetes. *Circulation* 2007; 116(11 Suppl):I31-I37.
40. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005;54(6):1615-1625.

41. Buemi M, Vaccaro M, Sturiale A, Galeano MR, Sansotta C, Cavallari V, Floccari F, D'Amico D, Torre V, Calapai G, Frisina N, Guarneri F, Vermiglio G. Recombinant human erythropoietin influences revascularization and healing in a rat model of random ischaemic flaps. *Acta Derm Venereol.* 2002; 82 (6) : 411-417.
42. Altavilla D, Saitta A, Cucinotta D, Galeano M, Deodato B, Colonna M, Torre V, Russo G, Sardella A, Urna G, Campo GM, Cavallari V, Squadrito G, Squadrito F. Inhibition of lipid peroxidation restores impaired vascular endothelial growth factor expression and stimulates wound healing and angiogenesis in the genetically diabetic mouse. *Diabetes* 2001;50(3):667-674.
43. Vallee BL, Riordan JF, Lobb RR, Higachi N, Fett JW, Crossley G, Bühler R, Budzik G, Breddam K, Bethune JL, Alderman EM. Tumor-derived angiogenesis factors from rat Walker 256 carcinoma: an experimental investigation and review. *Experientia* 1985;41(1):1-15.
44. Auerbach R, Auerbach W, Polakowski I. Assays for angiogenesis: a review. *Pharmacol Ther.* 1991;51(1):1-11.
45. Ribatti D, Nico B, Vacca A, Roncali L, Burri PH, Djonov V. Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. *Anat Rec.* 2001;264(4):317-324.
46. Melkonian G, Munoz N, Chung J, Tong C, Marr R, Talbot P. Capillary plexus development in the day five to day six chick chorioallantoic membrane is inhibited by cytochalasin D and suramin. *J Exp Zool.* 2002;292(3):241-254.
47. Romanoff AL. *The avian embryo.* New York, Macmillan Co, 1960.
48. Hazel SJ. A novel early chorioallantoic membrane assay demonstrates quantitative and qualitative changes caused by antiangiogenic substances. *J Lab Clin Med.* 2003;141(3):217-228.

49. Leng T, Miller JM, Bilbao KV, Palanker DV, Huie P, Blumenkranz MS. The chick chorioallantoic membrane as a model tissue for surgical retinal research and simulation. *Retina* 2004;24(3):427-434.
50. Özgürtaş T. Anjiyogenezde bir in-vivo model: civciv koriyoallantoik membran. *Gülhane Tıp Dergisi* 2009;51:67-69.
51. Kayaalp SO. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji 2. Cilt, 8. baskı, Ankara, Feryal matbaacılık San. Tic. Ltd. Sti., 1998.
52. Stancu C, Sima A. Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med* 2001; 5(4): 378-87.
53. Alegret M, Silvestre JS. Pleiotropic effects of statins and related pharmacological experimental approaches. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2006; 28(9): 627- 56. defects. *J Periodontol* 2005, 76(10), 1667-74.
54. Blumenthal RS. Statins: Effective antiatherosclerotic therapy. *Am Heart J* 2000;139 c(4):577-83.
55. Dikeç M. Hiperlipidemik hastalarda atorvastatin kullanımının lipoprotein (a) ve diğer lipid parametreleri üzerine etkisi. Uzmanlık tezi. İstanbul: Sağlık Bakanlığı Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi; 2006.
56. Horiuchi N, Maeda T. Statins and Bone Metabolism. *Oral diseases* 2006; 12: 85-101.
57. Chan MH, Mak TW, Chiu RW, Chow CC, Chan IH, Lam CW. Simvastatin increases serum osteocalcin concentration in patients treated for hypercholesterolaemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86 (9): 4556-9.
58. Van Staa TP, Wegman S, De Vries F, Leufkens B, Cooper C. Use of statins and risk of fractures. *J Am Med Assoc* 2000; 285: 1850-5.

59. Davidson MH. Controversy surrounding the safety of cerivastatin. *Expert Opin Drug Saf* 2002 ;1 (3): 207-12.
60. Garrett IR, Gutierrez G, Mundy GR. Statins and bone formation. *Current Pharmaceutical Design* 2001; 7: 715 -36.
61. Sarıdoğan ME, Özkul İ. Statinlerin kemik üzerine etkileri. *Osteoporoz Dünyasından* 2003, 9(3): 114-9.
62. Kılıç E. Lokal ve Sitemik Simvastatin Uygulamalarının Distraksiyon Osteogenezisi Üzerine Etkilerinin Deneysel Olarak İncelenmesi. Doktora tezi. Sivas: Cumhuriyet Üniversitesi; 2005.
63. McFarlane SI, Muniyappa R, Francisco R, Sowers JR. Pleiotropic effects of statins: Lipid reduction and beyond. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1451-8.
64. Maron DJ, Fazio S, Linton MF. Current perspectives on statins. *Circulation* 2000; 101:207–213.
65. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. Influence of pravastatin and plasma lipids of clinical events in the West of Scotland Coronary
66. Dupuis J, Tardif JC, Cernacek P, The'roux P. Cholesterol reduction rapidly improves endothelial function after acute coronary syndromes: the RECIFE (Reduction of Cholesterol in Ischemia and Function of the Endothelium) trial. *Circulation* 1999; 99:3227–3233. Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation* 1998; 97:1440–1445.
67. Leung WH, Lau CP, Wong CK. Beneficial effect of cholesterol-lowering therapy on coronary endothelium-dependent relaxation in hypercholesterolemic patients. *Lancet* 1993; 341:1496–1500.
68. Kaesemeyer WH, Caldwell RB, Huang J, Caldwell RW. Pravastatin sodium activates endothelial nitric oxide synthase independent of its cholesterol-lowering actions. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33:234–241.

69. Jorge PA, Osaki MR, de Almeida E. Rapid reversal of endothelial dysfunction in hypercholesterolaemic rabbits treated with simvastatin and pravastatin. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1997; 24:948–953.
70. Endres M, Laufs U, Huang Z, et al. Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:8880–8885.
71. Lefer AM, Campbell B, Shin Y-K, et al. Simvastatin preserves the ischemicreperfused myocardium in normocholesterolemic rat hearts. *Circulation* 1999; 100:178–184.
72. Lefer AM, Lefer DJ. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia–reperfusion. *Cardiovasc Res* 1996; 32:743–751.
73. Ikeda Y, Young LH, Lefer AM. Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, protects ischemic reperfused myocardium in normocholesterolemic rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 41:649–656.
74. Wolfrum S, Grimm M, Heidbreder M, et al. Acute reduction of myocardial infarct size by a hydroxymethyl glutaryl coenzyme a reductase inhibitor is mediated by endothelial nitric oxide synthase. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 41:474–480.
75. Osborne JA, Siegman MJ, Sedar AW, et al. Lack of endothelium-dependent relaxation in coronary resistance arteries of cholesterol-fed rabbits. *Am J Physiol* 1989; 256:C591–C597.
76. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med* 2000; 6:1004–1010.
77. Sata M, Nishimatsu H, Suzuki E, et al. Endothelial nitric oxide synthase is essential for the HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin to

- promote collateral growth in response to ischemia. *FASEB J* 2001; 15:2530–2532.
78. Weis M, Heeschen C, Glassford AJ, Cooke JP. Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation* 2002; 105:739–745.
 79. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, et al. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone-marrow derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 2001; 108:399–405.
 80. Urbich C, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler S. Double-edged role of statins in angiogenesis signaling. *Circ Res* 2002; 90:737–744.
 81. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, et al. HMG-CoA-reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 2001; 108:391–397.
 82. Assmus B, Urbich C, Aicher A, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes. *Circ Res* 2003; 92:1049–1055.
 83. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001; 103:2885–2890.
 84. Vincent L, Chen W, Hong L, et al. Inhibition of endothelial cell migration by cerivastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor: contribution to its antiangiogenic effect. *FEBS Lett* 2001; 495:159–166.
 85. Vincent L, Soria C, Mirshahi F, et al. Cerivastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, inhibits endothelial cell proliferation induced by angiogenic factors in vitro and angiogenesis in in vivo models *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:623–629.

86. Park H-J, Kong D, Iruela-Arispe L, et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors interfere with angiogenesis by inhibiting the geranylgeranylation of Rho. *Circ Res* 2002; 91:143–150.
87. Laufs U, Liao JK. Targeting Rho in cardiovascular disease. *Circ Res* 2000; 87:526–528.
88. Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem* 1998; 273:24266–24271.
89. Laufs U, Endres M, Stagliano N, et al. Neuroprotection mediated by changes in the endothelial actin cytoskeleton. *J Clin Invest* 2000; 106:15–24.
90. Faust JR, Brown MS, Goldstein JL. Synthesis of delta 2-isopentenyl Trna from mevalonate in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 1980; 255:6546–6548.
91. Burke R, Nellen D, Bellotto M, et al. Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell* 1999; 99:803–815.
92. Incardona JP, Eaton S. Cholesterol in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12:193–203.
93. Soltys C-LM, Buchholz L, Gandhi M, et al. Phosphorylation of cardiac protein kinase B (PKB) is regulated by fatty acids [Abstract]. *Circulation* 2001; 104:II–120.
94. Mauro V.F. Clinical pharmacokinetics and practical application of simvastatin. *Clin Pharmacokinet* 1993; 24(3): 195-202.
95. Plosker G.L, McTavish D. Simvastatin. *Drugs* 1995; 50(2): 334-363
96. Williams D, Feely J. Pharmacokinetic-pharmacodynamic drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41 (5): 343-370.

97. Lennernas H, Fager G. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Clin Pharmacokinet* 1997; 32(5): 403-425.
98. PDR- Physicians' Desk Reference 54th Ed. Walsh P. (ed.) Medical Economics Company, Montvale NJ, 2000.
99. Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Cilt-1, Feryal Matbaacılık, Ankara-1995.
100. Garcia M.J, Reinoso R.F, Navarro S, Prous J.R. Clinical pharmacokinetics of statins. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2003; 25(6): 457-481.
101. Igel M, Sudhop T, von Bergmann K. Metabolism and drug interactions of 3-hydroxi-3-methylglutaryl coenzyme A-reductase inhibitors (statins). *Eur J Clin Pharmacol* 2001;57:357-364.
102. Endo, A. *J Antibiot* 1980, 33, 334–336
103. Tobert, J. A. *Nat Rev Drug Discov* 2003, 2, 517–526
104. Endo, Akira (Oct 2004). "The origin of the statins". *Atheroscler Suppl.* 5 (3): 125–30.
105. Alberts AW (1998). "Discovery, biochemistry and biology of lovastatin". *The American Journal of Cardiology* 62 (15): 10J–15J.
106. <http://www.rxlist.com/mevacor-drug.htm>
107. Katz, MS (2005). "Therapy insight: Potential of statins for cancer chemoprevention and therapy.". *Nature clinical practice. Oncology* 2 (2): 82–9.
108. Rao S, Porter DC, Chen X, Herliczek T, Lowe M, Keyomarsi K (July 1999). "Lovastatin-mediated G1 arrest is through inhibition of the proteasome, independent of hydroxymethyl glutaryl-CoA reductase". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (14): 7797–802

109. Bürgermeister J, Paper DH, Vogl H, Linhardt RJ, Franz G. LaPSvS1, a (1-->3)-beta-galactan sulfate and its effect on angiogenesis in vivo and in vitro. *Carbohydr Res.* 2002;337(16):1459-1466.
110. Taylor, PC.,Serum vascular markers and vascular imaging in assessment of rheumatoid arthritis disease activity and response to therapy,*Rheumatology (Oxford).*, Jun;44(6), 721-8, 2005.
111. Beck, L., D'amore, PA.,Vascular Development: Cellular and Molecular Regulation,*The FASEB Journal.*, 11, 365-373, 1997.
112. Patan, S.,Vasculogenesis and angiogenesis.*Cancer, Treat Res.*, 117,3-32, 2004.
113. Rosen, L.,Antiangiogenic Strategies and Agents in Clinical Trials,*The Oncologist.*, 5, 20-27, 2000.
114. Wickström, SA., Alitalo, K., Keski, J.,An Endostatin-derived Peptide Interacts with Integrins and regulates Actin Cytoskeleton and Migration of Endothelial Cells,*The Journal of Biological Chemistry*, 279, 20178-20185, 2004.
115. Kılıç, T., Yıldırım, Ö., Ahn, S., Pamir, N.,Glial Tümörlerin Anjiogenezi. Angiogenesis of Glial Tumors,*Türk Nörosürji Dergisi*, 15(1), 1-9, 2005.
116. Hwang, JJ.,Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Activity by Small Molecules,*Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 159, 79-113, 2007.
117. Haroon, ZA., Peters, KG., Greenberg, CS., et al.,Angiogenesis and Oxygen transport in solid tumors,*Antiangiogenic agents in cancer therapy.*, 3- 21, 1999.
118. Bloemendal, HJ., Logtenberg, T., Voest, EE.,New Strategies in Antivascular Cancer Therapy,*European Journal of Clinical Investigation*, 29, 802- 809, 1999.

119. Hinsbergh, VW., Koolwijk, P., Endothelial Sprouting And Angiogenesis: Matrix Metalloproteinases In The Lead, *Cardiovasc Res.*, 78(2), 203-12, 2008.
120. Konukoglu, D., Turhan, MS., Anjiyogenezin Temel Moleküler Mekanizmaları ve Tümör Anjiyogenezi, *Cerrahpasa Tıp Dergisi*, 36, 42-48, 2005.
121. Pepper, MS., Manipulating Angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.*, 17, 605-619, 1997.
122. Kılıç, T., Yıldırım, Ö., Pamir, N., Beyin Tümörlerinde Anti-anjiogenik Yaklaşımlar, *Türk nöroşirurji Dergisi*, 15(1), 10-16, 2005.
123. WHO. Cardiovascular disease. *The World Health report. Accessed online at www.who.int/cardiovascular_diseases/en/2008_September_30th*. Geneva: WHO, 2008.
124. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases. Part 1: General considerations, the epidemic transition, risk factors, and impact of urbanisation. *Circulation* 2001;**104**:2746–53
125. Prospective Studies Collaboration. Collaborative meta-analysis of 61 studies of vascular risk factors (blood cholesterol, blood pressure, body mass index, diabetes) and cause-specific mortality. *The Lancet* 2007;**370**:1829–39.
126. Ramsay LE, Haq IU, Jackson PR, Yeo WW, Pickin DM, Payne, JN. Targeting lipid-lowering drug therapy for primary prevention of coronary disease: an updated Sheffield table. *The Lancet* 1996;**348**: 387–8.
127. Istvan E. Statin inhibition of HMG CoA Reductase: a 3-dimensional view. *Atheroscler Suppl* 2003;**4**:3-8
128. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: A call for new

- definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation* 2003;108:1664-72.
129. Mulligan-Kehoe MJ. The vasa vasorum in diseased and nondiseased arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;298:H295- 305
 130. Gossli M, Versari D, Lerman LO, Chade AR, Beighley PE, Erbel R, et al. Low vasa vasorum densities correlate with inflammation and subintimal thickening: Potential role in location—Determination of atherogenesis. *Atherosclerosis* 2009;206:362-8.
 131. Sluimer JC, Daemen MJ. Novel concepts in atherogenesis: Angiogenesis and hypoxia in atherosclerosis. *J Pathol* 2009;218:7-29.
 132. Sluimer J, Kolodgie F, Bijnens AP, Maxfield K, Pacheco E, Kutys B, et al. Thin-walled microvessels in human coronary atherosclerotic plaques show incomplete endothelial junctions relevance of compromised structural integrity for intraplaque microvascular leakage. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53:1517-27
 133. Chade AR, Zhu X, Mushin OP, Napoli C, Lerman A, Lerman LO. Simvastatin promotes angiogenesis and prevents microvascular remodeling in chronic renal ischemia. *FASEB J*. 2006 Aug;20(10):1706-8.
 134. Nishimoto-Hazuku A, Hirase T, Ide N, Ikeda Y, Node K. Simvastatin stimulates vascular endothelial growth factor production by hypoxia-inducible factor-1 α upregulation in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008 Mar;51(3):267-73.
 135. Zacharek, A., et al., 2009. Simvastatin increases notch signaling activity and promote arteriogenesis after stroke. *Stroke* 40, 254–260.
 136. Zhu XY, Daghini E, Chade AR, Napoli C, Ritman EL, Lerman A, Lerman LO. Simvastatin prevents coronary microvascular remodeling

- in renovascular hypertensive pigs. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Apr;18(4):1209-17.
137. Ahn KS, Sethi G, Aggarwal BB. Simvastatin potentiates TNF-alpha-induced apoptosis through the down-regulation of NF-kappaB-dependent antiapoptotic gene products: role of IkappaBalpha kinase and TGF-beta-activated kinase-1. *J Immunol*. 2007 Feb 15;178(4):2507-16.
138. Lu D, Qu C, Goussev A, Jiang H, Lu C, Schallert T, Mahmood A, Chen J, Li Y, Chopp M. Statins increase neurogenesis in the dentate gyrus, reduce delayed neuronal death in the hippocampal CA3 region, and improve spatial learning in rat after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2007 Jul;24(7):1132-46.
139. Zhang Y, Naggar JC, Welzig CM, Beasley D, Moulton KS, Park HJ, Galper JB. Simvastatin inhibits angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-knockout mice: possible role of ERK. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Nov;29(11):1764-71.
140. Wang C, Tao W, Wang Y, Bikow J, Lu B, Keating A, Verma S, Parker TG, Han R, Wen XY. Rosuvastatin, identified from a zebrafish chemical genetic screen for antiangiogenic compounds, suppresses the growth of prostate cancer. *Eur Urol*. 2010 Sep;58(3):418-26
141. Urbich C, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler S. Double-edged role of statins in angiogenesis signaling. *Circ Res*. 2002 Apr 5;90(6):737-44