

## Atorvastatinin Sıçan İskelet Kasında Oluşturduğu Yapısal Değişikliklerin Işık Mikroskobu İle Değerlendirilmesi

M. Serhan Taşdemir<sup>1</sup>, Murat Akkuş<sup>2</sup>, Yusuf Nergiz<sup>3</sup>, Selçuk Tunik<sup>4</sup>, İskender Kaplanoğlu<sup>5</sup>

<sup>1,2,3,4,5</sup> Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D.

### ÖZET

Çalışmamızda, bir statin türeviden olan atorvastatinin sıçan iskelet kasında oluşturduğu yapısal değişikliklerin ışık mikroskobu düzeyinde incelenmesi ve değerlendirilmesi amaçlandı. 40 adet erişkin erkek wistar albino rat; biri kontrol ve dokuz deney grupları olmak üzere 10 eşit gruba bölündü. Deneyin başlamasından sonra 5. 10. ve 15. günlerde sakrifiye edilen ratların quadriceps femoris kasları ışık mikroskobunda incelendi. Kontrol grubundan elde edilen kasların histopatolojik incelemelerinde herhangi bir yapısal değişikliğe rastlanmazken, diğer 9 deney grubundan elde edilen kas örneklerinde değişen derecelerde histopatolojik bulgular elde edildi. Genel olarak kaslarda dejenerasyon, kontraksiyon, nekroz, bağdoku artışı, mononükleer hücre infiltrasyonu, kas lifleri arasında vakuoler yapılar ve sentral nükleus belirgin artış göstermekteydi. Çalışmamızda bulgularımız, doz ve zaman arttıkça değişikliklerin belirgin olduğu gözlemlendi. Atorvastatinin iskelet kaslarında göstermiş olduğu toksik etki ile birlikte, klinik açıdan doz ve zaman baz alınarak, hasta tedavilerine ışık tutacağı kanaatine varıldı.

**Anahtar sözcükler:** Atorvastatin, sıçan, kas nekrozu, histopatoloji.

### Evaluation Of The Atorvastatin-Induced Structural Changes In Skeletal Muscles Of Rats By Light Microscope

#### SUMMARY

In this study we evaluated toxic effects of atorvastatin on the development of muscle necrosis in rats at the light microscopic level. Male, adult 40 Wistar- albino rat used in this study. Rats divided into 10 equal groups as one control, 9 treatment groups. All rats were sacrificed after 5th 10th and 15th days of the study. And their quadriceps femoris muscle tissues were examined in light microscopy. In control group there was no histopathologic changes determined on their muscle tissue samples. But on the other hand, in the treatment groups, some histopathologic changes were determined in different degrees. Generally our findings were degeneration, contraction, necrosis, fibrosis in the perimysial area, central nucleus on the muscle tissues. These findings were increased due to the high treatment dose and the long treatment time. Histopathologic changes were increased due to the high treatment dose and the long treatment time. Because of all these reasons, medical doctors will take care about the treatment dose and the long treatment time of the atorvastatin.

**Key words:** Atorvastatin, rat, muscle necrosis, histopathology.

**Yazışma Adresi:** M.Serhan Taşdemir, Dicle Üniv. Tıp Fak.i Histoloji ve Embriyoloji A.D./ DİYARBAKIR

Tel : 0412 248 8001 Dahili:4060-5630 GSM: 0533 231 38 11

E.mail: ser.tasdemir@hotmail.com

**Geliş Tarihi :** 15.01.2008

**Yayına Kabul Tarihi :** 27.05.2008

**GİRİŞ**

3-hydroxy-3-methylglutharyl-coenzyme A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörleri (statinler), kardiyovasküler hastalıkları önlemede yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Miyopatinin gelişmesi, tahminen statin monoterapisi sonucu %0,1 veya %0,5 oranında değişmekteyken, rabdomyoliz gelişme insidansında her sene hastanede tedavi altına alınan 10.000 hastadan 0,44'ünde atorvastatin, simvastatin ve pravastatin kullanımına bağlı gelişebilmektedir<sup>1,2</sup>. Bazı araştırmacılar bu olayın, hastanın vücut ölçüleri yaşı cinsiyeti renal ve hepatik fonksiyonları, hipotiroidizm ve diyabet ile ilişkili olduğunu gözlemişlerdir<sup>3,4</sup>. Statine bağlı miyotoksisitenin, biyokimyasal indikatöründe kreatin kinaz seviyesinin de artmasıdır. Buna rağmen, statine bağlı miyotoksisite normal kreatin kinaz düzeylerinde de gösterilmiştir<sup>5,6</sup>. Statinler hücre sel bazda kolesterol sentezini inhibe etmekte, endotel fonksiyonlarını düzenlemekte ve plak oluşumunu engellemektedir<sup>7,8</sup>. Ancak, insan vücudunda kolesterol sentezini baskılayan statin türevlerinin iskelet kasında ve karaciğer hücrelerinde olumsuz etkilerinin olduğu ortaya çıkmıştır. Karaciğer kökenli serum transaminaz seviyelerinin yükselmesi hastaların % 1'inde, miyotoksisite ise %0,1'inde görülmektedir<sup>9</sup>. Miyopatinin insidansı düşük olabilir, fakat statin kullanımı arttıkça bu belirtilerin veya hastalıkların artacağından kaygı duyulmaktadır. 2001 ağustosunda bir hastanın statin türevi olan serivastatin kullanımına bağlı olarak rabdomyoliz gelişmesi sonucu öldüğü bildirilmiştir<sup>9</sup>. Bir statin türevi olan atorvastatinin doza ve kullanım süresine bağlı iskelet kasında oluşturacağı olası yapısal değişikliklerin histopatolojik olarak ortaya konulması amaçlanmıştır.

**GEREÇ VE YÖNTEM**

Çalışmamıza Dicle Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan onay alındıktan sonra başlandı ve Çalışmanın başından sonuna kadar hayvan hakları bildirgesine bağlı kalındı. Bu çalışmada ağırlıkları 230-222

250 gr. arasında değişen, 6 haftalık 40 adet erişkin erkek Wistar albino türü sıçan kullanıldı. Hayvanlar her bir grupta 4 adet olacak şekilde bir kontrol ve dokuz deney grubuna (Tablo1) ayrıldı. Deney süresince hayvanlar standart rat yemi ve musluk suyu ile  $20 \pm 2$  °C de 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ortamda paslanmaz çelik kafeslerde beslendi.

**Tablo 1: Çalışma grupları**

Gruplar	Atorvastatin Dozu	Süre
Kontrol	%0,5'lik metil selüloz	5,10,15 gün
D1	0,1mg/kg	5 gün
D2	0,1mg/kg	10 gün
D3	0,1mg/kg	15 gün
D4	0,5 mg/kg	5 gün
D5	0,5 mg/kg	10 gün
D6	0,5 mg/kg	15 gün
D7	1 mg/kg	5 gün
D8	1 mg/kg	10 gün
D9	1 mg/kg	15 gün

Atorvastatin %0,5 lik metil selüloz içinde çözüldü ve dozajlar herbir rat'ın vücut ağırlığının kg başına 5 ml olacak şekilde ayarlanarak oral yoldan verildi. Atorvastatin uygulamaları bittikten 24 saat sonra sıçanlar hafif eter anestezisi ile uyutuldu, arka bacağın ön yüzü femur hizasında traş edildi, asepsi ve antiseptisi yapıldı. Daha sonra kuadriseps femoris kasları histopatolojik inceleme için çıkarılarak %10 nötral formalin solüsyonu içine bırakıldı.

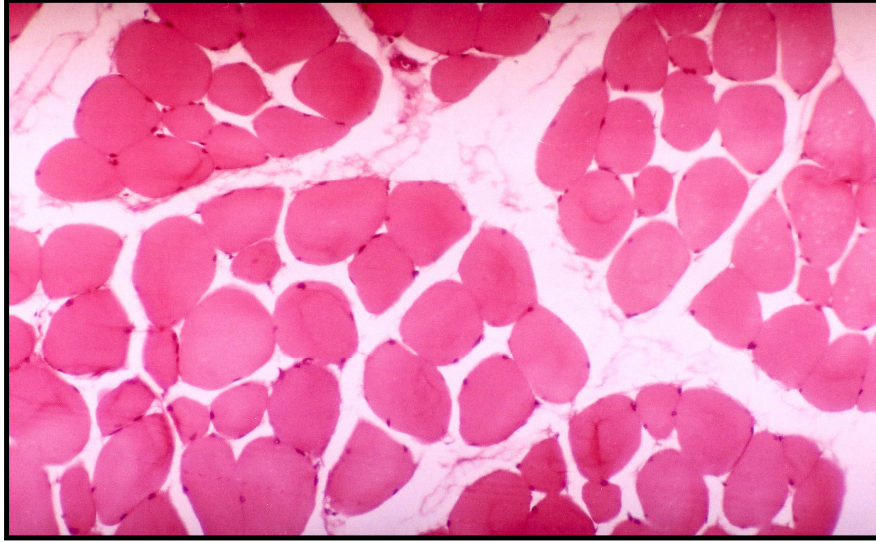
Bilinen rutin histolojik takiplerden sonra doku örnekleri parafin bloklara alındı. Mikrotomda 4-6 mikrometre kalınlıkta kesitler alınıp Hematoksilen-Eozin ile boyanıp Olympus marka BH2 ışık mikroskopunda değerlendirildi.

## BULGULAR

### Kontrol grubu

Kontrol grubu kuadriseps femoris

kaslarının histolojik kesitinde kas liflerinin birbirine paralel düzenli biçimde oldukları, periferde yerleşmiş nükleuslarında yapısal herhangi bir değişiklik olmadığı gözlemlendi (Resim 1).



Resim-1: Kontrol grubu: İskelet kasının enine kesiti, kas demetlerinde perifasiküler yerleşimin ve intersiyel bağ doku alanının normal görünümü (H&E, Orijinal büyütme X 82).

### D1 Grubu

5 gün boyunca 0,1 mg/kg Atorvastatin verilen ve Hematoksilin-Eozin ile boyanan doku örneklerinin histopatolojik incelenmesinde, çizgili kas liflerinin düzenli bir yerleşim gösterdiği ancak bazı kas liflerinde minimal düzeyde nekrotik alanlar gözlemlendi. Aynı kesitin intersiyel bağ dokusu incelendiğinde hem bağ doku hücrelerinde hem de bağ doku liflerinin dağılımında herhangi bir değişiklik gözlenmemektedir.

### D4 grubu

5 gün boyunca 0,5 mg/kg Atorvastatin verilen ve Hematoksilin-Eozin ile boyanan doku örneklerinin histopatolojik incelenmesinde, kas liflerinin sentral bölgesindeki nükleusların arttığı, kas liflerinde nekrotik fibriller alanlar izlendi.

### D7 Grubu

5 gün boyunca 1 mg/kg Atorvastatin verilen ve Hematoksilin-Eozin ile boyanan doku örneklerinin histopatolojik incelenmesinde, kas liflerinin nükleus

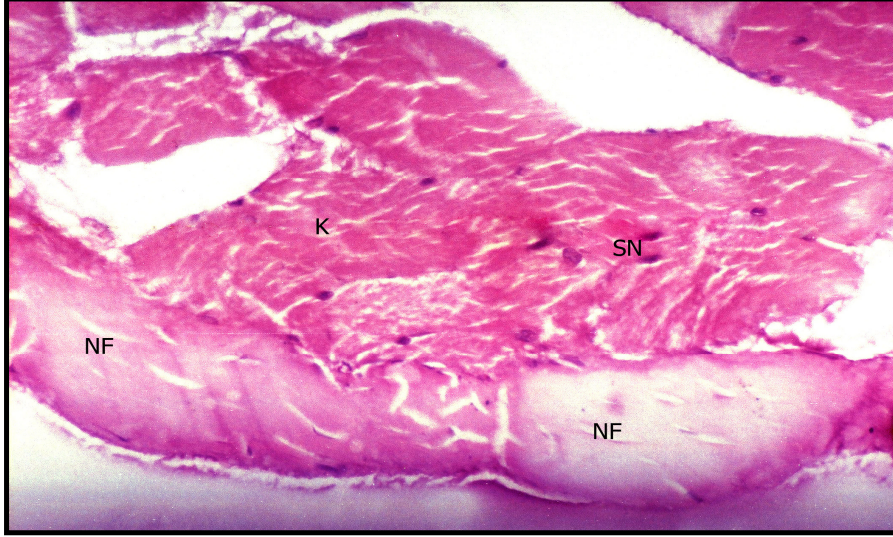
yapısının ovalleştiği, intersiyel bağ dokusunda artış ve mononükleer hücre infiltrasyonu izlendi.

### D2 Grubu

10 gün boyunca 0,1 mg/kg Atorvastatin verilen ve Hematoksilin-Eozin ile boyanan doku örneklerinin histopatolojik incelenmesinde, kas liflerindeki kontraksiyona bağlı olarak bazı bölümlerde ayrılma, çatallanma, nekrotik alanlar ve sentral nükleusta artış gözlemlendi.

### D5 grubu

10 gün boyunca 0,5 mg/kg Atorvastatin verilen ve Hematoksilin-Eozin ile boyanan doku örneklerinin histopatolojik incelenmesinde kas liflerindeki nükleusların formasyon değişikliğine bağlı olarak ovalleşme ve sentralde yer almaları dikkat çekiciydi. Ayrıca kas liflerinin kontraksiyonu sonucu yer yer nekrotik fibriller alan izlenmektedir (Resim 2).

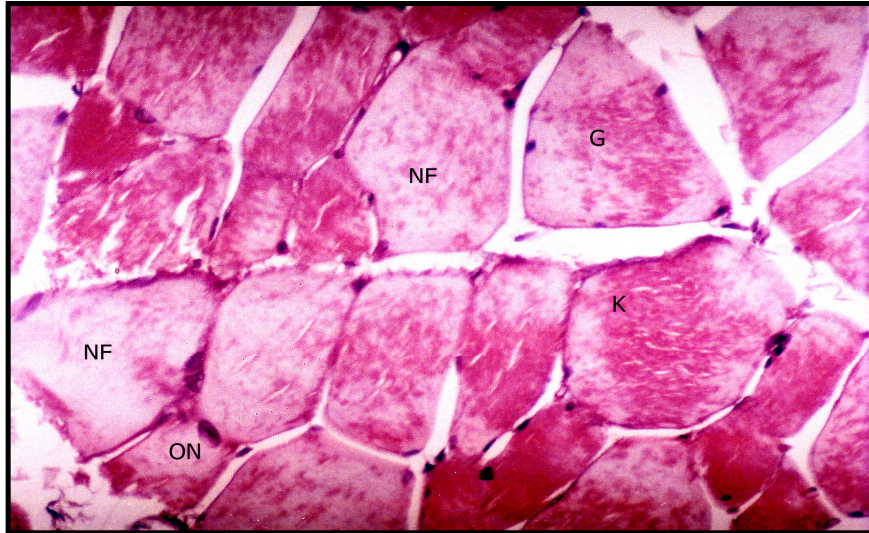


Resim 2: D5 Grubu, 10 gün boyunca 0.5mg/kg Atorvastatin verilen ratların quadriceps femoris kasının ışık mikroskopik görünümü; sentral ve oval nükleuslar gözlenirken, kas liflerinde nekrotik ve kontraktıl alanlar belirlendi. SN: sentral nükleus ON: oval nükleus, NF: nekrotik fibriller alan, K: kontraktıl alan (H&E Orijinal büyütme X 164).

#### D8 Grubu

10 gün boyunca 1mg/kg Atorvastatin verilen ve Hematoksilen-Eozin ile boyanan doku örneklerinin histopatolojik

incelenmesinde kas liflerinin nükleuslarında ovalleşme ve nekrotik fibriller alanlar izlendi. (Resim 3).



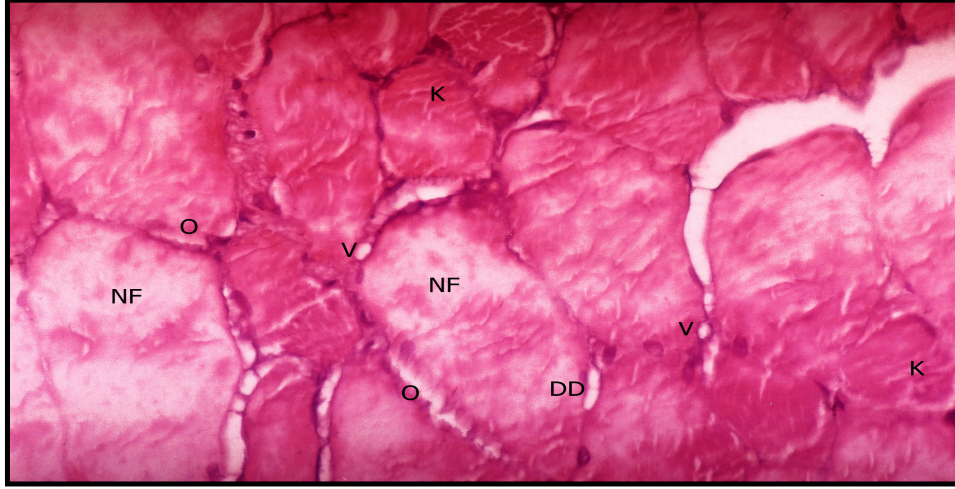
Resim 3: D8 Grubu, 10 gün boyunca 1mg/kg Atorvastatin verilen ratların quadriceps femoris kasının ışık mikroskopik görünümü; kas liflerinde hipertrofi, nekrotik ve kontraktıl alanlar gözlenirken, nükleuslarda ovalleşme tespit edildi. G: Kas liflerinde hipertrofi, NF: Nekrotik fibriller alan, ON: oval nükleus K: kontraktıl alan (H&E, orijinal büyütme X 164).



### D3 Grubu

15 gün boyunca 0,1mg/kg Atorvastatin verilen ve Hematoksilen-Eozin ile boyanan doku örneklerinin histopatolojik incelenmesinde kas liflerindeki kontraksiyonun artmasına bağlı olarak nekrotik alanlardaki artışın yanı sıra vakuoller yapıda izlendi.

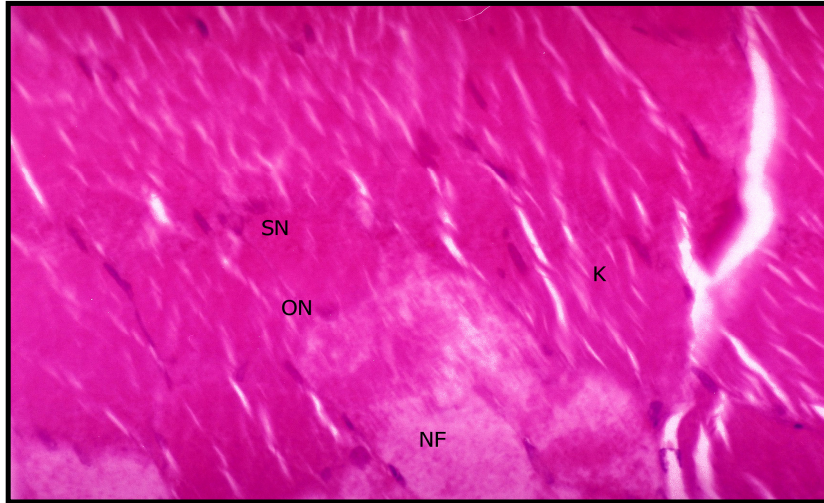
İntersisyonel bağ dokusunda ise hafif derecede ödem ve damarlarda dilatasyon izlendi (Resim 4).



Resim 4: D3 Grubu, 15 gün boyunca 0,1mg/kg Atorvastatin verilen ratların quadriceps femoris kasının ışık mikroskopik görünümü; kas liflerinde kontraksiyon, nekroz, vakuoler yapılar ve ödem tespit edilirken, damarlarda vazodilatasyon gözlemlendi. O: Ödem, V: Vakuol, NF: Nekrotik fibriler alan, K: Kontraksiyon, DD: Vazodilatasyon (H&E, orijinal büyütme X 164).

### D6 grubu

15 gün boyunca 0,5mg/kg Atorvastatin verilen ve Hematoksilen-Eozin ile boyanan doku örneklerinin histopatolojik incelenmesinde kas liflerinde kontraksiyona bağlı olarak yer yer nekrotik fibriler alan, nükleuslarda ovalleşme ve sentral nükleus izlendi (Resim 5).



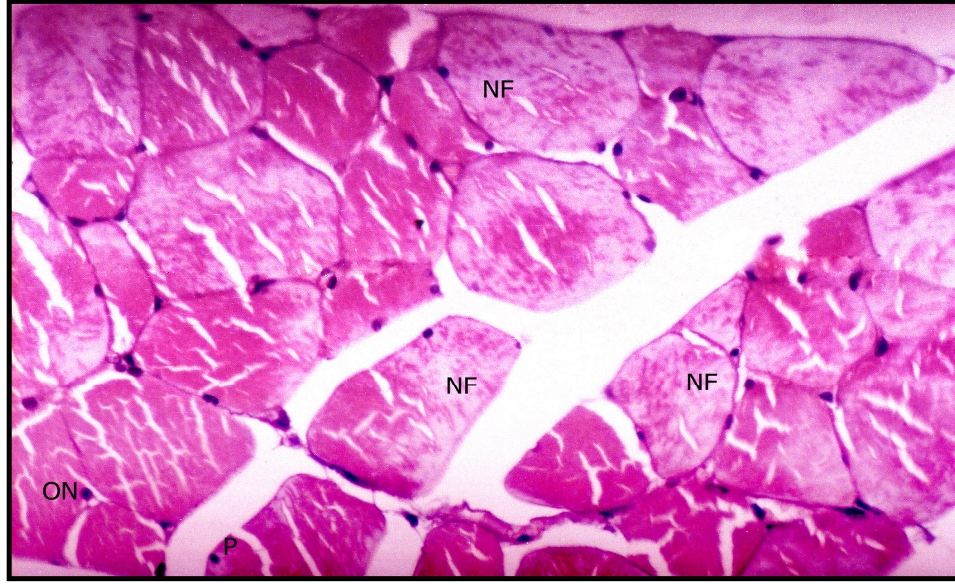
Resim 5: D6 Grubu, 15 gün boyunca 0,5mg/kg Atorvastatin verilen ratların quadriceps femoris kasının ışık mikroskopik görünümü; sentral ve oval nükleuslar tespit edilirken, kas liflerinde nekrotik ve kontraktıl

alanlar izlendi. NF: nekrotik fibriller alan, ON: Oval nükleus SN: Sentral nükleus, K: Kontraksiyon (H&E, Orijinal büyütme X 164).

### D9 Grubu

15 gün boyunca 1mg/kg Atorvastatin verilen ve Hematoksilen-Eozin ile boyanan doku örneklerinin histopatolojik

incelenmesinde kas liflerinde ileri derecede nekrotik alanlar oval nükleuslar ile yer yer nükleuslarda piknoz izlendi (Resim 6).



Resim 6: D9 Grubu, 15 gün boyunca 1 mg/kg Atorvastatin verilen ratların quadriceps femoris kasının ışık mikroskopik görünümü; kas liflerinde nekroz görülürken, nükleuslarda ovalleşme ve piknoziz. NF: Nekrotik fibriller alan, P: Piknoz, ON: Oval nükleus (H&E, orijinal büyütme X 164).

### TARTIŞMA

İnsanlarda ve bazı deney hayvanlarında statin kullanımına bağlı olarak gelişen kas miyopatisi ile ilgili histopatolojik değişiklikler pek çok araştırmacı tarafından tanımlanmıştır<sup>10-13</sup>. Sıçanlarda statinlerle ilgili yapılan çalışmalarda genel anlamda iskelet kaslarında inflamasyon ve nekroz önemli sayılan bulgular içinde yer almıştır<sup>13-15</sup>.

Schafer ve ark.<sup>16</sup> bir statin türevi olan cerivastatinini 10 gün süreyle sıçanlara uygulayıp, ışık mikroskobu ile değerlendirdiklerinde quadriceps femoris kasında herhangi bir değişiklik olmadığını tespit etmişlerdir. Çalışmamızda 10 gün süre ile 0,1-0,5 mg/kg/gün atorvastatin verdiğimiz rat quadriceps femoris kasının ışık mikroskopik bulgularında, sentral nükleus artışı, kas liflerinde dejeneratif

değişiklikler ve nekrozda artış tespit ettik. Bu bulgularımız Schafer ve ark.<sup>16</sup> ortaya koydukları bulgularla farklılık göstermektedir. Oysa Schafer ve ark. bir statin türevi olan cerivastatinini yüksek dozlarda 12 ve 15 gün süre ile verdiklerinde ise quadriceps femoris kasında dejenerasyon ve birtakım biyokimyasal değişikliklere neden olduğunu, 0,5 – 1mg/kg 15 gün süre ile uyguladıkları cerivastatinin etkisine bağlı olarak ise, kas liflerinde nekroz, kas lifleri arasında makrofaj infiltrasyonu, yer yer fibroblast proliferasyonu ve endomiyal kılıfta bağdoku artışının olduğunu gözlemişlerdir. Schafer ve ark.<sup>16</sup> yüksek dozda cerivastatin verdikleri bulgular ile bizim 0,5-1mg/kg 10-15 gün süre ile atorvastatin verdiğimiz ratların quadriceps femoris kaslarındaki bulgular ile bizim bulgularımız paralellik göstermektedir. Yüksek doz ve uzun süreli cerivastatin ve

atorvastatin tedavisinde quadriceps femoris kasında benzer etkilerin ortaya çıktığı, düşük dozda ise iki ilacın birbirinden farklı sonuçlara neden olduğunu söyleyebiliriz.

Waclawik ve ark.<sup>17</sup> 10 gün süre ile bir statin türevi olan lovastatin uyguladıkları ratların gastrocnemius kasında, ışık mikroskopik düzeyde değerlendirdiklerinde miyopatik değişiklikler gözlemişlerdir. Waclawik ve arkadaşları 10 gün süre ile lovastatin uyguladıkları ratların gastrocnemius kaslarını ayrıca değerlendirdiklerinde kas fibrillerinde nekroz ve makrofaj infiltrasyonuna rastlamışlardır. Bu bulgular ile, bizim çalışmamızdaki 10 gün süreli atorvastatinin grubundaki hem ilaç dozu uygulaması hemde süre bakımından değerlendirildiğinde, ışık mikroskopik bulgularımız ile benzerlik göstermektedir. Bundan farklı olarak sentral nükleus artışı ve nükleusların ovalleşmesi bizim farklı bulgularımız oldu. Sonuç olarak; Atorvastatin'in iskelet kası üzerindeki histopatolojik etkisinin düşük dozdan başlayarak yüksek doza, doğru orantılı olarak artış gösterdiği, Nükleuslardaki ovalleşmenin ve sentralleşmenin nedeninin; kas liflerindeki protein sentezini ve kas liflerindeki rejenerasyon hadisesini gösterdiği, bu araştırmanın sonuçları olarak ortaya çıkmaktadır.

Bu nedenlerle; atorvastatinin iskelet kaslarında göstermiş olduğu toksik etki ile birlikte, doz ve zaman baz alınarak, klinik açıdan hasta tedavilerinde daha dikkatli davranılması gerektiği kanaatine varıldı.

#### KAYNAKLAR

1. Graham DJ, Staffa JA, Shatin D, et al. Incidence of hospitalized rbdomyolysis in patients treated with lipid-lowering drugs. JAMA 2004;292:2585-90.
2. Shek A and Ferril MJ. Statin-fibrate combination therapy. Ann Pharmacother 2001;35:908-17
3. Omar MA, Wilson JP. FDA adverse event reports on statin-associated rbdomyolysis. Ann Pharmacother 2002;36:288-95.
4. Thompson PD, Clarkson P, Karas RH. Statin-associated myopathy. JAMA. 2003;289:1681-90.
5. Bennett W E, Drake AJ 3rd and Shakir KM. Reversible myopathy after statin therapy in patients with normal creatine kinase levels. Ann Intern Med 2003;138: 436-7.
6. Phillips PS, Haas RH, Bannykh S, et al. Statin-associated myopathy with normal creatine kinase levels. Ann Intern Med 2002;137:581-5
7. Beyer RE. An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant. Biochem Cell Biol 1992;70:390-403.
8. Rosenson RS, Lowe GD. Effects of lipids and lipoproteins On thrombosis and rheology. Atherosclerosis 1998;140:271-80.
9. Maron DJ, Fazio S, Linton MF. Current perspectives On statins. Circulation 2000;101:207-213.
10. Baker SK, Tarnopolsky MA. Statin myopathies: pathophysiologic and clinical perspectives. Clin Invest Med 2001;24:258-272.
11. Rousseau G, Desrosiers C, Varin F. A comparison of the effects of lovastatin and pravastatin on ubiquinone tissue levels in rats. Curr Ther Res 1998;59: 666-679.
12. Thelin A, Schedin S, Dallner G. Half-life of ubiquinone-9 in rat tissues. FEBS Lett 1992; 313:118-121.
13. von-Keutz E, Schluter G. Preclinical safety evaluation of cerivastatin, a novel HMG-CoA reductase inhibitor. Am J Cardiol 1998;82;11J-17J.
14. Manfredi G, Spinazzola A, Checcarelli N, Naini A. Assay of mitochondrial ATP synthesis in animal cells. Methods Cell Biol 2001; 65, 139- 141.
15. Smith PF, Eydeloth RS, Grossman SJ, et al. HMG-CoA reductase inhibitor-induced myopathy in the rat: cyclosporine A interaction and mechanism studies. J. Pharmacol Exp Ther 1991; 257;1225- 1235.
16. William H, Jeffery W, Amy F, et al. Evaluation of ubiquinone Concentration and mitochondrial function relative to cerivastatin- induced skeletal myopathy in rats. Toxicol Applied Pharmacol 2004;194 10-23.
17. Andrew JW, Sığurd L, Andrew G. Experimental lovastatin myopathy. J Neuropathol Exp Neurol 1993;542-549.