

**ATORVASTATİNİN ERKEK REPRODUKTİF
SİSTEM HÜCRE DİZİLERİNDE
TOKSİSİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Koray ÖZDEMİR

Eskişehir 2024

**ATORVASTATİNİN ERKEK REPRODUKTİF SİSTEM
HÜCRE DİZİLERİNDE TOKSİSİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Koray ÖZDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özlem ATLI EKİÖĞLU

Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Ekim 2024

Eskişehir

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Koray ÖZDEMİR'in "ATORVASTATİNİN ERKEK REPRODUKTİF SİSTEM HÜCRE DİZİLERİNDE TOKSİSİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ" başlıklı tezi 25/10/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Danışman)	: Prof. Dr. Özlem ATLI EKLIOĞLU	
Üye	: Prof. Dr. Sinem ILGIN	
Üye	: Dr.Öğr.Üy. Fuat KARAKUŞ	

Prof. Dr. Saime ÖNCE
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖZET

ATORVASTATİNİN ERKEK REPRODUKTİF SİSTEM HÜCRE DİZİLERİNDE TOKSİSİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Koray ÖZDEMİR

Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ekim 2024

Danışman: Prof. Dr. Özlem ATLI EKLİOĞLU

Erkek üreme sisteminin işlevi, erkek üreme fonksiyonunu sürdüren testosteron gibi androjenler üretmek ve spermatogenezi teşvik ederek döllenme için dişi üreme sistemine taşınmasını sağlamaktır. Erkek üreme sisteminin fonksiyonel hücreleri, testislerde bulunan Leydig ve Sertoli hücrelerinden oluşmaktadır. Bir statin türevidir olan atorvastatin; HMG-KoA redüktaz enzimi inhibitörüdür. Karaciğerdeki kolesterol sentezini HMG-KoA'nın mevalonata dönüşmesini engelleyerek azaltmaktadır. Bilimsel ve tıbbi literatürde; hiperkolesterolemi hastalığına sahip erkeklerde statin tedavisinin, steroid düzeylerinde ve sperm sayıları üzerindeki etkileri; popülasyona, doza ve komorbiditeye bağlı olarak fazlasıyla değişkendir. Bu tez çalışması kapsamında, TM3 Leydig ve TM4 Sertoli hücre hatları üzerine doza bağımlı hücre canlılığı MTT deneyiyle test edilmiştir. Atorvastatin kalsiyumun her bir konsantrasyonu için % inhibisyon değerleri hesaplanmış ve bu konsantrasyonlardan hareketle inhibitör konsantrasyon 50 belirlenmiştir. Sonuç olarak; atorvastatinin, MTT testinde TM3 Leydig ve TM4 Sertoli hücrelerine uygulanan farklı konsantrasyonlarında hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Atorvastatin, TM3 Leydig hücreleri, TM4 Sertoli hücreleri, MTT testi

ABSTRACT

ATORVASTATIN IN MALE REPRODUCTIVE SYSTEM CELL LINES

ASSESSMENT OF TOXICITY

Phc. Koray ÖZDEMİR

Department of Pharmaceutical Toxicology

Graduate School of Anadolu University, October 2024

Supervisor: Prof. Dr. Özlem ATLI EKLİOĞLU

The function of the male reproductive system is to produce androgens, such as testosterone that maintain male reproductive function and promote spermatogenesis, allowing them to be transported to the female reproductive system for fertilization. Functional cells of the male reproductive system consist of Leydig and Sertoli cells located in the testicles. Atorvastatin, a statin derivative; it is an HMG-CoA reductase enzyme inhibitor. It reduces cholesterol synthesis in the liver by preventing the conversion of HMG-CoA to mevalonate. In scientific and medical literature; effects of statin therapy on steroid levels and sperm counts in men with hypercholesterolemia; it is highly variable depending on population, dose, and comorbidities. Within the scope of this thesis study, dose-dependent cell viability was tested with MTT assay on TM3 Leydig and TM4 Sertoli cell lines. % inhibition values were calculated for each concentration of atorvastatin calcium and the inhibitor concentration 50 was determined based on these concentrations. In conclusion; it was observed that atorvastatin significantly reduced cell viability at different concentrations applied to TM3 Leydig and TM4 Sertoli cells in the MTT test.

Keywords: Atorvastatin, TM3 Leydig cells, TM4 Sertoli cells, MTT test

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimi tamamlama sürecimde değerli bilgilerini ve desteğini esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Özlem ATLI EKLİOĞLU'na,

Tezimin laboratuvar çalışmalarında ve yazım sürecinde yol gösteren, yardımlarını esirgemeyen sevgili hocalarım Arş. Gör. Merve GÜVEN'e ve Öğr. Gör. Büşra KORKUT ÇELİKATEŞ'e,

Hayatım boyunca desteklerini hiç esirgemeyen ve hep yanımda olan değerli aileme ve sevgili eşim Ecz. İclal ÖZDEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Koray ÖZDEMİR

25/10/2024

ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIM BEYANI

Bu tezi hazırlarken (ChatGPT, Gemini, DALL-E vb.) üretken yapay zekâ programlarından destek almadığımı beyan ederim.

Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Koray ÖZDEMİR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIM BEYANI	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 Atorvastatin	3
2.1.1 Atorvastatinin endikasyonları	5
2.1.2 Atorvastatinin farmakokinetiği	6
2.1.3 Atorvastatinin metabolizması	6
2.1.4 Atorvastatinin advers etkileri ve toksisitesi	7
2.1.5 Atorvastatinin ilaç-gıda etkileşimleri	8
2.1.6 Atorvastatinin kontrendikasyonları	9
2.1.7 Atorvastatinin erkek üreme sistemine etkisi	10
2.2 Erkek Üreme Sistemi	11
2.2.1 Testis	11
2.2.2 Sertoli ve Leydig hücreleri	12
2.2.3 Kan-testis bariyeri	13
2.2.4 Hipotalamus-hipofiz-testis aksı ve hormonları	14
2.2.5 Spermatogenez	15
2.2.5.1 Spermatogenezin düzenlenmesinde Leydig hücrelerinin rolü ve mekanizması	15
2.2.5.1.1 Androjenler	15
2.2.5.1.2 Testosteron	15

	<u>Sayfa</u>
2.3 Erkek Reprodüktif Sistem ve Kolesterol İlişkisi	16
2.4 Erkek Reprodüktif Sistem Toksisitesi	17
2.4.1 <i>İn vitro</i> reprodüktif toksisite modelleri	17
2.4.2 Sitotoksisite testleri	19
2.4.2.1 <i>MTT testi</i>	19
2.4.2.2 <i>Nötr Kırmızı Boya Alımı Testi</i>	19
2.4.2.3 <i>Propidyum iyodür alım testi</i>	20
2.4.2.4 <i>Laktat dehidrogenaz testi</i>	20
2.4.2.5 <i>Tripan mavisi dışlama testi</i>	20
3 GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	21
3.2 Kullanılan Araç ve Gereçler	22
3.3 Kullanılan Hücre Hatları	22
3.4 Yöntemler	23
3.4.1 Hücre hatlarının çoğaltılması	23
3.4.2 Hücre canlılığının belirlenmesi	23
3.4.2.1 <i>MTT sitotoksisite testinin uygulanması</i>	24
3.4.3 İstatistiksel analiz	25
3.5 Moleküler Doking Çalışmaları	25
4 BULGULAR	27
4.1 Sitotoksite Testleri	27
4.1.1 <i>MTT sitotoksisite testi</i>	27
4.2 Moleküler Doking Çalışmaları	29
5 TARTIŞMA	38
5.1 Atorvastatinin Erkek Reprodüktif Sistem Toksisitesinin	
Değerlendirilmesi.....	38
5.2 Moleküler Doking ve Toksikoloji İçin Önemi.....	41
5.2.1 Doking testinde kullanılan yolaklar	41
5.2.1.1 <i>IL-1β</i>	41
5.2.1.2 <i>TNF-α</i>	42
5.2.1.3 <i>Kaspaz-3</i>	42

5.2.2 Erkek reproduktif sistem için IL-1 β , TNF- α ve Kaspaz-3'ün önemi	43
5.2.3 Atorvastatinin; TNF- α , IL-1 β ve Kaspaz-3 ile ilişkisi	43
6 SONUÇ VE ÖNERİLER	46
KAYNAKÇA	47
ÖZ GEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Statinlerin ilaç etkileşimleri	8
Çizelge 4.1 Atorvastatin molekülünün TNF- α (PDB ID:2AZ5), IL-1 β (PDB ID:8C3U) ve kaspaz-3 (PDB ID:4QTX) kristalleri için doking skorları	30
Çizelge 4.2 Atorvastatin molekülünün TNF- α (PDB ID:2AZ5), IL-1 β (PDB ID:8C3U) ve kaspaz-3 (PDB ID:4QTX) kristalleri için aminoasit etkileşimleri ve tipleri	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Statinlerin etki mekanizması	3
Şekil 2.2 Atorvastatinin kimyasal yapısı.....	4
Şekil 4.1 Atorvastatin konsantrasyonunun TM3 Leydig hücrelerine etkileri (%)	27
Şekil 4.2 Atorvastatin konsantrasyonunun TM4 Sertoli hücrelerine etkileri (%)	28
Şekil 4.3 Atorvastatin ile TNF- α (PDB ID:2AZ5) etkileşiminin iki boyutlu görseli ..	32
Şekil 4.4 Atorvastatin ile TNF- α (PDB ID:2AZ5) etkileşiminin üç boyutlu görseli ..	33
Şekil 4.5 Atorvastatin ile IL-1 β (PDB ID:8C3U) etkileşiminin iki boyutlu görseli ...	34
Şekil 4.6 Atorvastatin ile IL-1 β (PDB ID:8C3U) etkileşiminin üç boyutlu görseli ...	35
Şekil 4.7 Atorvastatin ile kaspaz-3 (PDB ID:4QTX) etkileşiminin iki boyutlu görseli	36
Şekil 4.8 Atorvastatin ile kaspaz-3 (PDB ID:4QTX) etkileşiminin üç boyutlu görseli	37

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
CYP3A4	: Sitokrom P450 3A4
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
DMEM-F12	: Dulbecco'nun Modifiye Eagle Ortamı
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EST	: Fare Embriyonik Kök Hücre Testi
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FSH	: Folikül Stimüle Edici Hormon
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HMG-KoA	: 3-hidroksi-3-metilglutaril Koenzim A
ICH	: İnsan Kullanımına Yönelik Farmasötiklere İlişkin Teknik Gereksinimlerin Uyumlaştırılmasına İlişkin Uluslararası Konsey
IDL	: Orta Yoğunluklu Lipoprotein
IL	: İnterlökin
İK50	: İnhibitör Konsantrasyon 50
KKH	: Koroner Kalp Hastalığı
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LH	: Luteinize Edici Hormon
LPS	: Lipopolisakkarit
MM	: Sıçan Uzun Tomurcuğu Mikrokütlesi
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
OATP1B1	: Organik Anyon Taşıyıcı Polipeptit 1B1
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri

SLE	: Sistemik Lupus Eritematozus
TM3	: Leydig Hücreleri
TM4	: Sertoli Hücreleri
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktörü
VLDL	: Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
VTE	: Venöz Tromboembolizm
WEC	: Sıçan İmplantasyon Sonrası Tam Embriyo Kültürü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

1 GİRİŞ ve AMAÇ

Düşük testosteron seviyelerinden ya da testosteroon karşı duyarsızlıktan dolayı, erkek üreme sisteminde problemler ortaya çıkmaktadır. Bu problemler de ejakülasyon sıkıntılarına, kas kayıplarına, libido azalmasına, kemik yoğunluğu seviyelerinde azalmaya, kısırlığa, vücuttaki kılların azalmasına ve cinsel gelişim sürecinin aksamasına neden olabilmektedir. Problemler, ergenlikten önce ya da doğuştan ortaya çıkmaktadır. Enerji azalması, depresyon hali, anemi ya da vücut yağının artması da düşük testosteron seviyesinin semptomları arasında yer almaktadır. İnsülin direnci, metabolik sendrom ve ateroskleroz da düşük testosteron seviyeleriyle ilgili diğer komorbiditeler arasında yer almaktadır (Ross ve Bhasin, 2016; Lee ve Tillman, 2016).

Düşük testosteron sebebiyle de oluşabilen kısırlık oranları, dünya çapında farklılık göstermektedir. Yaklaşık her on çiftten birinin birincil veya ikincil kısırlığa sahip olduğu tahmin edilmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde daha fazla insan kısırlıktan etkilenmektedir. Çünkü üreme sistemine zarar veren ve doğurganlık hizmetlerine erişimin mümkün olmadığı ya da kısıtlı olduğu bulaşıcı hastalıklar sebebiyle kısırlık meydana gelmektedir (WHO, 2002, s. 25-27; WHO, 2003, s. 23).

Olgunlaşmamış germ hücrelerinin; haploid uzun spermatidleri oluşturması için bölünme, farklılaşma ve mayoz bölünmeye uğradığı sürece spermatogenez adı verilmektedir. Testisin seminifer tübülleri içerisinde gerçekleşen bu süreç, sertoli hücreleriyle bağlantılı olarak gerçekleşmektedir. Germ hücrelerinin gelişim süreci bittiğinde, olgun spermatidler sertoli hücrelerinden tübül lümenine geçmektedir. Daha sonra rete testis boyunca ilerlemektedir. Spermatidler, epididimisten geçiş esnasında döllenme kabiliyetine erişmek ve hareketli bir sperm olabilmek için birtakım biyokimyasal süreç geçirmektedir (O'donnell vd., 2001).

Erkek reproduktif sistemin önemli hormonlarından testosteronun öncü maddesi olan kolesterol, spermatogenez sürecinde yer almaktadır. Aynı zamanda sperm yapısı ve seminal sıvı için kritik öneme sahiptir (Scott vd., 1967; Yokoyama, 2000).

Kardiyovasküler hastalıklar tüm dünya genelinde, ölümlerin başlıca sebepleri arasındadır. Bu kardiyovasküler rahatsızlıkların gelişiminde ve ilerlemesinde, hiperkolesterolemi yani kanda normal düzeylerden daha yüksek miktarda kolesterol bulunması rol oynamaktadır (Superko ve Krauss, 1994; Menotti vd., 2011).

Yapılan son çalışmalara göre; hiperkolesteroleminin görülme sıklığının giderek arttığı ve daha fazla etnik kökenden ve dünyanın birçok farklı yerinden insanları etkilediği görülmüştür (Hu vd., 2020).

Statin ilaçlarının piyasaya sürülmesi, aterosklerotik damar hastalığının tedavisini ve önlenmesini önemli derecede etkilemiştir. Statinler; lipid düzeylerini azaltarak ve koroner kalp hastalığı riskini düşürerek, morbidite ve mortaliteyi düşürmede en etkili ilaç grupları arasında bulunmaktadır. Atorvastatin; hiperkolesterolemili hastalarda önemli ölçüde lipit düzeylerini azaltmakta olan bir statindir. Bundan dolayı; koroner kalp hastalığı riskine sahip bireyler için tedavide ilk tercih edilen ilaçlar arasındadır. Diğer statin ilaçları gibi atorvastatinin de advers etkileri çoğunlukla kalıcı ve ağır bir şekilde gözlenmemektedir (van Leuven ve Kastelein, 2005). Atorvastatin kullanımı ile miyopati ve rabdomiyoliz görülme riski oldukça yükselmektedir (Jayatilaka vd., 2021). Atorvastatinin testosteron üretimini, sperm miktarını ve kalitesini olumsuz yönde etkileyebileceği konusunda tartışmalar bulunmaktadır. Bundan dolayı, hiperkolesterolemi tedavisi için sıklıkla tercih edilen atorvastatinin, erkek reproduktif sistem hücre dizilerine yaptığı etkilerin aydınlatılması ihtiyaı doğmuştur (Pons-Rejraji vd., 2014).

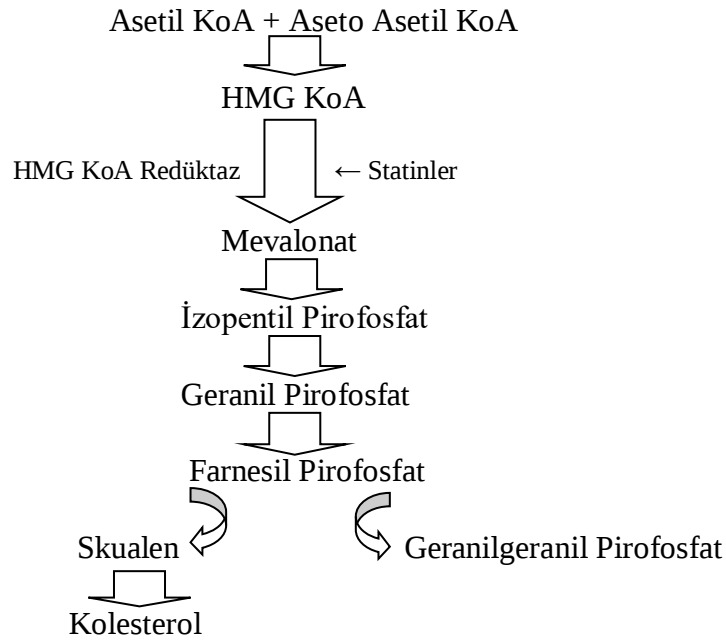
Bu tez çalışmasında; atorvastatinin erkek reproduktif sistem hücre dizilerinde toksisitesinin *in vitro* değerlendirilmesi ve olası toksisitenin mekanizmasının aydınlatılması amaçlanmaktadır. Çalışma kapsamında; Sertoli ve Leydig hücrelerinde atorvastatinin hücre canlılığına etkisi, 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) yöntemi ile belirlenecektir. Ardından olası toksisitenin mekanizması açısından mümkün yolaklar olan interlökin-1 β (IL-1 β), tümör nekroz faktörü α (TNF- α) ve kaspaz-3 ilişkileri moleküler dking ile araştırılacaktır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Atorvastatin

Bir statin türevi olan atorvastatin; 3-hidroksi-3-metilglutaril Koenzim A (HMG-KoA) redüktaz enzimi inhibitörüdür. Karaciğerdeki kolesterol sentezini HMG-KoA'nın mevalonata dönüşmesini engelleyerek azaltmaktadır. Atorvastatin, hepatik hücrelerin yüzeyinde bulunan düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptörlerinin miktarını çoğaltmaktadır (McIver ve Siddique, 2017).

Şekil 2.1 Statinlerin etki mekanizması

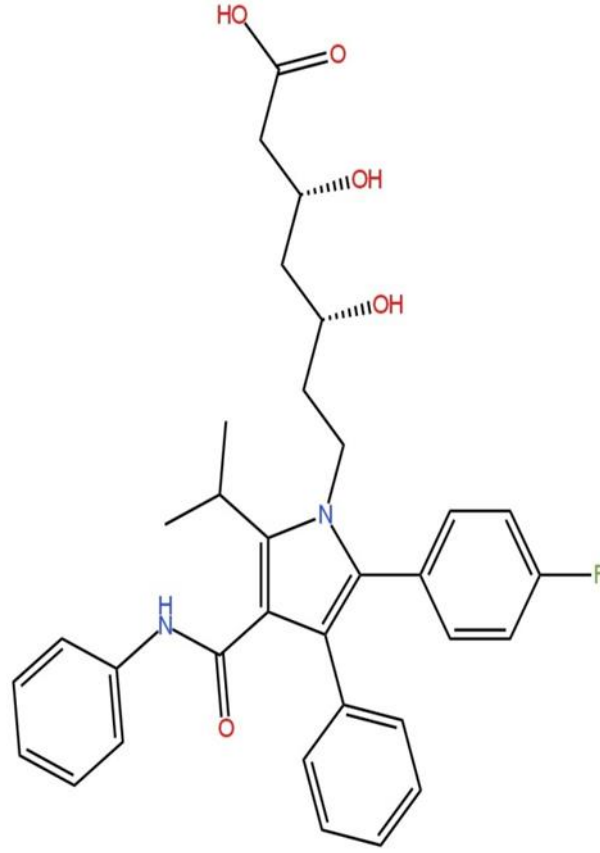


Kaynak: Sirtori, 2014

Atorvastatin; anormal lipit profillerine sahip ve kardiyak riski olan hastalarda beslenme değişimiyle ve egzersizle birlikte kullanılmakta olan Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı bir statindir (Raddino vd., 2010).

Atorvastatinin kimyasal formülü $C_{33}H_{35}FN_2O_5$ 'dir. Molekül ağırlığı 546 g/mol, pKa değeri ise 4.46'dır. Atorvastatin, lakton ön ilacı olarak verilmemektedir. Aktif hidroksi asidin kalsiyum tuzu olarak oral yoldan alınmaktadır. Atorvastatin kalsiyum, pH 4'ün aşağısındaki sulu çözeltilerde çözünmemektedir. Distile suda, pH 7.4 fosfat tamponunda ve asetonitril içerisinde çok az çözünmektedir. Etanolde az çözünmektedir. Metanolde ise serbestçe çözünmektedir. Klinik anlamda 10 mg ile 80 mg arasında günlük kullanımı vardır (Christian ve Purdy, 1962; Cilla Jr vd., 1996).

Şekil 2.2 Atorvastatinin kimyasal yapısı



Endojen kolesterol sentezi genellikle gece gerçekleşmektedir. Lovastatin, fluvastatin ve simvastatin gibi kısa yarı ömürlü statinlerin, gece yatmadan önce kullanılması gerekmektedir. Fakat bu statinlere kıyasla daha uzun yarı ömürlü olan atorvastatin, yemekle birlikte veya yemekten bağımsız, her gün aynı saatte olmak koşuluyla günün herhangi bir saatinde kullanabilmektedir (McIver ve Siddique, 2017).

Atorvastatin doz ayarlanması yapılırken, LDL kolesterolü düşürebilme etkisine göre doz belirlenebilmektedir. Orta yoğunluktaki statin 10-20 mg arasındaki dozu belirtirken, 40-80 mg arasındaki doz yüksek yoğunluktaki dozu belirtmektedir. LDL kolesterolü; orta yoğunluklu statinler yaklaşık % 30-50 arasında, yüksek yoğunluklu statinler ise % 50 oranından fazla düşürebilmektedir (Stone vd., 2014).

Karaciğer fonksiyon testleri, atorvastatine başlayan hastalara yapılmalıdır. Ayrıca lipid paneli yapılmalıdır. 6 haftadan sonra lipid paneli tekrarlanmalıdır. Hastanın ilacı kullanması belli bir süreyi geçince lipid değerleri 6-12 ayda bir kontrol edilmelidir. Atorvastatin tedavisi alan ve aynı zamanda diyabetli ya da diyabet riski olan hastaların şeker seviyeleri de incelenmelidir (McIver ve Siddique, 2017).

Atorvastatinin kolesterol seviyesini düşürme ve kardiyovasküler hastalıkları önlemesi hastaya bağlı olmaktadır. Yaşam tarzının ve diyetin değişmesi de ilaca ilave olarak tedavide büyük önem taşımaktadır (McIver ve Siddique, 2017).

Atorvastatin ve metabolitleri renal eliminasyona uğramadığından dolayı, hastalardaki renal fonksiyonların düşmesi halinde, atorvastatinde doz ayarlaması yapılmasına gerek duyulmamaktadır. Atorvastatin plazma proteinlerine bağlandığından dolayı, hemodiyaliz bu ilacı elimine etmemektedir (McIver ve Siddique, 2017).

2.1.1 Atorvastatinin endikasyonları

Hücrel homeostazı dengede tutmak için gerekli olan lipit, kolesteroldür. Steroid hormonlarının öncüsüdür. Plazma membranlarının önemli bir bileşenidir (Brown ve Goldstein, 1986; Ikonen, 2008).

Çok sayıda insan hücresi tarafından sentezlenen kolesterol, başlıca karaciğerde sentezlenen önemli bir steroldür. Hücre zarı için önemli bir bileşendir. D vitamini, safra asitleri ve steroid hormonlarının sentezlenmesinde öncü olarak görev almaktadır. Plazmada ilk olarak LDL formunda taşınmaktadır. Dokulardan karaciğere ise yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL) ile taşınmaktadır. Daha sonra safra yoluyla atılmaktadır. Sağlıklı insanlarda kolesterol seviyesi 200 mg/dl'nin altındadır. 200-239 mg/dl arası ise sınırda yüksek olarak kabul edilmektedir. 240 mg/dl ve üzeri kolesterol seviyesi ise; yüksek tansiyon, kalp krizi, kardiyovasküler hastalıklar, felç, periferik arter hastalığı, tip 2 diyabet gibi hastalıklar için biyobelirteç işlevi görmektedir (Narwal vd., 2019).

Kolesterolün kanda taşınması lipoprotein denilen moleküllerle gerçekleşmektedir. Lipoprotein, lipit ve proteinden oluşmaktadır. Üç ana tip lipoprotein bulunmaktadır (Pundir ve Narwal, 2018).

LDL, kötü kolesterol olarak tanımlanmaktadır. Kolesterolü karaciğerden alıp vücudun farklı hücrelerine taşımaktadır. Serum seviyesi yükseldiğinde, arteriyel hastalık riskinin arttığını göstermektedir (Menotti vd., 2011).

HDL ise iyi kolesterol olarak tanımlanmaktadır. LDL'nin arteriyel hastalık riskini azaltmaktadır. Vücudun farklı hücrelerinden kolesterolü karaciğere taşımaktadır (Myant, 1981).

Trigliseritler ise, gıdalarda bulunan yağın birçoğu bu kimyasal formda bulunmaktadır. Alınan gıdaların, vücut tarafından tüketimi olmazsa trigliserite dönüştürülmektedir. Daha sonra ise yağ hücrelerinde depo edilmektedir (Myant, 1981).

Dünya genelinde kardiyovasküler hastalıklar, ölümlerin başlıca sebeplerindendir. Ateroskleroz, koroner kalp kalp hastalığının (KKH) ve felcin başlıca sebebidir. Aterosklerozun ve KKH'nın ilerlemesinde en önemli faktörlerden birisi hiperkolesterolemidir. Toplam serum kolesterolünün artması ya da LDL kolesterol seviyesinin artışı, aterosklerotik hastalığın ve KKH'nın ortaya çıkma riskini artırmaktadır. Hiperkolesteroleminin tedavisi, HMG-KoA redüktaz inhibitörlerinin yani statinlerin kullanılmasıyla farmakolojik tedavide önemli bir boyut kazanmıştır. Aterosklerozun ve KKH'nın ilerlemesi; statinlerin reçineler, fibratlar veya nikotinik asit türevleriyle birlikte veya birlikte olmadan kullanılmasıyla geciktirilebilmektedir (Superko ve Krauss, 1994; Levine vd., 1995; Gotto Jr, 1995).

Atorvastatin; homozigot veya heterozigot ailesel hiperkolesterolemi, ailesel olmayan hiperkolesterolemi, mikst dislipidemi veya izole hipertrigliseridemiye sahip hastalarda toplam kolesterolü, LDL kolesterolü, apolipoprotein B'yi, çok düşük yoğunluklu lipoproteini (VLDL) ve trigliseritleri azaltırken, HDL miktarını da artırmaktadır. Ayrıca disbetalipoproteinemi hastalarında orta yoğunluklu lipoproteini (IDL) azalttığı gösterilmiştir (Karvaly vd., 2021).

2.1.2 Atorvastatinin farmakokinetiği

Atorvastatin, oral olarak alındıktan sonra çabuk bir şekilde emilmektedir. 1-2 saat içerisinde maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşmaktadır. İlk geçiş metabolizmasına uğramaktadır. Bundan dolayı biyoyararlanımı düşüktür ve % 14 civarındadır. Plazma proteinlerine yaklaşık % 98 oranında bağlanmaktadır ve neredeyse 380 litrelik bir dağılım hacmine sahiptir. Fizyolojik açıdan atorvastatinin bağırsaktaki geçirgenliği, bağırsak lümeni pH'ı olan pH 6'da yüksektir (Kearney vd., 1993; Amidon, 1995; LennernÄs, 1997).

2.1.3 Atorvastatinin metabolizması

Atorvastatin ve metabolitlerinin eliminasyonunda esas olarak karaciğer görev almaktadır. Böbrekten atılım ise ikinci yol olmaktadır. Yaklaşık % 1'lik bir kısmın idrar yoluyla atıldığı gösterilmektedir (Stern vd., 1997). Atorvastatinin oral olarak alımı sonucunda; safra ve plazmada metabolitlerine rastlanmaktadır. Atorvastatin için

yapılmış bir çalışmada, ilacın ve metabolitlerinin atılımının safradan olduğu gösterilmiştir (Le Couteur vd., 1996; Karvaly vd., 2021).

Aktif metabolitlerin oluşumunda görevli esas enzim sitokrom P450 3A4 (CYP3A4)'dür (Jacobsen vd., 2000). Atorvastatin ve metabolitleri, karaciğerde çeşitli metabolik yollardan geçmektedir. CYP3A4 ile oksidasyon, β -oksidasyon, hidroliz ve UGT ile glukuronidasyon'a uğrayabilmektedir (Prueksaritanont vd., 2002).

Atorvastatinin metabolizmasına yönelik çalışmalar, hidroksilasyonun ana metabolik yol olduğu iki ana metaboliti tanımlamaktadır. Bunlar orto ve para hidroksillenmiş metabolitlerdir. Plazmada, 2-hidroksi-atorvastatin asit ve 4-hidroksi-atorvastatin asit olmak üzere ikisi de inaktif lakton formlarıyla dengede bulunan iki aktif metaboliti bulunmaktadır (Kantola vd., 1998; Jacobsen vd., 2000). 2-hidroksi-atorvastatin asit ve lakton formu plazmada bulunan baskın metabolitlerdir (Lilja vd., 1999).

Spesifik CYP inhibitörleri ve izole CYP enzimleri kullanılarak yapılan *in vitro* çalışmalar, CYP3A4'ün iki aktif metabolitin açığa çıkmasını sağlayan ana enzim olduğunu göstermektedir (Jacobsen vd., 2000). Atorvastatin asidin CYP3A4 enzimlerine karşı göreceli olarak daha az afinitesi bulunmaktadır (Christians vd., 1998). Atorvastatin laktonun ise; asit formuna göre, CYP3A4 enzimlerine daha fazla afinitesi bulunmaktadır (Jacobsen vd., 2000). Atorvastatinin yarı ömrü yaklaşık 14 saat, aktif metabolitlerinin ise 20-30 saat arasındadır (Karvaly vd., 2021).

2.1.4 Atorvastatinin advers etkileri ve toksisitesi

Atorvastatin kullanan hastalarda dispepsi, bulantı, ishal, idrar yolu enfeksiyonu, nazofarenjit, uykusuzluk, artralji ve ekstremitelerde ağrı gibi yaygın advers etkiler görülebilmektedir. Kaslarda ağrı, hassasiyet veya zayıflık dahil miyopatiler oluşmaktadır. Miyopatik etki, ilacın artan dozuyla ve kandaki konsantrasyonunu artıran durumlarla birlikte artmaktadır (McClure vd., 2007). Atorvastatin kullanan hastalarda kreatin fosfokinaz yüksekliği normal değerden on kat daha fazladır. Ayrıca bu ilacı alan hastalarda rabdomiyoliz gözlemlenmiştir (Nemati vd., 2021). Rabdomiyoliz gelişme riski, böbrek fonksiyonlarında bozukluk olan hastalarda yükselmektedir. Ayrıca atorvastatinin plazma konsantrasyonunu artıran ilaçlarla, atorvastatinin beraber kullanılması miyopati ve rabdomiyoliz riskini yükseltmektedir (Jayatilaka vd., 2021).

Yapılan çalışmalar, statinlerin diyabet gelişme riskini ve açlık serum glikozunu artırdığı göstermektedir. FDA 2012 senesinde statinlerin güvenlik etiketlemelerine bu değişiklikleri eklemiştir (Chogtu vd., 2015).

Atorvastatin, karaciğerdeki fonksiyonların anormalleşmesine sebep olabilmektedir. Atorvastatin kullanan hastaların serum transaminazları normalden 3 kat daha fazla artarsa, plazma konsantrasyonları daha çok gözlemlenmelidir ya da tedavideki doz düşürülmeli veya tedavi bırakılmalıdır (Filppula vd., 2021).

Pediyatrik hastalarda atorvastatin ile ilgili fazla değerlendirme yapılmamıştır. 65 yaş üstü geriyatrik hastaların plazmadaki atorvastatin konsantrasyonu genç yetişkinlere kıyasla daha fazla olabilmektedir. Bundan dolayı statin kaynaklı miyopati riski artabilmektedir (McIver ve Siddique, 2017).

Farklı dozlarda atorvastatin, farklı etkiler göstermektedir. Düşük dozda kullanılan atorvastatin, antiinflamatuvar ve antioksidan etkilere neden olabilmektedir. Fakat yüksek dozda kullanılan atorvastatin, sperm morfolojisini ve motilitesini olumsuz etkileyebilmektedir (Wassman vd., 2002; Pons-Rejraji vd., 2014; Klinefelter vd., 2014; Hamzeh vd., 2018;).

Atorvastatin için doz aşımı durumunda panzehiri bulunmamaktadır. Doz aşımı olduğu takdirde hastalar advers durumlar bakımından gözlemlenmelidir (McIver ve Siddique, 2017).

2.1.5 Atorvastatinin ilaç-gıda etkileşimleri

Çizelge 2.1 Statinlerin ilaç etkileşimleri

İlaçlar	Atorvastatin	Serivastatin	Fluvastatin	Lovastatin	Pravastatin	Simva statin
Siklosporin	+	+	—	+	+	+
A						
Digoksin	+	hayır	—	—	—	+
Fibratlar	+	+	—	+	+	+
Varfarin	—	—	+	+	—	+

Not*: +: etkileşim rapor edilmiştir. —: etkileşim bildirilmemiştir. hayır: veri mevcut değildir

Kaynak: Paoletti vd., 2002

CYP3A4 inhibitörü ilaçlarla atorvastatinin beraber kullanılması, atorvastatin plazma konsantrasyonunu artırabilmektedir. Bunun sonucunda da miyopati gibi advers olaylar meydana gelmektedir. CYP3A4 indükleyici ilaçlar ise atorvastatin plazma konsantrasyonlarının azalmasına sebep olabilmektedir. Atorvastatin biyoyararlanımını organik anyon taşıyıcı polipeptit 1B1 (OATP1B1) inhibitörleri artırabilmektedir. Atorvastatin, etinil estradiol ve noretindronun ilaç konsantrasyonunu artırabilmektedir (Hirota vd., 2020; Božina vd., 2021).

HIV proteaz inhibitörleri, fibratlar, siklosporin, makrolid antibakteriyeller ve azol antifungalleri gibi ilaçlarla atorvastatin kullanımı, rabdomiyoliz potansiyelini ciddi derecede artırmaktadır (Omar vd., 2001).

Yapılan bir vaka çalışmasına göre, atorvastatin ve fusidik asit birlikte kullanıldığında, hastada akut rabdomiyoliz gerçekleşmiştir (Wenisch vd., 2000).

Atorvastatin ile digoksinin beraber kullanımı, önemli bir etkileşim oluşturmaya da plazma digoksin seviyesinde az düzeyde bir artış gözlemlenmiştir ve kardiyak aktivitede artış olmuştur (Walker, 1989; Boyd vd., 2000).

Greyfurt suyunun, atorvastatinin plazma seviyesini neredeyse 3 kat artırdığı bulunmuştur (Lilja vd., 1999).

2.1.6 Atorvastatinin kontrendikasyonları

Atorvastatine hassasiyeti olan hastalarda kontrendikasyon gelişebilmektedir. Aktif karaciğer hastalığına sahip hastalarda kontrendikasyon gelişse de, hepatit ve yağlı karaciğer hastalıklarında lipit düşürücü tedavinin faydaları, muhtemel risklerden daha önemli olup ilaç kullanımı gerekmektedir (Tandra ve Vuppalandhi, 2009). Alkole bağlı kronik karaciğer hastalığına sahip insanlarda, atorvastatin plazma konsantrasyonlarında artışlar olduğu belirlenmiştir. İlaça maruziyet oranı Child-Pugh sınıf A olan hastalarda 4 kat, Child-Pugh sınıf B olan hastalardaysa 11 kat daha fazladır. Aktif karaciğer hastalığına sahip olan hastalarda, atorvastatin kontrendikedir (Filppula vd., 2021).

Kadın hastalarda hamilelik sürecinde atorvastatin kontrendikedir. Atorvastatin tedavisi alan kadın hastalara, hamile kalmaları durumunda fetüse verebileceği riskler göz ardı edilmemelidir ve hasta bilgilendirilmelidir. Hamile kadınların en riskli dönemi ilk 3 aylık dönemdir. Bundan dolayı kadın hastalar hamile olmadan en az 3 ay öncesinden atorvastatin tedavisini bırakması gerekmektedir. Hamile kaldığı takdirde de ilacı hemen kesmelidir. Ayrıca kadın hastaların emzirme döneminde bu ilacı kullanmaması

gerekmektedir. Eğer mutlaka bu tedaviyi kullanması gerekliyse emzirme bırakılmalıdır (Zarek ve Koren, 2014).

2.1.7 Atorvastatinin erkek üreme sistemine etkisi

Steroller, erkek üreme fizyolojisinde önemli bir yer tutmaktadır. Steroidogenez, spermatogenez ve fertilizasyon için gerekmektedir. Sterol olan kolesterol; spermatogonia çoğalması, farklılaşması ve spermin tamamen gelişmesi için gereklidir. Sperm hareketliliğini daha kolay hale getirmek için epididimdeki lipit zarının yeniden düzenlenmesi gerekmektedir. Kapasitasyon için de plazma zarından kolesterol akışı gerekmektedir. Bozulmuş olan lipit metabolizması bu etkileri bozabileceğinden dolayı kısırlığa neden olabileceğinden; statinler, lipit metabolizmasını düzeltme kabiliyetini kullanarak bu metabolizmayı düzeltebilmektedir. Fakat spermatogenez için gerekmede olan testosteron steroid bir hormondur. Öncül olarak kolesterol gerektirmektedir. Fakat statinler de kolesterol seviyesini düşürmektedir. Bu durum, atorvastatin ve diğer tüm statinlerin erkek üreme sistemi üzerinde etkisi açısından olumsuz etki yaratabileceği düşüncesini meydana getirmiştir (Brewis vd., 2005; Fraser, 2010; Kim vd., 2017; Omolayo vd., 2022).

Statin ilaçları, serum kolesterol seviyelerini düşürmelerinin yanında, dolikol ve koenzim q10'u da azaltmaktadır. Azalmış olan koenzim q10 konsantrasyonu sperm hareketliliğini, canlılığını ve sayısını azaltmaktadır (Littarru ve Langsjoen, 2007; Brault vd., 2014; Gvozdjakova vd., 2014).

Lipit metabolizması hastalıkları doğurganlığın bozulması ya da farklılaşan sperm sayılarıyla bağlantılıdır. Bu yüzden teorik olarak statin tedavisi, dislipidemi anlamında sperm sayılarında iyileşmeye olanak tanımaktadır. Bununla beraber, statin ilaçlarının testosteron üretimini bozabileceği ve testiküler sperm üretimini ve kalitesini etkileyebileceği de tartışma konusu olmaktadır. Bilimsel ve tıbbi literatürde; hiperkolesterolemi hastalığına sahip erkeklerde statin tedavisinin, steroid düzeylerinde ve sperm sayıları üzerindeki etkileri, popülasyona, doza ve komorbiditeye bağlı olarak fazlasıyla değişkendir. Ek olarak, son 30 yılda, statinlerle ilgili çalışmalar erkek doğurganlığı açısından meni kalitesinden ziyade steroidogeneze etkilerine odaklanmıştır. Atorvastatinin erkek üreme sistemine etkisiyle ilgili çalışmalar da oldukça sınırlıdır (Padron vd., 1989; Ramirez-Torres vd., 2000; Niederberger, 2005; Cowling, 2013; Pons-Rejraji vd., 2014).

2.2 Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi iç yapı olarak testis, epididim, vas deferens, seminal vezikül, bulboüretal bezler ve prostattan, dış yapı olarak ise skrotum ve penisten oluşmaktadır. Bu yapılar; erkek gelişimi için önemli androjenler üretmek, döllenme için spermin oluşumunu, depolanmasını ve boşalmasını desteklemek üzere birçok bez ve kanalla vaskülarize edilmiştir (Mawhinnet ve Mariotti, 2013; Tiwana ve Leslie, 2017).

Erkek üreme sisteminin işlevi, erkek üreme fonksiyonunu sürdüren testosteron gibi androjenler üretmek ve spermatogenezi teşvik ederek döllenme için dışı üreme sistemine taşınmasını sağlamaktır. Testisler androjen üretiminden ve sperm üretimi ve taşınmasından sorumlu olduklarından dolayı hem endokrin hem de ekzokrin organ olarak görev yapmaktadır (Gurung vd., 2022).

2.2.1 Testis

Testis, interstisyel dokulardan ve seminifer tübüllerden oluşmaktadır. Seminifer tübüller; peritübüler miyoid hücreler, sertoli hücreleri ve germ hücreleri olmak üzere üç hücre çeşidinden meydana gelmektedir. İnterstisyel dokular ise Leydig hücreleri, kan ve lenf damarlarından oluşmaktadır ve komşu seminifer tübüller arasında bulunmaktadır (Hai vd., 2014).

Testis bir bölmeyle ikiye bölünmüştür. Her bölme bir erbezi içerir. Bir erbezi yaklaşık on loba ayrılmış olup, her bir lob seminifer tüpçükler içermektedir. Seminifer tüpçüğün içerisinde az gelişmiş germ hücreleri bulunmaktadır. Bu germ hücreleri spermatogonyum olarak isimlendirilmektedir. Ergenlik çağına erişildiğinde spermatogonyum çoğalmaya ve farklılaşmaya başlamaktadır. Yaklaşık 74 gün süren bu olgunlaşma sürecinde oluşan hücrelere spermatozoa denilmektedir. Spermiler en son Sertoli hücresi denen büyük hücrelerin içinde farklılaşmaktadır. Sertoli hücreleri seminifer tübüllerin bazal membranında bulunmaktadır (Elftman, 1963).

Morfolojik olarak Sertoli hücreleri poligonaldır. Farklı uzunluklarda değişik filamentli çıkıntılara ve düzensiz şekli olan çekirdeklere sahiptir. Sertoli hücreleri elektronik mikroskop altında incelendiğinde, gelişmiş bir nükleolusa sahiptir. Ayrıca çok sayıda lipid damlacıklarına, mitokondriye, pürüzsüz endoplazmik retikuluma ve hücreler arasında bağlantı komplekslerine sahiptir (Elftman, 1963; Chui vd., 2011).

Sertoli hücreleri aktivin ve inhibin üretmektedir. İnhibin hormonu folikül stimülan hormonunun (FSH) hipofizdeki üretimini baskılamaktadır. Leydig hücreleri seminifer

tüpçüklerin dış aralıklarında bulunmaktadır. Testosteron hormonunu Leydig hücreleri üretmektedir. Testosteron ve testosterondan üretilen üreme hormonlarına androjenler denilmektedir. Androjenlerin kanda derişimi fazla olduğu takdirde, hipofizden luteinize edici hormon (LH), hipotalamustan gonadotropin salgılayan hormon (GnRH) üretimini baskılayabilmektedir. Spermilerin gelişimini tamamladığı yer epididimdir. Olgun spermier burada depolanmaktadır. Spermilerin dışarı atılması gerektiğı zaman burada bulunan düz kaslar kasılmaktadır ve spermier vaz deferense doğru itmektedir. Vaz deferens epididimin altından devam eden bir kanaldır. Spermier burada da depo edilebilmektedir. Boşalma esnasında etkili kasılmalar yaparak spermier penise doğru hareket ettirmektedir. Vaz deferens ile seminal vesikül kanalları ejakülatör kanalı oluşturmaktadır. Bu kanallar gelen salgıları üretraya doğru fırlatmaktadır. Ejakülatör kanalı ve üretra prostatın içerisinde geçmektedir. Semene süt rengini prostat salgıları vermektedir. Penis, semenin ve idrarın vücut dışına aktarılmasını sağlamaktadır (Gurung vd., 2022).

2.2.2 Sertoli ve Leydig hücreleri

Erkek üreme sisteminin fonksiyonel hücreleri, testislerde bulunan Leydig ve Sertoli hücrelerinden oluşmaktadır. Leydig hücreleri testislerin interstisyumunda, seminifer tübüllerin bitişinde bulunmaktadır. Pembe renkli bir sitoplazması bulunur ve pembe renkli Reinke kristalleriyle tanınabilmektedir (Al-Agha ve Axiotis, 2007). Leydig hücrelerinde üretilen testosteron, başlıca erkek androjenidir. Testosteron farklı dokuların hücre içi reseptörlerine bağlanarak ve protein ekspresyonunu düzenleyerek etkisini gösteren bir steroid hormondur. Sertoli hücreleri ise seminifer tübüllerin çevresinde bulunmaktadır. Tübüllerin çevresinde başlayan spermatogenezi teşvik etmektedir. Sertoli hücrelerinin beslenmesinin korunmasına ve intertübüler mikro damar sistemindeki kan akışının düzenlenmesinde Leydig hücreleri destek sağlamaktadır (Middendorff vd., 2002). Sertoli hücreleri, yakınlarda bulunan germ hücrelerinden çok daha büyüktür ve daha az belirgin çekirdeklere sahiptir. Germ hücreleri (spermatogonyum) seminifer tübüllerin iç kısmında sıralanır ve olgunlaştıkça lümene doğru ilerler. Bu hücreler belirgin, koyu ve yoğun çekirdeklere sahiptir (Al-Agha ve Axiotis, 2007; Dimitriadis vd., 2015).

Leydig hücreleri testisin interstisyumundaki konumlarına göre tanımlanabilmektedir. Yuvarlak bir çekirdek, belirgin nükleolus ve Reinke kristallerinin varlığı ile ayırt edilebilmektedirler (Kaler ve Neaves, 1978).

Leydig hücreleri üç aşamada gelişmektedir. İlk aşamada Leydig hücre öncülleri çoğalmaktadır. Bu hücre öncüllerine kök Leydig hücreleri de denilebilmektedir. Daha sonra bunların olgunlaşmamış Leydig hücrelerine farklılaşması aşaması gelir. Son aşamada ise yetişkin Leydig hücrelerine farklılaşmaktadır (Chamindrani Mendis-Handagama ve Siril Ariyaratne, 2001).

Leydig hücreleri, seminifer tübüller arasındaki interstisyel boşlukta bulunmaktadır. Bu hücreler androjenlerin birincil kaynağıdır (Shima vd., 2013). Androjenler, seminifer tübüllere ve kan damarlarına yayılmaktadır. Hipotalamik-hipofiz-gonadal düzenlenmeyle peritübüler miyoid hücreler ve sertoli hücrelerinde bulunan androjen reseptörlerine bağlanmaktadır. Böylece erkek germ hücrelerinin sinyal yollarını kontrol etmektedirler. Androjenler bu sayede spermatogeneze katılmaktadır (De Gendt vd., 2004; Welsh vd., 2009; O'shaughnessy vd., 2010; Willems vd., 2015).

2.2.3 Kan-testis bariyeri

Testiste fonksiyonel bir kan-testis bariyeri bulunmaktadır (Fawcett 1973). Kan-testis bariyeri, seminifer tübüllerin germinal epitelinin bazal membranının yakınında bulunmaktadır (Lie vd., 2011). Memeli canlıların dokularında en sıkı kan-doku bariyerlerinden biri olarak bilinmektedir. Endotel hücreleri arasında neredeyse tamamı sıkı bağlantıdan oluşan kan-beyin ve kan-retina gibi diğer kan-doku bariyerlerinden farklı olarak kan-testis bariyeri bir arada var olan özelleşmiş hücrelerden oluşmaktadır (Su vd., 2011). Suyun, elektrolitlerin, iyonların, hormonların, parakrin faktörlerin ve diğer eksojen biyomoleküllerin hücre içi ve hücre içi difüzyonunun sınırlandırılmasını sağlamaktadır. Bu sayede spermatogenez için benzersiz bir ortam sunmaktadır ve testislerin normal fizyolojik fonksiyonunu sağlamaktadır (Mao vd., 2020).

Kan-testis bariyeri, spermatogenez için gerekli besinlerin glandüler lümene taşındığı çeşitli biyolojik makromoleküllerin taşınmasını düzenleyebilmektedir. Ek olarak, kan-testis bariyerinde büyük ilaç taşıma ağları bulunmaktadır ve ilaçları aktif olarak uzaklaştırmak için dışarı akan ilaç taşıyıcıları kullanılmaktadır. Bu da bu maddelerin testislerdeki biyoyararlanımını sınırlamaktadır (Su vd., 2011). Sertoli hücreleri bu ilaç taşıyıcılarına ilave olarak, immünsüpresif biyomoleküller salgılamaktadır. Bu da kan-

testis bariyerine immün özellikler kazandırmaktadır. Bu sayede glandüler lümende bulunan germ hücrelerini dolaşım ve lenfatik sistemlerden izole etmektedir (Li vd., 2012).

2.2.4 Hipotalamus-hipofiz-testis aksı ve hormonları

Normal üreme fonksiyonunun sürdürülmesi; hipotalamus, hipofiz ve testis kademesindeki hormonların koordineli salınımına bağlıdır. GnRH, bazal bölgedeki nöroendokrin hücrelerden hipofiz portal kan sistemine pulsatil bir düzende salınmaktadır. GnRH, hipotalamusta bulunur ve ön hipofizdeki gonadotropları uyarak iki peptid hormonunu sentezleyip serbest bırakmaktadır. Bu hormonlar FSH ve LH hormonlarıdır ve Leydig ile Sertoli hücrelerinin membran reseptörlerinde etkilerini göstermektedir. Bu iki hormon da hücreleri uyarmak için adenilil siklazı aktif hale getiren ve hücre siklik adenozin monofosfat (cAMP) miktarını yükselten bir G protein reseptörünü aktif hale getirerek fizyolojik etkilerini göstermektedir. LH, testislerin interstiyumunda bulunan Leydig hücrelerini kolesterolden testosteron üretmesi için uyarmaktadır. Testosteron, LH ve FSH salgılanmasını düşürmek için hipotalamus ve ön hipofizde negatif geri beslenme yoluyla etki etmektedir. FSH, sperm üretimini artırmak ve inhibin salgılanması için Sertoli hücrelerini uyarmaktadır (Heindel ve Treinen, 1989; Goldstein ve Schlegel, 2013).

Büyüme faktörleri, testosteron ve nörotransmitterler; Leydig hücrelerinden Sertoli hücrelerine, komşu Leydig hücrelerine, lamina propria'ya salgılanmaktadır (Jegou, 1992; De Kretser ve Kerr, 1994; Sharpe, 1994;).

Hipofiz ve hipotalamus, GnRH'in pulsatil salgılanmasıyla ve LH'nin salıverilmesiyle spermatogenezin lokal olarak düzenlenmesini kontrol etmektedir. Hem LH hem de FSH tam bir spermatogenez için gereklidir. Hipofiz, Leydig hücrelerinin salgı aktivitesini düzenlemektedir. Hipofizden salgılanan LH, Leydig hücrelerini uyarmaktadır. Hipofize geri bildirim sağlayan testosteronu Leydig hücreleri üretmektedir. Testosteron da Sertoli hücreleri üzerinden spermatogenez desteklemektedir. Hipofizden salgılanan FSH, germ hücrelerinin olgunlaşması için gerekmektedir. Ayrıca Sertoli hücrelerini uyarak spermatogenez desteklemektedir. Sertoli hücreleri inhibin salgılar. İnhibin, hipofize geri bildirim mekanizmasında görev yapmaktadır. FSH salgılanması da inhibinin kontrolündedir (Bellve ve Zheng, 1989; Sharpe, 1990; Sharpe, 1992).

Endokrin ve parakrin mekanizmalar arasında gerçekleşen etkileşimlerle testiküler fonksiyon belirlenmektedir (Bellve ve Zheng, 1989; Sharpe, 1990; Sharpe, 1992).

2.2.5 Spermatogenez

Spermatogenez, germ hücrelerinin olgunlaşmasına ve çoğalmasına bağlı olan dinamik ve karmaşık bir süreçtir. Spermatogenez sürecinin tamamlanma zamanı türler arasında farklılık göstermektedir (de Kretser vd., 2000). Örneğin; spermatogenez süreci farelerde yaklaşık 35 gün, sıçanlarda yaklaşık 50 gün, insanlarda ise yaklaşık 70 gün sürmektedir (JP Jarow, 1990). Spermatogenez, birbirine bağımlı olan germ hücrelerinin mitoz ve mayoz yollarıyla spermatozoa ürettiği bir süreçtir. Spermatogenez ergenlik döneminde başlayıp yaşlılığa kadar devam etmektedir. Spermatogenez süreci sarmal seminifer tübüllerde gerçekleşmektedir (Song vd., 2011).

Spermatogenez üç aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşamada spermatogonyum bir diğer adıyla germ hücrelerinin, mitozu yani çoğalma ve farklılaşma süreci gerçekleşmektedir. Bu hücreler gelişerek mayoz bölünmeye hazır hale gelmektedir. Birincil spermatosit olarak da adlandırılan bu hücreler mayoz bölünme geçirerek n kromozomlu ikincil spermatositleri oluşturmaktadır. Oluşan bu hücrelerin de mayoz geçirmesinden sonra spermatidler oluşmaktadır (Sharma ve Agarwal, 2011).

2.2.5.1 Spermatogenezin düzenlenmesinde Leydig hücrelerinin rolü ve mekanizması

2.2.5.1.1 Androjenler

Leydig hücrelerinden salgılanan androjenler, erkeklerin cinsel davranışında ve farklılaşmasında kritik bir öneme sahiptir (Bagatell vd., 1994; Antonio-Cabrera ve Paredes, 2012). Spermatogenez sürecinin başlatılması, devam edilmesi ve düzenlenmesi için androjenlerin bulunması esastır (Jarow ve Zirkin, 2005).

Testiste bulunan androjen konsantrasyonu belirli bir düzeyin altına gerilediğinde, Sertoli hücrelerinde bulunan androjen reseptör seviyesi de büyük oranda azalmaktadır. Bundan dolayı da spermatogenezin tıkanmasına sebep olmaktadır (Manna vd., 2013; Zhong vd., 2013; Abarikwu vd., 2013).

2.2.5.1.2 Testosteron

Memelilerde spermatogenezin ilerlemesini düzenleyen ana androjenlerden biri testosterondur (Turner vd., 1984). Testosteron; erkek fetüste testisler, epididimis, vas deferens ve seminal veziküller haline gelen Wolffian kanalların gelişiminin

uyarılmasında önemli bir rol oynamaktadır. Testosteron ayrıca eritropoez, pubertal büyüme atağı, kemik yoğunluğu, epifiz plaklarının kapanması, sesin kalınlaşması, kas kütlelerinin artması, erkek fiziki gelişimi ve libidodan da sorumludur (Nassar ve Leslie, 2018).

Testosteronun spermatogonyal çoğalmada hiçbir etkisinin olmadığı gibi görünmektedir fakat mayotik ilerlemeyi daha kolay hale getirmektedir (Haywood vd., 2003). Testosteronun kaybı halinde; deoksiribonükleik asit (DNA) onarımı, ribonükleik asit (RNA)'ın işlenmesi, hücre sinyalleri, apoptoz ve mayozda görevleri olan proteinlerde farklılaşmalara sebep olmaktadır. Bu olay, germ hücrelerinin gelişmesi için testosteronun önemini yansıtmaktadır (Stanton vd., 2012).

Testosteron spermatogenezi üç yolla etkilemektedir. Birinci yol olgun sperm salınımını regüle etmektir. Sperm olgunlaştığında spermatositlerden ayrılarak seminifer tübüllerin lümenine doğru hareket etmektedir. Olgunlaşmış sperm, testosteron sinyal göndermediğinde, Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilmektedir (Holdcraft ve Braun, 2004; O'Donnell vd., 2009). Kan-testis bariyerinin korunması ikinci yoldur. Kan-testis bariyeri, Sertoli hücre zarının yüzeyinde sıkı bir şekilde konumlanmış proteinlerden oluşmaktadır. Üçüncü yol testosteronun, sertoli hücreleriyle yuvarlak spermatidler arasında bulunan konneksin ekspresyon seviyesini etkilemesi ve spermatositlerin spermden ayrılmasını regüle etmesidir. Yuvarlak spermatidler, erkek germ hücrelerinin gelişmesi ve farklılaşması için gerekli olan besin ve sitokinlere sahip olmak için Sertoli hücrelerine yapışmaktadır.

Testosteron düzeyi azaldığında, erkek germ hücreleriyle Sertoli hücrelerinin arasındaki konneksin miktarı azalmaktadır. Bu durum, yuvarlak spermatidlerin Sertoli hücrelerinden daha kısa sürede bağlarının kopmasına ve uzun spermatidlere farklılaşamamasına neden olmaktadır (Kopera vd., 2010; Pelletier, 2011).

2.3 Erkek Reprodüktif Sistem ve Kolesterol İlişkisi

Hücrelerde; hücre zarı kararlılığı, geçirgenliği ve hareketliliği için kolesterol ihtiyacı bulunmaktadır. Reprodüktif sistemde Leydig hücreleri tarafından üretilen testosteronun öncü maddesi de kolesteroldür. Spermatogenez sürecinin işleminde de kolesterolün rolü büyüktür (Payne ve Youngblood, 1995; Yokoyama, 2000). Aynı zamanda spermatogenez sürecindeki kolesterol oranı ile sperm hareketliliği ve miktarı arasında da bağlantı olduğu bildirilmiştir. Kolesterol ayrıca sperm hasarlarına karşı da koruyucu

görevdedir. Seminal sıvıda da kolesterol bulunmaktadır ve bunun prostat, seminal vezikül ve lenften kaynaklandığı gösterilmektedir (Scott vd., 1967).

Hiperlipidemi tedavisi için ilaç ve anabolik steroid kullanmayan bir erkek popülasyonunda yapılan araştırmada erkek semen yapısı incelenmiştir. Elde edilen verilere göre serum kolesterol seviyeleri normal olan erkeklerde; semen kalitesi ile seminal sıvıdaki kolesterol seviyesi arasında doğru orantı olduğu görülmüştür. Fakat serum kolesterol seviyesi ile seminal sıvıdaki kolesterol seviyesi arasında bir bağlantı görülmemiştir. Bu verilerin kesinliği için birtakım çalışmalara daha ihtiyaç olduğu vurgulanmaktadır (De Neergaard vd., 2018).

2.4 Erkek Reprodüktif Sistem Toksisitesi

Herhangi bir kimyasal ajanın üreme kabiliyetini etkilemesi reprodüktif toksisite olarak adlandırılmaktadır. Bu toksisitenin en yaygın görülen etkisi erkeklerde infertilitedir (Phillips ve Tanphaichitr, 2008).

Son yıllarda erkek reprodüktif sistem toksisite oranları giderek artmaktadır. Erkek reprodüktif sistemi etkileyen kimyasal ajanlar, sperm kalitesi ve sayısını etkilemektedir. Bu etkiler kullanılan kimyasalın ya da ilacın dozuna ve süresine göre değişiklik göstermektedir (Oakes vd., 2002; Joshi ve Sharma, 2011).

Erkek reprodüktif sistemin toksisitesi hakkında bilgi sahibi olmak amacıyla spermatogenez süreci incelenebilmektedir. Sperm konsantrasyonu ve sayısından toksisite değerlendirmesi genellikle en iyi seçenek olarak kabul edilmektedir. Fakat incelenen örnekler arasında oldukça farklılık bulunmasından dolayı reprodüktif sistem değerlendirmesi için yeterli olmayan bir seçenek olmaktadır. Herhangi bir ilaç veya kimyasal ajana maruziyet sonrası sperm sayılarındaki değişiklik incelenerek hesaplamalar yapılmaktadır. Sperm morfolojisi ve motilitesinin de değerlendirilmesi bir seçenektir (Working, 1988).

2.4.1 *In vitro* reprodüktif toksisite modelleri

Farmasötiklerin ve ilaçların, gelişimsel ve üreme güvenlik testleri günümüzde *in vivo* olarak sadece hayvan modelleri aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Bu testte kullanılan hayvanlar genellikle sıçan ve tavşanlardır (Collins, 2006).

İnsan Kullanımına Yönelik Farmasötiklere İlişkin Teknik Gereksinimlerin Uyumlaştırılmasına İlişkin Uluslararası Konsey (ICH) kılavuzunda ilaçların güvenlik değerlendirmesi açıklanmıştır. Belirli bir popülasyonda, ilaçların ICH S5 kılavuzuna

göre üreme sürecinin tüm evrelerinde testlere tabi tutulması gerekmektedir. Bu testin içeriği doğurganlık ve erken embriyonik gelişim, embriyo-fetal gelişim ve doğum öncesi ve sonrası gelişimdir. Bileşikler bu ilgili periyotlar süresince uygulanmaktadır. Sonucunda ise ebeveyn hayvan ve yavruların üstündeki etkilerin karakterizasyonu belirlenmektedir. Bu çalışmalar test başına 16-20 litre kemirgen ve tavşan gerektirmektedir. Bunların uygulanması ICH M3 (klinik dışı güvenlik çalışmaları), S6 (biyofarmasötikler) ve S9 (kanseri ilaçları) kılavuzlarına eklenmiştir (Niethammer vd., 2022).

Günümüzde, Avrupa Birliği Hayvan Testlerine Alternatifler Referans Laboratuvarı tarafından gerçekleştirilen Hayvan Deneylerinde Alternatif Yöntemler Veritabanı, gelişimsel toksikoloji testleri için üç doğrulanmış *in vitro* yöntem içermektedir. Bu yöntemler; sıçan uzuv tomurcuğu mikrokütlesi (MM) testini, sıçan implantasyon sonrası tam embriyo kültürü (WEC) testini ve fare embriyonik kök hücre testini (EST) içermektedir (Niethammer vd., 2022).

MM testinde; sıçan embriyolarından iskelet progenitör hücreleri izole edilerek, kondrositlere ayrıştırılmaktadır. Yalnızca iskelet gelişimindeki toksikolojik sonuçlar incelenebilmektedir. WEC testinde de sıçan embriyoları kullanılmaktadır. Erken organ sistemi gelişimi (kalp, kulak, göz gibi) gözlemlenerek embriyotoksikite incelenebilmektedir. Embriyonun tamamı için toksikolojik değerlendirmeler sağlam embriyolar ile daha geniş kapsamlı modellenmektedir (New, 1978; Flint ve Orton, 1984). EST, blastosist evresindeki embriyoların implantasyondan önceki iç hücre kütesinden türetilen fare embriyonik kök hücrelerini kullanmaktadır. Bu testte kardiyomiyositlere farklılaşmanın inhibisyonu ve fare embriyonik kök hücreleri ile fibroblastlar üzerindeki sitotoksik etkiler karşılaştırılmaktadır (Doetschman vd., 1985; Spielmann vd., 1997)

Doğrulanmış üç *in vitro* yöntemin hepsi, *in vivo* çalışmalara kıyasla daha az maliyetlidir ve daha kısa sürede gerçekleşmektedir. % 70-80 arasında bir tahmin gerçekliğine sahip olsalar da kanıtlanmış üç *in vitro* yöntemin düzenleyici gelişimsel toksikolojide kullanılması geniş çapta kabul görmemektedir. Çünkü tek başına alternatif olarak uygun değildir. İlaç endüstrisi, performans ve kullanım kolaylığı sebebiyle özellikle EST'yi ve ayrıca bileşik taramaları ve dahili kararlara yol göstermek amacıyla sıçan WEC testi ve zebra balığı tam embriyo kültürünü uygulamaktadır (Genschow vd., 2002; Whitlow vd., 2007; Paquette vd., 2008).

Her ne kadar bireysel *in vitro* testler, üreme sürecinde bulunan tüm aşamaları modelleyemese de, bir test stratejisine dahil edilebilmektedirler. Bunun için insan gelişimi ya da bütün üreme süreci, her biri ilgili bütün toksisite mekanizmalarını dahil eden spesifik analizlerle temsil edilen ve dolayısıyla bireysel analizlerden daha iyi bir değerlendirme sağlayan iyi tanımlanmış aşamalara ayrılabilir (Rajagopal vd., 2022).

Geçtiğimiz son on senede, embriyonik gelişimsel modelleme ve mekanik anlayıştaki gelişme, artık daha modern yöntemlerin test stratejisinin bir parçası olarak değerlendirilmesini meydana getirmektedir (Niethammer vd., 2022).

2.4.2 Sitotoksosite testleri

Sitotoksosite tahmin yöntemlerinde hayvan testlerinin yerine kullanılabilen çeşitli *in vitro* testler bulunmaktadır (Walum vd., 1994). Bir maddenin toksisite tespiti için seçilecek yöntemde; *in vitro* hücre kültür çeşitleri, ajanın fizikokimyasal yapısı, sitotoksosite mekanizması gibi etkenler rol oynamaktadır (Jain vd., 2018).

2.4.2.1 MTT testi

MTT testi, hücresel canlılığı tespit edebilmek için kullanılan kolorimetrik bir testtir. Canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan mitokondriyal dehidrojenazın etkisiyle mor renkli formazana indirgenmekte olan bir tetrazolyum tuzudur. Suda çözünmektedir. Sarı renklidir. Mor renge sahip formazan kristallerini çözebilmek için organik bir çözücü olan dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılmaktadır. Spektrofotometreyle tespit edilen formazan miktarı ile canlı hücre sayısı arasında doğru orantı bulunmaktadır (Mosmann, 1983; Morgan, 1998).

2.4.2.2 Nötr kırmızı boya alımı testi

Bir kültürdeki canlı hücre sayısı hakkında bilgi veren bir diğer test ise nötr kırmızı boya alım testidir. Nötr kırmızı boya hücre membran yapılarından geçebilen ve hücre içinde lizozomlara ulaşan bir boyadır. Hücre membran yapısının zarar görmesiyle boya alma oranı azalmaktadır. Ölçüm spektrofotometre ile yapılır ve ölü hücrelerin boya alımının azalmasıyla canlılık değerlendirilmesi yapılmaktadır (Repetto vd., 2008).

2.4.2.3 Propidyum iyodür alım testi

Bir hücre süspansiyonundaki cansız hücreleri tespit etmek için genellikle kullanılan bir testtir. Propidyum iyodür canlı hücre zarından geçememektedir. Cansız hücrelerin aldığı boya miktarının ölçümü ile değerlendirme yapılmaktadır (Jain vd., 2018).

2.4.2.4 Laktat dehidrogenaz testi

Canlı hücrelerin çoğunluğunda laktat dehidrogenaz (LDH) bulunmaktadır. Bu enzim hücrenin parçalanması sonucunda oluşmaktadır. Zarar gören hücrelerde artan LDH miktarının ölçümüne dayanan bir testtir (Wroblewski ve Ladue, 1956).

2.4.2.5 Tripan mavisi dışlama testi

Tripan mavisi canlı hücre zarından geçememektedir. Sadece hasar görmüş zardan geçebilmektedir. Hücre içinde proteinlerle bağlanarak mavi bir renk oluşturmaktadır. Değerlendirmede cansız hücreler, canlı hücrelerden daha büyük ve mavi renkli olmaları ile ayrılmaktadır (Strober, 1997).

Araştırılan bir maddenin mutasyon aşamalarının incelenmesi ve genotoksik potansiyelinin belirlenmesinde kullanılan *in vitro* test yöntemleri de bulunmaktadır. Bunlar; comet testi, mikronükleus testi, kromozomal sapma testi, kardeş kromatid değişim testi, hücre döngüsü ve DNA içerik analizi, apoptoz tespiti gibi testlerdir (Jain vd., 2018).

3 GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Atorvastatin kalsiyum	Bilim İlaç Sanayii ve Ticaret A.Ş.
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Carlo Erba
DMEM-F12Medium	WisentBioProducts
Fosfat tamponu çözeltisi (PBS) tableti	Bioshop
Penisilin-Streptomisin çözeltisi	WisentBioProducts
Fötal sığır serumu	CapricornScientific
Tripsin-EDTA çözeltisi	CapricornScientific
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's fosfat tamponlu serum fizyolojik (DPBS) (Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen)	Sigma-Aldrich
Tripan mavisi	Bio-Rad
MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür)	Serva
Nötral kırmızı (NK) çözeltisi (% 0,33)	Sigma-Aldrich
DCFDA/H ₂ DCFDA Cellular ROS Assay Kit	Abcam
Hidroklorik asit (% 36,5-38)	Sigma-Aldrich
Absolü etanol	Sigma-Aldrich
Glasiyel asetik asit	Sigma-Aldrich
Formaldehit çözeltisi (% 37)	Merck
Tris(hidroksimetil)aminometan	Serva
Kalsiyum klorür dihidrat	Merck
Normal erime noktalı agar	Sigma-Aldrich
Sodyum hidroksit (NaOH)	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Düşük erime noktalı agar	Sigma-Aldrich
Etilendiamintetraasetik asit disodyum tuzu (EDTA-Na ₂)	Sigma-Aldrich
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) (%30)	Merck
SYBR Green I boyası	Invitrogen

3.2 Kullanılan Araç ve Gereçler

İnkübatör (CO ₂ dönüşümlü)	ThermoFisherScientific
Otoklav	Hirayama
Soğutmalı santrifüj	Eppendorf
Otomatik pipetler	Eppendorf
Biyogüvenlik kabini	Heal Force
Mikroplaka okuyucusu	Biotek
Pipet uçları	Vertex
Lam	Menzel
Lamel	Thermo-Scientific
pH metre	MettlerToledo
Ters mikroskop	Leica
Hücre sayım cihazı	Bio-Rad
Hücre sayım slaytı	Bio-Rad
Hassas terazi	Ohaus
Elektroforez tankı	CleaverScientific
Elektroforez güç kaynağı	Thermo-Scientific
Floresan ışık mikroskobu	Leica
Steril rezervuar	Axygen
Kilitli kapaklı mini santrifüj tüpleri (2 ml)	Microcult
Şırınga ucu filtre (0,22 µM)	Aisimo Corporation
CometAssay IV görüntü analiz sistemi	Perceptive Instruments
Hücre kültür şişesi	Nest
96 kuyucuklu hücre plakası	Nest
Polipropilen tüp	Isolab
Steril polipropilen santrifüj tüpü	Nest
Steril serolojik pipet	LP

3.3 Kullanılan Hücre Hatları

TM3 (CRL-1714TM) fare Leydig hücreleri ve TM4 (CRL-1715TM) fare Sertoli hücreleri Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC) kuruluşundan temin edildi.

3.4 Yöntemler

Hücreler; %7,5 fetal sığır serumu, %5 horse serumu ve %1 penisilin- streptomisin çözeltisi içeren Dulbecco'nun Modifiye Eagle Ortamı (DMEM-F12) (1:1) besiyerinde inkübe edildi (37 °C, %5 CO₂).

3.4.1 Hücre hatlarının çoğaltılması

Sıvı nitrojen tankında -130°C'nin altında dondurulmuş olan TM3 Leydig ve TM4 Sertoli hücreleri tanktan çıkarıldı. Alınan hücreler su banyosunda oda sıcaklığına getirildi.

Oda sıcaklığına getirilen hücrelerin bulunduğu santrifüj tüpüne, 4-5 mL medyum eklendi. Hücreler, 5 dk ve 130 g hızında santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı uzaklaştırıldı.

Santrifüj tüpüne tekrardan medyum eklendi ve hücreler flaskların içerisine alındı. Flask içerisindeki hücreler, invert mikroskop altında incelendi ve çoğalmaları için 24 saat inkübasyona bırakıldı (%5 CO₂, 37°C).

24 saat inkübatörde kalan flasklar, invert mikroskop altında gözlemlendi. Flask yüzeyinde hücrelerin tutulduğu ve hücrelerin çoğaldığı gözlemlendi. Flasklardan, içinde bulunan medyum pipetörle uzaklaştırıldı ve 13-14 mL yeni medyum eklendi. Daha sonra flaskların içinde bulunan hücreler tekrardan inkübasyona bırakıldı (%5 CO₂, 37°C).

24 saat inkübasyondan sonra hücrelerin çoğalması tekrardan invert mikroskop altında gözlemlendi. Hücrelerin deney için yeterli sayıda olması için flask içindeki medyum pipetörle uzaklaştırıldı ve yeni medyum eklendi. Daha sonra tekrardan 24 saat inkübasyona bırakıldı (%5 CO₂, 37°C).

İnkübasyonda çıkarılan hücrelerin invert mikroskop altında incelenmesiyle, deney için yeterli sayıda olduğu gözlemlendi. Pipetörle, medyum flasktan uzaklaştırıldı.

3.4.2 Hücre canlılığının belirlenmesi

MTT testi, mitokondriyal dehidrojenaz enzimi performans ölçümüyle, canlı hücrelerin çoğalmasını ve metabolik aktivitesini ölçmek için kullanılan kolorimetrik sitotoksosite testidir. MTT testi, hücre canlılığının tespiti için kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir. 1983 yılında Mosmann tarafından geliştirilmiştir. MTT, sarı renkli ve suda çözünür bir maddedir (Jorge vd., 2004; Fotakis ve Timbrell, 2006; Li vd., 2015).

Canlı hücrelerdeki sitokrom b ve c bölgelerindeki mitokondriyal dehidrojenaz, tetrazol halkasını parçalamaktadır ve mor renkli formazan kristalleri üretmektedir. Oluşan formazan kristalleri, DMSO ve diğer organik çözücülerde çözünmektedir. Fakat suda çözünmemektedir. Oluşan formazan kristal yoğunluğuyla hücre canlılığı arasında pozitif bir korelasyon bulunmaktadır (Jorge vd., 2004; Fotakis ve Timbrell, 2006; Li vd., 2015).

Hücre kültürlerinin plakaya ekilmesi aşamasında; flask içerisinde bulunan hücreler, PBS (Fosfat Tamponlu Salin) ile ozmotik basıncı dengelemek için yıkandı. Daha sonra PBS uzaklaştırıldı.

Flask içerisindeki hücrelere 2 mL tripsin çözeltisi eklendi ve 1 dk inbükasyona bırakıldı (%5 CO₂, 37°C). İnkübatörden çıkarılan hücrelerin, invert mikroskop altında tripsin ilavesiyle yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı kontrol edildi.

Pipetör yardımıyla 2 mL tripsin içerisindeki hücre, santrifüj tüpüne alındı. 6 mL medyum santrifüj tüpüne ilave edildi. Karışım 5 dk santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı atık kabına atıldı. Altta kalan çökelek kısma medyum eklendi. Besiyeri eklenen hücre süspansiyonundan 10 µL alındı ve 10 µL tripan mavisi çözeltisiyle karıştırılıp hücre sayımı, otomatik hücre sayım cihazı yardımıyla yapıldı. % 93 oranında TM3 Leydig ve % 90 oranında TM4 Sertoli hücre canlılığı tespit edildi.

Her kuyucukta 1 x 10⁴ hücre/100µL olacak şekilde hesaplamalar yapıldı. 96 kuyucuklu plakalara hücreler ekildi. 24 saat inkübasyona bırakıldı (%5 CO₂, 37°C).

3.4.2.1 MTT sitotoksosite testinin uygulanması

İnkübasyondan sonra; Atorvastatin kalsiyumun 0,1-500 µg/mL 6 seri konsantrasyonu, büyüme kontrol ve çözücü kontrol (% 0.1 ve % 1 DMSO içeren besiyeri) ile birlikte plakalara eklendi ve hücrelerle karıştırıldı. 24 saat inkübasyona bırakıldı (%5 CO₂, 37°C).

5 mg/mL konsantrasyonda MTT çözeltisi PBS ile hazırlandı. Bu çözelti 1:10 oranında medyum ile seyreltildi. Hücre plakalarına 100 µL/kuyucuk olacak şekilde çözelti karışımından eklendi. 3 saat inkübasyona bırakıldı (%5 CO₂, 37°C).

3 saatlik inkübasyondan sonra plakalar ters çevrilerek üst kısmı uzaklaştırıldı.

Hücre plakasına DMSO (100µL/kuyucuk) çözeltisi eklendi ve mikropilaya okuyucuda 540 nanometrede absorbans değerleri okundu.

Atorvastatin kalsiyumun her bir konsantrasyonu için % inhibisyon değerleri hesaplandı. Non-linear regresyon analizi ile maddelerin inhibitör konsantrasyon 50 (İK50) değerleri hesaplandı.

$$\text{İnhibisyon \%} = 100 - [(OD_{\text{test bileşiği}} - OD_{\text{boş çözelti}} / OD_{\text{çözücü kontrol}} - OD_{\text{boş çözelti}}) \times 100]$$
 (Acar Çevik vd., 2018).

3.4.3 İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler IBM SPSS 27.0 istatistik yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. İstatistiksel analiz sonucuna göre; Shapiro-Wilk testi ile verilerin normal dağılım sağladığı gözlenmiştir. Deney grupları arasındaki farklılıkların anlamlılığını belirlemek için Levene testi ile varyans homojenliğine bakılmıştır. Levene testi sonuçlarına göre, varyans homojenliği sağlanamadığından dolayı parametrik bir post hoc testi olan Welch testi kullanılmıştır. Welch testinin sonucuna göre gruplar arası anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. İkili karşılaştırmalar için Games-Howell testi uygulanmıştır. Games Howell testi sonuçlarına göre tüm grupların ikili olarak birbirinden ve kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli ölçüde anlamlı farklılık olduğu saptanmıştır ($p < 0.01$).

3.5 Moleküler Doking Çalışmaları

Atorvastatin ile gerçekleştirilen doking çalışmalarında tümör nekroz faktörü α (TNF- α) (PDB ID:2AZ5) ve IL-1 β (PDB ID:8C3U) (Blank vd., 2023) ve Kaspaz-3 (PDB ID:4QTX) (Cade vd., 2014) kristalleri kullanılmıştır. Yapı temelli *in siliko* doking çalışmaları için ilgili kristaller protein data bank ([http-1](http://1)) aracılığı ile elde edilmiştir. PDB ID:2AZ5 ve PDB ID:8C3U kristalleri için pozitif kontrol olarak protein data bankasında kullanılan ligandlar seçilmiştir. Bunlar sırası ile 6,7-Dimetil-3-[(metil{2-[metil({1-[3-(triflorometil)fenil]-1*H*-indol-3-il}metil)amino]etil}amino)metil]-4*H*-kromen-4-on ve (S)-4'-hidroksi-3'-(6-metil-2-okso-3-(1*H*-pirazol-4-il)indolin-3-il)-[1,1'-bifenil]-2,4-dikarboksilik asit olarak belirlenmiştir. PDB ID:4QTX kristali için ise staurosporin molekülü pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Pasovic vd., 2013). İlk olarak kristal yapılara Schrödinger Suite 2020 Update 2'de (Schrödinger Release 2020-3) Maestro ara yüzü ile (Schrödinger Suite 2020) yer alan “Protein Preparation Wizard” protokolü uygulanmış ve kristal yapı docking çalışmalarına hazır hale getirilmiştir.

Daha sonra bağ uzunlukları OPLS3e kuvvet alanı kullanılarak düzenlenmiş ve yüklü amino asitlerin üzerindeki atomların belirtilen ortam koşullarındaki olası yükleri otomatik olarak belirlenmiştir. LigPrep 3.8 (L. Schrödinger, LigPrep, Version 3.8) modülü ile moleküler docking çalışmaları yürütülecek bileşikler docking için hazırlanmıştır. Grid oluşturulurken Glide 7.1 (L. Schrödinger, Glide, Version 7.1) kullanılmış ve yine aynı modülün yardımı ile single precision (SP) ile docking çalışmaları tamamlanmıştır.

Şekil 4.2’te gösterildiği gibi, hücre canlılığı atorvastatin tarafından doz-bağımlı bir yanıtla etkilenmiştir ve atorvastatinin İK50 değeri TM4 Sertoli hücrelerinde 1,08 µM olarak hesaplanmıştır. Atorvastatin uygulanan hücrelerde, sırasıyla 0.1, 1, 20, 125, 250, 500 µM konsantrasyonlar için hücre canlılığı % 69,82, % 48,1, % 25,64, % 18,25, % 9,53, % 9,75 olarak ölçülmüştür.

İstatistiksel analiz sonucunda gruplar arasında önemli ölçüde anlamlı derecede fark olduğu bulunmuştur ($p < 0,01$).

4.2 Moleküler Doking Çalışmaları

Atorvastatin ile gerçekleştirilen doking çalışmalarında hedef olarak TNF- α (PDB ID:2AZ5) (He vd., 2005), IL-1 β (PDB ID:8C3U) (Blank vd., 2023) ve Kaspaz-3 (PDB ID:4QTX) (Cade vd., 2014) seçilmiştir. Her üç kristal ile gerçekleştirilen doking çalışmalarında elde edilen skorlar Tablo-4.1.’de sunulmuştur. Tabloda kontrol-1 bileşiği PDB ID:2AZ5 için ligand olan 6,7-Dimetil-3-[(metil{2-[metil({1-[3-(triflorometil)fenil]-1H-indol-3-il}metil)amino]etil}amino)metil]-4H-kromen-4-on molekülüdür. Kontrol-2 bileşiği PDB ID:8C3U için ligand olan (S)-4'-hidroksi-3'-(6-metil-2-okso-3-(1H-pirazol-4-il)indolin-3-il)-[1,1'-bifenil]-2,4-dikarboksilik asit molekülüdür. Kontrol-3 bileşiği ise PDB ID:4QTX için ligand olan staurosporin molekülüdür. Elde edilen veriler atorvastatin molekülünün PDB ID:2AZ5 kristali (TNF- α) için doking skorunun -4.974 olduğunu göstermektedir. Bu kontrol bileşiğin doking skoru (-3.813) ile kıyaslanıldığında daha kontrol bileşiğine göre daha az afinite gösterdiği yorumu yapılabilir. Atorvastatin molekülünün PDB ID:8C3U kristali (IL-1 β) için doking skorunun -5.170 olduğu görülmektedir. Bu kontrol bileşiğin doking skoru (-9.894) ile kıyaslanıldığında daha güçlü bir ilgisi olduğunu göstermektedir. Son olarak atorvastatin molekülünün PDB ID:4QTX kristali (kaspaz-3) için doking skorunun -7.051 olduğu görülmektedir. Bu kontrol bileşiğin doking skoru (-4.042) ile kıyaslanıldığında daha uzak bir değerdir. Atorvastatin molekülü kaspaz-3 enzimine afinitesinin kontrol bileşiğinden daha az olduğu düşünülebilir.

Çizelge 4.1 Atorvastatin molekülünün *TNF- α* (PDB ID:2AZ5), *IL-1 β* (PDB ID:8C3U) ve kaspaz-3 (PDB ID:4QTX) kristalleri için doking skorları

Bileşik	PDB ID:2AZ5			PDB ID:8C3U			PDB ID:4QTX		
	Doking skoru	Glide scoru	Glide e-model	Doking skoru	Glide scoru	Glide e-model	Doking skoru	Glide scoru	Glide e-model
Atorvastatin	-4.974	-4.974	-46.182	-5.170	-5.170	-63.420	-7.051	-7.051	-81.125
Kontrol-1	-3.813	-4.659	-41.440	-	-	-	-	-	-
Kontrol-2	-	-	-	-9.894	-9.894	-134.925	-	-	-
Kontrol-3	-	-	-	-	-	-	-4.042	-4.163	-48.122

Atorvastatin molekülünün TNF- α (PDB ID:2AZ5), IL-1 β (PDB ID:8C3U) ve kaspaz-3 (PDB ID:4QTX) kristalleri ile yapılan doking çalışmaları sonucunda elde edilen etkileşimler Çizelge 4.2’de sunulmuştur. Doking çalışmaları sonucunda elde edilen pozların iki boyutlu ve üç boyutlu görselleri Şekil 4.3-4.8 arasında sunulmuştur.

Çizelge 4.2 Atorvastatin molekülünün TNF- α (PDB ID:2AZ5), IL-1 β (PDB ID:8C3U) ve kaspaz-3 (PDB ID:4QTX) kristalleri için aminoasit etkileşimleri ve tipleri

Kristal	Atorvastatin molekülünün aminoasit etkileşim çeşitleri
PDB ID:2AZ5	Tyr59 ile pi-pi etkileşimi; Gln149 ile hidrojen bağı
PDB ID:8C3U	Asn102 ile ikili hidrojen bağı; Lys55 ile tuz köprüsü; Lys94 ile katyon-pi etkileşimi; Glu50 ile aromatik hidrojen bağı; Lys92 ile aromatik hidrojen bağı; Ser45 ile aromatik hidrojen bağı
PDB ID:4QTX	Phe256 ile iki adet pi-pi etkileşimi; Ser251 ile hidrojen bağı; Trp206 ile pi-pi etkileşimi; Ser205 ile hidrojen bağı; Arg207 ile hidrojen bağı; Arg64 ile hidrojen bağı; Arg64 ile tuz köprüsü; Gln161 ile hidrojen bağı

5 TARTIŞMA

5.1 Atorvastatinin Erkek Reprodüktif Sistem Toksisitesinin Değerlendirilmesi

Kolesterolü düşürebilmek için kullanılan ilk tercih ilaç statinlerdir. Statinler, yıllardır hiperkolesterolemi tedavisinde en çok tercih edilen ilaç grubu olmuşlardır ve kardiyovasküler hastalıkların birincil ve ikincil önlenmesinde en fazla kullanılan ilaçlardır (FERENCE vd., 2017). Atorvastatin en çok tercih edilen statin grubu ilaçlardan biridir ve HMG CoA redüktaz enzimini inhibe ederek etkisini göstermektedir. 10 mg, 20 mg, 40 mg ve 80 mg dozlarında dislipidemi tedavisinde reçete edilmektedir (SVVS vd., 2013). Düşük dozlarda kolesterol düşürücü etkisine ilave olarak, terapotik yararlı pleiotropik etkileri de bulunmaktadır (Zhou ve Liao, 2010). Örneğin; antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleri düşük dozlarda ortaya çıkmaktadır. Atorvastatin için antiinflamatuvar, antioksidan, kardiyoproteksiyon, nefroproteksiyon, immünosupresif, antitümoral gibi biyolojik ve farmakolojik özellikler rapor edilmiştir (Crevar-Sakač vd., 2016).

Atorvastatin yüksek dozda alındığında; sperm sayısında, sperm canlılığında, sperm hareketliliğinde ve seminal sıvı içeriğinde olumsuz etkiler ve nefrotoksisite, testis ağrısı, erektil disfonksiyon gibi durumlar ortaya çıkmaktadır. Ayrıca miyalji, kas atrofisi ve rabdomiyoliz gibi advers etkiler gözlenmektedir. Atorvastatinin insan üreme sistemi üzerindeki etkileri tartışma konusudur. Hiperkolesterolemik hastaların bu ilacı kullanması durumunda dolaşımdaki testosteron konsantrasyonu ve sperm kalitesi azalabilmektedir (Solomon ve Freeman, 2008; Pons-Rejraji vd., 2010; Naeimi vd., 2017; Omolaoye vd., 2022). Atorvastatinin; oksidatif strese karşı koruma sağlayan enzim olan koenzim q10 üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu durum, atorvastatinin erkek üreme fonksiyonlarına etkisi bakımından endişe meydana getirmektedir (Littlefield vd., 2014; Omolaoye vd., 2022).

Sertoli hücrelerinin, sıçanların testisinde spermatogenezin hormonal düzenlenmesinde kritik bir önem taşıdığı düşünülmektedir. İnsan dokusundan saf hücre popülasyonlarının izolasyonundaki zorluk sebebiyle, insanlardaki Sertoli hücrelerinin fonksiyonları hakkında çok az şey bilinmektedir (Lipshultz vd., 1982). Günümüzde, insan gonadotropinlerinin Sertoli veya Leydig hücreleri üzerindeki fonksiyonel etkilerini değerlendirmek için tasarlanmış *in vitro* birleştirilmiş prepubertal testis benzeri biyomimetik organ kültürü sistemi bulunmamaktadır. Böyle bir modele erişmenin,

erkek infertilitesinin tedavisi için yeni yaklaşımların geliştirilmesine yardımcı olacağı belirtilmiştir. Sertoli hücreleri esas olarak FSH ve testosteronun düzenlenmesi altında spermatogenezi desteklemektedir. Reseptörleri yalnızca Sertoli hücrelerinin üzerinde bulunan FSH, Sertoli hücre fonksiyonunun ana hormonal düzenleyicisidir ve aynı zamanda Leydig hücreleri tarafından androjen üretimini modüle ederek spermatogeneze doğrudan ve dolaylı olarak katkıda bulunmaktadır (Arato vd., 2018).

Sertoli hücrelerinin testis fonksiyonundaki etkin rolleri vurgulanmaktadır. Germ hücresi farklılaşması için *in vitro* kültür sistemlerinin çoğunluğunda Sertoli hücreleri gereklidir. Ayrıca Sertoli hücrelerinin sayısı testislerin desteklediği germ hücrelerinin popülasyonu ile doğrudan ilişkilidir. Bu karmaşık hücreler ve moleküler etkileşimlerin araştırılması, spermatogenik fonksiyon bozukluğunun sebeplerini daha iyi anlamak ve erkek kısırlılığının klinik yorumlanması ve tedavisi için yeni bir yaklaşımı temsil etmek açısından çok önem taşımaktadır (Griswold, 1998).

Çalışmamızda; Leydig ve Sertoli hücrelerine karşı atorvastatinin sitotoksik etkisi gözlenmiştir (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Bu sitotoksik etki Sertoli hücrelerinde, Leydig hücrelerine göre daha fazla görülmüştür (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).

Yapılan önceki bir çalışmada; günde 10 mg atorvastatinin 17 genç ve sağlıklı erkeğe etkisi beş aylık süre boyunca değerlendirilmiştir. Toplam sperm sayısında düşüş ve morfolojik olarak anormal spermatozoada artma bildirilmiştir. Atorvastatin tedavisinden sonraki 3 aya kadar spermin kapasitasyonunu da olumsuz anlamda etkilemiştir (Pons-Rejraji vd., 2014). Mevcut literatürdeki çalışmalar; atorvastatin kullanımdan sonra gözlemlenen olumsuz etkiyi, esas olarak bozulmuş hormonal dengeye ve daha sonrasında spermatogenezin bozulmasına, testis ve spermatogenetik yapıların değişmesine bağlamaktadır (Klinefelter vd., 2014). Leydig hücreleri testosteron hormonunu salgılamaktadır. Steroidogenez esnasında Leydig hücreleri LDL reseptörleri yoluyla ya da de novo sentez yoluyla kolesterolü kandan emmektedir. Bununla beraber atorvastatin uygulanması üzerine dolaşımdaki LDL kolesterol azalmaktadır. Bu da Leydig hücrelerinde daha az sayıda kolesterol bulunmasına yol açmaktadır. Yapılan çalışmalar atorvastatin uygulanmasından sonra LDL reseptörlerinde bir azalma olduğunu göstermiştir (De Graaf vd., 2004). LDL reseptörlerinin kolesterolün Leydig hücrelerine taşınmasına yardım edememesi, bu hücrelerdeki kolesterolün biyoyararlılığını bozmaktadır. Dolayısıyla Leydig hücreleri sadece kolesterolün yeniden sentezine bağımlı hale gelmiştir. Bundan dolayı, testosteron sentezi için kolesterol

biyoyararlanımının olmaması sonradan testosteronda azalma meydana getirebilmektedir. Bu durum da libido azalmasına ya da bazı durumlarda erektil disfonksiyona yol açabilmektedir (Rastrelli vd., 2018; Omolaoye vd., 2023).

Sıçanlar üzerinde yapılan önceki bir çalışmada; atorvastatin 20 mg/kg/gün kullanılmış ve on iki haftanın sonunda spermatogenetik aktivite açısından sonuçlar değerlendirilmiştir. Sonuç olarak; Sertoli hücrelerinde spermatogonia, spermatosit, seminifer tübül çapında azalma görülmüştür. Ayrıca testislerde hücresel sınırlarda kayıp yaşanmıştır. Genel olarak spermatogenez sürecine zarar verildiği görülmüştür (Akdeniz vd., 2020).

Yapılan bir başka çalışma; atorvastatin tedavisi esnasında ve tedavinin bırakılmasından 3 ay sonrasında toplam sperm sayısı, canlılığı ve hareketliliği gibi parametrelerde önemli derecede değişiklik olduğunu göstermiştir. Ayrıca; atorvastatin tedavisi esnasında deneklerin %35'inde ve tedavi kesildikten sonra hastaların %65'inde en az bir değişen semen parametresinde değişiklik olduğu görülmüştür. Bu durum, atorvastatinini erkek reproduktif sistem bakımından güvensiz olduğunu düşündürmüştür (Pons-Rejraji vd., 2014).

Hem hayvan hem de insan çalışmalarından elde edilen bulgular; dolaşımdaki testosteron azalmasının, proinflamatuvar sitokinlerin üretiminde bir artışa sebep olduğunu ileri sürmektedir (Mohamad vd., 2018). Atorvastatinin testis ağrısına neden olabileceği bildirilmiştir ancak mekanizması bilinmemektedir (Linnebur ve Hiatt, 2007). Atorvastatinin, testis ağrısına sebep olma olasılığını doğru bir şekilde saptamak için geçirgenliği ya da testis mikro ortamına taşınması araştırılmalıdır (Leite vd., 2018). Testosteron seviyesindeki azalma; erkek reproduktif sistemin işlevinin değişmesi, testis fonksiyonunun ve spermatogenezin bozulması gibi patolojilerle ilişkilidir (Klinefelter vd., 2014). Yapılan çalışmalar; dolaşımdaki testosteronun azalmasının, proinflamatuvar sitokinlerin üretiminin artmasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir. Yapılan hipogonadizmli bir hayvan modeli çalışmasında; azalan testosteron seviyeleri, IL-6, IL-1 β ve TNF- α gibi yüksek inflamatuvar sitokinlerle ilişkilendirilmiştir. Testosteron tedavisi sonrasında sadece IL-6 azaldığı görülmüştür (Kelly vd., 2013). Benzer şekilde, insan çalışmalarından elde edilen bulgular hipogonadizmde inflamatuvar sitokinlerin arttığını göstermiştir (Bobjer vd., 2013). Bu durum azalan LH'a bağlı olarak ortaya çıkan bozulmuş steroidojenezin, pro-inflamatuvar sitokinlerin toplanmasının başlatılmasına yardımcı olabileceği ve bunun da daha sonra uzun süreli patolojik durum üzerine

inflamasyonla sonuçlanacağı anlamına gelmektedir (Omolaoye vd., 2023). İnflamasyon ve ağrının çift yönlü bir ilişkiye sahip olduğu açıklanmıştır. Ancak atorvastatin kullanımının testis ağrısı da dahil olmak üzere herhangi bir ağrıya sebep olup olmayacağı konusunda tartışmalar sürmektedir (Camargo vd., 2022).

5.2 Moleküler Doking ve Toksikoloji İçin Önemi

Pestisitler, organik kimyasallar ve ağır metaller gibi çevrede bulunan toksik maddeler insan sistemine zararlı etkilere sebep olmaktadır. Deney hayvanları genellikle çevresel kimyasalların güvenlik profilini araştırmak için kullanılmaktadır. Fakat hayvanlar üstünde yapılan çalışmaların bazı sınırları bulunmaktadır. Bundan dolayı alternatif yaklaşımlara ihtiyaç doğmuştur. Doking çalışması, hayvanlara gerek kalmadan belirli bir reseptörün aktif kısmındaki moleküllerin bağlanma afinitesini tahmin eden alternatif yöntemlerdendir. Bu yöntem ek olarak çevresel toksik maddelerin biyolojik hedeflere yönelik etkileşimlerini kontrol etmek için de kullanılabilir. Moleküler docking için piyasada farklı kullanıcı dostu yazılımlar bulunmaktadır. Fakat az sayıda toksikolog bu yöntemleri toksikoloji alanında kullanmaktadır (Gupta vd., 2020).

5.2.1 Doking testinde kullanılan yollar

5.2.1.1 IL-1 β

Özel proteinlere bağlanan ve lökositler arasındaki hücreler arası bağlantıda rol alan proteinlere interlökin denir. Proinflamatuvar proteinlerin indüksiyonu, hematopoez, Th17 hücrelerinin farklılaşması, fare dalaklarında ve mezenterik lenf düğümlerinde IL-10 üreten Breg hücrelerinin gelişimi gibi birçok işlevi bulunmaktadır. IL-1 tip-1 reseptörü ve IL tip-2 reseptörü olmak üzere 2 çeşit reseptörü bulunmaktadır (Akdis vd., 2016).

IL-1 ilk olarak ateşe neden olan bir protein olarak tanımlanmış, insan lökosit pirojeni olarak isimlendirilmiştir. Bu protein IL-1 α ve IL-1 β olarak adlandırılan 2 ana proteinden meydana gelmektedir. Bu iki proteinin lokalizasyonlarında, olgunlaşmalarında ve salgılanmalarında temel farklılıklar bulunmaktadır. IL-1 α , biyolojik açıdan aktif form olan pro-IL-1 α 'ya dönüşmektedir. IL-1 β ; inflammasom ve kaspaz-1 aktivasyonu tarafından işlenene kadar hiçbir biyolojik aktivitesi olmayan pro-IL-1 β 'ye dönüşmektedir. Her iki interlökin de IL-1 tip 1 reseptörüne bağlanarak yakın etkiler göstermektedir. IL-1 sitokin grubu; IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β ve IL-36 γ olmak üzere 7 proinflamatuvar agonist ve IL-1Ra, IL-36Ra, IL-37 ve IL-38

olmak üzere antiinflamatuvar aktiviteler uygulayan 4 tanımlanmış veya varsayımsal antagonistle birlikte toplam 11 üyeden meydana gelmektedir (Akdis vd., 2016).

5.2.1.2 TNF- α

TNF- α ; konak savunmasında, inflamasyonda ve apoptozda görev alan kritik bir pleiotropik sitokindir. Güçlü bir inflamatuvar yanıtı başlatan pro-inflamatuvar bir medyatör olarak görev yapmaktadır. Aynı zamanda otoimmün hastalıkların ve tümörün meydana gelmesini engelleyen bir immünosüpresif medyatör olarak hareket etmektedir. İnflamatuvar aşamaların kapsamını ve zamanını kısıtlayarak bağışıklık homeostazının korunmasında kritik bir görev almaktadır. *Mycobacterium tuberculosis* ve *Listeria monocytogenes* gibi hücre içi bakteriyel enfeksiyonlara karşı viral, bakteriyel, fungal ve parazitik patojenlere karşı konak savunmasında kritik bir görev almaktadır. TNF- α konsantrasyonunun artması; ısı, şişlik, kızarıklık, ağrı ve fonksiyon kaybı gibi inflamasyonun 5 ana belirtisini ortaya çıkarmaktadır. TNF- α alerjik hastalıkların özellikle astım ve atopik dermatitin ortaya çıkmasında görev almaktadır (Akdis vd., 2016).

5.2.1.3 Kaspaz-3

Kaspaz-3, belirlenen hedef proteinlerin parçalanmasına bağlantı kurulmasını sağlama kabiliyetleriyle tanınan Sistein-ASpartik proteases (sistein proteazları) ailesinin bir üyesidir. Kaspazlar ilk olarak inaktif zimogenler olarak üretilmektedir. Zimogenler aynı zamanda prokaspazlar olarak isimlendirilmektedir. Üretim sonrasında birçok çeşitli belirli iç ve/veya dış sinyaller tarafından aktivasyona tabi tutulmaktadır. Prokaspaz-3'ün molekül yapısı; bir N-terminal prodomain ve p20 olarak adlandırılan bir büyük, diğeri p10 olarak adlandırılmakta olan bir küçük birim olmak üzere iki alt birim içermektedir. Bu iki alt birim, olgun proteazın katalitik bakımından aktif cebini oluşturmaktadır (Sakamaki ve Satou, 2009; Julien ve Wells, 2017; Eskandari ve Eaves, 2022).

Kaspaz-3 sistein-aspartik asit proteazıdır. Doku farklılaşması, rejenerasyonu ve sinir gelişimindeki önemli rollerinden dolayı son dönemlerde fazlaca ilgi görmektedir. Kanseri, kalp yetmezliği ve nörodejeneratif bozukluklar gibi bazı hastalıkların yönetilmesinde kaspaz-3'ün terapötik kullanımında çok sayıda gelişme gözlemlenmiştir (Asadi vd., 2022).

5.2.2 Erkek reproduktif sistem için IL-1 β , TNF- α ve Kaspaz-3'ün önemi

TNF- α , Leydig hücrelerinin steroidogenezinde gonadal fonksiyonlarında inhibitör olarak görev yapmaktadır. TNF- α 'nın testiküler steroidogenezi düzenlediği mekanizmaların anlaşılması, erkek üreme bozukluklarının tedavisi ve engellenmesi için yeni klinik müdahalelerin tasarlanmasında yardımcı olacaktır (Sadasiyam vd., 2015).

IL-1 β ; fizyolojik koşullar altında Leydig hücreleri, testis makrofajları, Sertoli hücreleri ve farklılaşma süreçlerindeki germ hücreleri gibi çeşitli testis hücrelerinde bulunmaktadır. IL-1 β 'nin germ hücrelerinin ve Leydig hücrelerinin çoğalmasını etkilediği gösterilmiştir (Huleihel ve Lunenfeld, 2002; Lysiak, 2004; Syriou vd., 2018).

Kaspazların sperm farklılaşması ve testis olgunluğundaki rolleri ilgi çekmektedir. Kaspaz-3'ün anormal sperm parametresi, tertis torsiyonu, varikozel ve germ hücreli tümörler gibi birden fazla androlojik patolojinin patogenezinde rol oynadığı bilinmesine rağmen, anormal apoptozisli insan testislerindeki rolleri hakkında şimdilerde fazla bilgi bulunmamaktadır (Said vd., 2004; Kim vd., 2007).

5.2.3 Atorvastatinin; TNF- α , IL-1 β ve Kaspaz-3 ile ilişkisi

Bu tez çalışmasının sonuçlarına göre, atorvastatin ile IL-1 β ilişkisinin kuvvetli görüldüğü ve olası mekanizma olarak bu molekülle etkileşiminin üzerinde durulabileceği belirlenmiştir. Atorvastatin ile yapılmış önceki çalışmalarla atorvastatinle sitokin cevabı arasında net bir ilişki ortaya konmamıştır (Jamel vd., 2013).

Yapılan çalışmalarda; atorvastatin, belirli yolaklar üstünden hem oksijenaz-1'i aktif hale getirerek lipopolisakkarit (LPS) kaynaklı TNF- α ekspresyonunu ve üretimini azaltabildiği gösterilmiştir. Bu durum atorvastatinin özellikle aterosklerotik hastalığı olanlarda sepsis gibi inflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğini düşündürmektedir (Wang vd., 2014). Atorvastatinin; sistemik lupus eritematozus (SLE) hastalarında TNF sistem moleküllerinin plazma seviyelerini azaltmadaki etkinliğini ölçme amacıyla yapılan çalışmada, atorvastatin TNF- α 'nın çözünür reseptörlerinin sayısını azalttığı gösterilmiştir. Bu da, TNF- α 'nın plazma seviyelerinin SLE aktivitesi ve aterosklerozda görev yapabileceğini ve yeni tedaviler için bir seçenek olarak değerlendirilebilmektedir (Ferreira vd., 2016). Fakat bazı durumlarda da atorvastatinin arteriyel hücre duvarı inflamasyonunu azaltmadığı ve ilgili sitokinleri etkilemediği sonucuna varılmıştır (Hoogeveen vd., 2021).

Venöz tromboembolizm (VTE) ve inflamasyon arasında ilişki olduğu bulunmuştur. VTE riskini düşürebilecek ilaç olan atorvastatinin, kardiyovasküler risk durumunda olan hastalarda antiinflamatuvar özellik gösterdiği keşfedilmiştir. Atorvastatinin antiinflamatuvar etkilerinin VTE hastalarında görülüp görülemeyeceği araştırılmıştır. Sonuç olarak; VTE hastalarında 3 günlük atorvastatin kullanılması durumunda, C-reaktif protein seviyelerinde azalmaya sebep olmadan inflamasyonu azaltmaktadır. Aort koarktasyon onarımına sahip olan olgularda 4 haftalık atorvastatin tedavisi uygulanmıştır. Tedavi sonucunda dolaşımdaki IL-1 β düzeyleri azalmıştır. Atorvastatin endotel fonksiyonunu ciddi derecede iyileştirmiş, sistemik inflamasyon durumunu baskılamıştır (Brili vd., 2012; Żółciński vd., 2013; Liberale vd., 2019).

Öte yandan, statinlerin antiinflamatuvar rolü yaygın olarak kabul edilmesine rağmen, yapılan çeşitli çalışmalar bu moleküllerin paradoksal açıdan bağışıklık hücrelerinde protein prenilasyonunun düşmesinin bir sonucu olarak en önemli proinflamatuvar sitokinler arasında bulunan IL-1 β üretimini çoğaltabileceğini göstermiştir. IL-1 β atorvastatin ile tedavi olan yağ dokusunda insülin direncini indüklemek için gerekmektedir (Henriksbo ve Schertzer, 2015; Henriksbo vd., 2019).

Statinlerin IL-1 β ile ilişkisi, inflammasom aktivasyonu üzerinden gerçekleşmektedir. Statinler, özellikle NLRP3 inflammasomunu aktive ederek, IL-1 β üretimini artırabilirler. Statinler, mevalonat yolunda prenilasyon adı verilen bir süreçte rol oynayan isoprenoidlerin sentezini inhibe eder. Bu süreç, IL-1 β üretimini artıran bir mekanizmadır. Ancak statinler tek başına inflammasomun tam aktivasyonu için yeterli değildir; bakteriyel LPS gibi dış uyarılarla inflammasomun olgunlaşması gerekir. Fluvastatin gibi bazı statinler uzun süreli kullanıldığında insülin direncine yol açabilir ve IL-1 β üretimini artırabilir. Bunun yanı sıra, lovastatin gibi statinler de reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini artırarak, LPS ile sinerji içinde IL-1 β salınımını artırabilir. Statin kaynaklı inflammasom aktivasyonu ve IL-1 β üretimi, diyabet gibi metabolik hastalıklara yol açabilmektedir (Liberale vd., 2019).

Kaspaz-3, iskemi reperfüzyon hasarının inflamasyonu ve apoptozunda görev alan kritik bir moleküldür. Atorvastatinin, iskemi reperfüzyon hasarını önlediği bilinmektedir. Fakat etki mekanizmasının nasıl olduğu hakkında bir bilgi bulunmamaktadır. Kaspaz-3 aktif protein parçalanmasını ya da S-nitrozilasyonunu etkilemeden, atorvastatin direkt olarak kaspaz-3 aktif enzimini *in vitro* doza bağımlı olarak inhibe etmiştir. Atorvastatinin bu yeni inhibitör mekanizması, iskemik böbreklerde reperfüzyon

toleransını iyileştirmektedir. Ayrıca transplant alıcılarına yarar sağlayabilmektedir (Haylor vd., 2011; Yang vd., 2015).

Öte yandan, olası toksisite söz konusu olduğunda ise atorvastatinin mitokondriyal membran potansiyelini belirgin şekilde azalttığını, Bcl-2 ailesi protein dengesini bozduğunu, sitozolde sitokrom c salınımını arttırdığını, Apaf1, kaspaz-9, -3, bölünmüş PARP proteini seviyelerini arttırdığını ve sonuçta apoptotik hücre ölümüne yol açtığı gösterilmektedir. Bu çalışma, atorvastatinin MAPK'lar, mitokondri ve ER bağımlı sinyal yolu aracılığıyla karaciğer dokusu toksisitesini indüklediğini, kalsiyum iyonları ve ROS'un apoptotik sinyalin önemli araçları olarak hareket ettiğini ortaya koymaktadır (Pal vd., 2015).

6 SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmada; atorvastatinin, MTT testinde TM3 Leydig ve TM4 Sertoli hücrelerine uygulanan farklı konsantrasyonlarında hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir. Leydig ve Sertoli hücreleri spermatogenez sürecinde önemli rol oynamaktadır. Bu hücrelerin inhibisyonu spermatogenez sürecini olumsuz etkilemektedir. Hiperlipidemi tedavisinde sıklıkla kullanılan atorvastatinin, erkek reproduktif parametreler bakımından toksik etkilere yol açabileceği TM3 Leydig ve TM4 Sertoli hücre canlılığı sayısındaki azalmadan anlaşılmıştır. Çünkü bu hücrelerin sayısındaki azalma, spermatogenez sürecini olumsuz olarak etkileyip erkeklerde sperm üretimini azaltacaktır. Atorvastatin kullanan hastalarda reproduktif fonksiyonların ve muhtemel fertilité seviyelerinin klinik açıdan tanımlanma ihtiyacı bulunmaktadır. Öte yandan olası mekanizma olarak atorvastatin ve IL-1 β etkileşimi bu çalışmayla ortaya konmuştur. Alternatif çalışmalarla da bu biyogösterge üzerine gereken önem verilmelidir. Çalışmalarla; hastalarda atorvastatin kullanmaya başlanmadan önce ve atorvastatin kullandığı dönem süresince sperm parametreleri incelenmelidir. Atorvastatinin sperm kalitesine yaptığı etkiler konusunda hastalar bilgilendirilmelidir. Ayrıca hastaların hormon düzeyleri de incelenmeli, LH ve FSH gibi spermatogenez sürecinde önemli rol oynayan hormonların bu tedaviden nasıl etkilenebileceği hastalara açıklanmalıdır. Bu bağlamda; sağlık sektöründeki personellerin atorvastatin tedavisi alan ve aynı zamanda üreme potansiyeli olan hastalara, atorvastatinin potansiyel advers etkilerini anlatması gerekmektedir. Sonuç olarak; atorvastatinin doza bağlı olarak erkek reproduktif sistem üzerine olumsuz etki gösterdiği yapılan çalışmada gösterilmiştir. Fakat hiperlipidemik ve aynı zamanda reproduktif dönemdeki hastaların atorvastatin tedavisinden göreceği etkilerin incelenebileceği, daha kapsamlı deneysel araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKÇA

- Abarikwu, S. O., Pant, A. B., & Farombi, E. O. (2013). Effects of quercetin on mRNA expression of steroidogenesis genes in primary cultures of Leydig cells treated with atrazine. *Toxicology in Vitro*, 27(2), 700-707.
- Acar Çevik, U., Sağlık, B. N., Ardiç, C. M., Özkay, Y., & Atlı, Ö. (2018). Synthesis and evaluation of new benzimidazole derivatives with hydrazone moiety as anticancer agents. *Turkish Journal of Biochemistry*, 43(2), 151-158.
- Akdeniz, E., Onger, M. E., Bolat, M. S., Firat, F., Gur, M., Cinar, O., ... & Erdemir, F. (2020). Effect of atorvastatin on spermatogenesis in rats: A stereological study. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 19(12), 2609-2614.
- Akdis, M., Aab, A., Altunbulakli, C., Azkur, K., Costa, R. A., Cramer, R., ... & Akdis, C. A. (2016). Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(4), 984-1010.
- Al-Agha, O. M., & Axiotis, C. A. (2007). An in-depth look at Leydig cell tumor of the testis. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 131(2), 311-317.
- Althanoon, Z., Faisal, I. M., Ahmad, A. A., Merkhani, M. M., & Merkhani, M. M. (2020). Pharmacological aspects of statins are relevant to their structural and physicochemical properties. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(7), 167-71.
- Amidon, G. L. (1995). Theoretical considerations in the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability: a basis for a biopharmaceutics drug classification. *Pharm. Res.*, 12, 413-420.
- Antonio-Cabrera, E., & Paredes, R. G. (2012). Effects of chronic estradiol or testosterone treatment upon sexual behavior in sexually sluggish male rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 101(3), 336-341.
- Arato, I., Luca, G., Mancuso, F., Bellucci, C., Lilli, C., Calvitti, M., ... & Calafiore, R. (2018). An in vitro prototype of a porcine biomimetic testis-like cell culture system: A novel tool for the study of reassembled Sertoli and Leydig cells. *Asian Journal of Andrology*, 20(2), 160-165.
- Asadi, M., Taghizadeh, S., Kaviani, E., Vakili, O., Taheri-Anganeh, M., Tahamtan, M., & Savardashtaki, A. (2022). Caspase-3: structure, function, and biotechnological aspects. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(4), 1633-1645.

- Bagatell, C. J., Heiman, J. R., Rivier, J. E., & Bremner, W. J. (1994). Effects of endogenous testosterone and estradiol on sexual behavior in normal young men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 78(3), 711-716.
- Bellve, A. R., & Zheng, W. (1989). Growth factors as autocrine and paracrine modulators of male gonadal functions. *Reproduction*, 85(2), 771-793.
- Blank, J., Blechschmidt, A., Boettcher, A., Bornancin, F., Brady, J., Eder, J., ... & Schleberger, C. (2023). Discovery of a selective and biologically active low-molecular weight antagonist of human IL-1b. *Nature communications*, 14, 5497-5509.
- Bobjer, J., Katrinaki, M., Tsatsanis, C., Lundberg Giwerzman, Y., & Giwerzman, A. (2013). Negative association between testosterone concentration and inflammatory markers in young men: a nested cross-sectional study. *PloS one*, 8(4), e61466.
- Boyd, R. A., Stern, R. H., Stewart, B. H., Wu, X., Reyner, E. L., Zegarac, E. A., ... & Whitfield, L. (2000). Atorvastatin coadministration may increase digoxin concentrations by inhibition of intestinal P-glycoprotein-mediated secretion. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 40(1), 91-98.
- Božina, N., Ganoci, L., Simičević, L., Gvozdanović, K., Klarica Domjanović, I., Fistrek Prlić, M., ... & Božina, T. (2021). Drug-drug-gene interactions as mediators of adverse drug reactions to diclofenac and statins: a case report and literature review. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 72(2), 128-128.
- Brault, M., Ray, J., Gomez, Y. H., Mantzoros, C. S., & Daskalopoulou, S. S. (2014). Statin treatment and new-onset diabetes: a review of proposed mechanisms. *Metabolism*, 63(6), 735-745.
- Brewis, I. A., Moore, H. D., Fraser, L. R., Holt, W. V., Baldi, E., Luconi, M., ... & Harrison, R. A. (2005). Molecular mechanisms during sperm capacitation. *Human Fertility*, 8(4), 253-261.
- Brili, S., Tousoulis, D., Antonopoulos, A. S., Antoniadis, C., Hatzis, G., Bakogiannis, C., ... & Stefanadis, C. (2012). Effects of atorvastatin on endothelial function and the expression of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in young subjects with successfully repaired coarctation of aorta. *Heart*, 98(4), 325-329.

- Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 232(4746), 34-47.
- Cade, C., Swartz, P., MacKenzie, S. H., & Clark, A. C. (2014). Modifying caspase-3 activity by altering allosteric networks. *Biochemistry*, 53(48), 7582-7595.
- Camargo, M., Ibrahim, E., Intasqui, P., Belardin, L. B., Antoniassi, M. P., Lynne, C. M., ... & Bertolla, R. P. (2022). Seminal inflammasome activity in the adult varicocele. *Human Fertility*, 25(3), 548-556.
- Chamindrani Mendis-Handagama, S. M. L., & Siril Ariyaratne, H. B. (2001). Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biology of reproduction*, 65(3), 660-671.
- Chogtu, B., Magazine, R., & Bairy, K. L. (2015). Statin use and risk of diabetes mellitus. *World journal of diabetes*, 6(2), 352.
- Christian, G. D., & Purdy, W. C. (1962). The residual current in orthophosphate medium. *Journal of Electroanalytical Chemistry (1959)*, 3(6), 363-367.
- Chui, K., Trivedi, A., Cheng, C. Y., Cherbavaz, D. B., Dazin, P. F., Huynh, A. L. T., ... & John, C. M. (2011). Characterization and functionality of proliferative human Sertoli cells. *Cell transplantation*, 20(5), 619-635.
- Cilla Jr, D. D., Whitfield, L. R., Gibson, D. M., Sedman, A. J., & Posvar, E. L. (1996). Multiple-dose pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of atorvastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, in healthy subjects. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 60(6), 687-695.
- Collins, T. F. (2006). History and evolution of reproductive and developmental toxicology guidelines. *Current pharmaceutical design*, 12(12), 1449-1465.
- Christians, U., Jacobsen, W., & Floren, L. C. (1998). Metabolism and drug interactions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in transplant patients: are the statins mechanistically similar?. *Pharmacology & therapeutics*, 80(1), 1-34.
- Corsini, A., Bellosta, S., Baetta, R., Fumagalli, R., Paoletti, R., & Bernini, F. (1999). New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacology & therapeutics*, 84(3), 413-428.
- Cowling, B. J. (2013). The effect of statins on testosterone in men and women, a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC medicine*, 11(1), 1-9.

- Crevar-Sakač, M., Vujić, Z., Kotur-Stevuljević, J., Ivanišević, J., Jelić-Ivanović, Z., Milenković, M., ... & Vujčić, Z. (2016). Effects of atorvastatin and artichoke leaf tincture on oxidative stress in hypercholesterolemic rats. *Vojnosanitetski preglad*, 73(2), 178-187.
- De Gendt, K., Swinnen, J. V., Saunders, P. T., Schoonjans, L., Dewerchin, M., Devos, A., ... & Verhoeven, G. (2004). A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(5), 1327-1332.
- De Graaf, L., Brouwers, A. H. P. M., & Diemont, W. L. (2004). Is decreased libido associated with the use of HMG-CoA-reductase inhibitors?. *British journal of clinical pharmacology*, 58(3), 326-328.
- De Kretser, D. M., & Kerr, J. B. (1994). The physiology of reproduction. *The cytology of the testis*, 2, 1177-290.
- de Kretser, D. M., Meehan, T., O'Bryan, M. K., Wreford, N. G., McLachlan, R. I., & Loveland, K. L. (2000, May). Regulatory mechanisms in mammalian spermatogenesis. In *Testis, Epididymis and Technologies in the Year 2000: 11th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis* (pp. 87-106). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- De Neergaard, R., Nielsen, J. E., Jørgensen, A., Toft, B. G., Goetze, J. P., & Jørgensen, N. (2018). Positive association between cholesterol in human seminal plasma and sperm counts: results from a cross-sectional cohort study and immunohistochemical investigations. *Andrology*, 6(6), 817-828.
- Dimitriadis, F., Tsiampali, C., Chaliasos, N., Tsounapi, P., Takenaka, A., & Sofikitis, N. (2015). The Sertoli cell as the orchestra conductor of spermatogenesis: spermatogenic cells dance to the tune of testosterone. *Hormones*, 14(4), 479-503.
- Doetschman, T. C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., & Kemler, R. (1985). The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *Development*, 87(1), 27-45.
- Elftman, H. (1963). Sertoli cells and testis structure. *American Journal of Anatomy*, 113(1), 25-33.

- Eskandari, E., & Eaves, C. J. (2022). Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. *Journal of Cell Biology*, 221(6), e202201159.
- Fawcett, D. W. (1973). Observations on the organization of the interstitial tissue of the testis and on the occluding cell junctions in the seminiferous epithelium. *Advances in the biosciences*, 10, 83-99.
- Ference, B. A., Ginsberg, H. N., Graham, I., Ray, K. K., Packard, C. J., Bruckert, E., ... & Catapano, A. L. (2017). Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *European heart journal*, 38(32), 2459-2472.
- Ferreira, G. A., Teixeira, A. L., Calderaro, D. C., & Sato, E. I. (2016). Atorvastatin reduced soluble receptors of TNF-alpha in systemic lupus erythematosus. *Clinical and Experimental Rheumatology*.
- Filppula, A. M., Hirvensalo, P., Parviainen, H., Ivaska, V. E., Lönnberg, K. I., Deng, F., ... & Niemi, M. (2021). Comparative hepatic and intestinal metabolism and pharmacodynamics of statins. *Drug Metabolism and Disposition*, 49(8), 658-667.
- Flint, O. P., & Orton, T. C. (1984). An in vitro assay for teratogens with cultures of rat embryo midbrain and limb bud cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 76(2), 383-395.
- Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology letters*, 160(2), 171-177.
- Fraser, L. R. (2010). The “switching on” of mammalian spermatozoa: molecular events involved in promotion and regulation of capacitation. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 77(3), 197-208.
- Genschow, E., Spielmann, H., Scholz, G., Seiler, A., Brown, N., Piersma, A., ... & Becker, K. (2002). The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. *Alternatives to laboratory animals*, 30(2), 151-176.
- Goldstein, M., & Schlegel, P. N. (Eds.). (2013). *Surgical and medical management of male infertility*. Cambridge University Press.

- Gotto Jr, A. M. (1995). Lipid lowering, regression, and coronary events: a review of the interdisciplinary council on lipids and cardiovascular risk intervention, seventh council meeting. *Circulation*, 92(3), 646-656.
- Gupta, M., Sharma, R., & Kumar, A. (2020). Docking techniques in toxicology: an overview. *Current Bioinformatics*, 15(6), 600-610.
- Gurung, P., Yetiskul, E., & Jialal, I. (2022). Physiology, male reproductive system. In *StatPearls [Internet]*. Statpearls publishing.
- Gvozdjakova, A., Kucharska, J., Sykora, L. U., & Singh, R. B. (2014). Balneotherapy and coenzyme Q10 in clinical and experimental medicine. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 6(1), 29-38.
- Hai, Y., Hou, J., Liu, Y., Liu, Y., Yang, H., Li, Z., & He, Z. (2014, May). The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 29, pp. 66-75). Academic Press.
- Hamzeh, M., Hosseinimehr, S. J., Mohammadi, H. R., Beklar, S. Y., Dashti, A., & Amiri, F. T. (2018). Atorvastatin attenuates the ovarian damage induced by cyclophosphamide in rat: An experimental study. *International journal of reproductive biomedicine*, 16(5), 323.
- Haylor, J. L., Harris, K. P., Nicholson, M. L., Waller, H. L., Huang, Q., & Yang, B. (2011). Atorvastatin improving renal ischemia reperfusion injury via direct inhibition of active caspase-3 in rats. *Experimental Biology and Medicine*, 236(6), 755-763.
- Haywood, M., Spaliviero, J., Jimenez, M., King, N. J., Handelsman, D. J., & Allan, C. M. (2003). Sertoli and germ cell development in hypogonadal (hpg) mice expressing transgenic follicle-stimulating hormone alone or in combination with testosterone. *Endocrinology*, 144(2), 509-517.
- He, M. M., Smith, A. S., Oslob, J. D., Flanagan, W. M., Braisted, A. C., Whitty, A., ... & Cunningham, B. C. (2005). Small-molecule inhibition of TNF- α . *Science*, 310(5750), 1022-1025.
- Heindel, J. J., & Treinen, K. A. (1989). Physiology of the male reproductive system: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Toxicologic pathology*, 17(2), 411-445.

- Henriksbo, B. D., Tamrakar, A. K., Xu, J., Duggan, B. M., Cavallari, J. F., Phulka, J., ... & Schertzer, J. D. (2019). Statins promote interleukin-1 β -dependent adipocyte insulin resistance through lower prenylation, not cholesterol. *Diabetes*, 68(7), 1441-1448.
- Henriksbo, B. D., & Schertzer, J. D. (2015). Is immunity a mechanism contributing to statin-induced diabetes?. *Adipocyte*, 4(4), 232-238.
- Hirota, T., Fujita, Y., & Ieiri, I. (2020). An updated review of pharmacokinetic drug interactions and pharmacogenetics of statins. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 16(9), 809-822.
- Holdcraft, R. W., & Braun, R. E. (2004). Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. <https://www.rcsb.org> (Erişim Tarihi:21.07.2024)
- Hu, P., Dharmayat, K. I., Stevens, C. A., Sharabiani, M. T., Jones, R. S., Watts, G. F., ... & Vallejo-Vaz, A. J. (2020). Prevalence of familial hypercholesterolemia among the general population and patients with atherosclerotic cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *Circulation*, 141(22), 1742-1759.
- Huleihel, M., & Lunenfeld, E. (2002). Involvement of intratesticular IL-1 system in the regulation of Sertoli cell functions. *Molecular and cellular endocrinology*, 187(1-2), 125-132.
- Ikonen, E. (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(2), 125-138.
- Jacobsen, W., Kuhn, B., Soldner, A., Kirchner, G., Sewing, K. F., Kollman, P. A., ... & Christians, U. (2000). Lactonization is the critical first step in the disposition of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor atorvastatin. *Drug Metabolism and Disposition*, 28(11), 1369-1378.
- Jain, A. K., Singh, D., Dubey, K., Maurya, R., Mittal, S., & Pandey, A. K. (2018). Models and methods for in vitro toxicity. In *In vitro toxicology* (pp. 45-65). Academic Press.
- JAROW, J. P. (1990). Intratesticular arterial anatomy. *Journal of andrology*, 11(3), 255-259.
- Jarow, J. P., & Zirkin, B. R. (2005). The androgen microenvironment of the human testis and hormonal control of spermatogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1061(1), 208-220.

- Jayatilaka, S., Desai, K., Rijal, S., & Zimmerman, D. (2021). Statin-induced autoimmune necrotizing myopathy. *Journal of Primary Care & Community Health*, 12, 21501327211028714.
- Jégou, B. (1992). 3 The sertoli cell. *Baillière's clinical endocrinology and metabolism*, 6(2), 273-311.
- Jorge, J. H., Giampaolo, E. T., Vergani, C. E., Machado, A. L., Pavarina, A. C., & Carlos, I. Z. (2004). Cytotoxicity of denture base resins: effect of water bath and microwave postpolymerization heat treatments. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 92(6), 568.
- Joshi, S. C., & Sharma, P. (2011). Male reproductive toxicity of organophosphorous compounds: a review. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 93(7), 1486-1507.
- Julien, O., & Wells, J. A. (2017). Caspases and their substrates. *Cell Death & Differentiation*, 24(8), 1380-1389.
- Kaler, L. W., & Neaves, W. B. (1978). Attrition of the human Leydig cell population with advancing age. *The Anatomical Record*, 192(4), 513-518.
- Kantola, T., Kivistö, K. T., & Neuvonen, P. J. (1998). Effect of itraconazole on the pharmacokinetics of atorvastatin. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 64(1), 58-65.
- Karvaly, G. B., Karádi, I., Vincze, I., Neely, M. N., Trojnár, E., Prohászka, Z., ... & Zsáry, A. (2021). A pharmacokinetics-based approach to the monitoring of patient adherence to atorvastatin therapy. *Pharmacology Research & Perspectives*, 9(5), e00856.
- Kearney, A. S., Crawford, L. F., Mehta, S. C., & Radebaugh, G. W. (1993). The interconversion kinetics, equilibrium, and solubilities of the lactone and hydroxyacid forms of the HMG-CoA reductase inhibitor, CI-981. *Pharmaceutical research*, 10, 1461-1465.
- Kelly, D. M., Sellers, D. J., Woodroffe, M. N., Jones, T. H., & Channer, K. S. (2013). Effect of testosterone on inflammatory markers in the development of early atherogenesis in the testicular-feminized mouse model. *Endocrine research*, 38(3), 125-138.

- Kim, N., Nakamura, H., Masaki, H., Kumasawa, K., Hirano, K. I., & Kimura, T. (2017). Effect of lipid metabolism on male fertility. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 485(3), 686-692.
- Kim, S. K., Yoon, Y. D., Park, Y. S., Seo, J. T., & Kim, J. H. (2007). Involvement of the Fas–Fas ligand system and active caspase-3 in abnormal apoptosis in human testes with maturation arrest and Sertoli cell–only syndrome. *Fertility and sterility*, 87(3), 547-553.
- Klinefelter, G. R., Laskey, J. W., & Amann, R. P. (2014). Statin drugs markedly inhibit testosterone production by rat Leydig cells in vitro: Implications for men. *Reproductive Toxicology*, 45, 52-58.
- Kopera, I. A., Bilinska, B., Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2010). Sertoli–germ cell junctions in the testis: a review of recent data. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1546), 1593-1605.
- Le Couteur, D. G., Martin, P. T., Bracs, P., Black, A., Hayes, R., Woolf, T., & Stern, R. (1996). Metabolism and excretion of [14C]-atorvastatin in patients with T-tube drainage. In *Proc Aust Soc Clin Exp Pharmacol Toxicol* (Vol. 3, No. 2, p. 153).
- Lee, O. D., & Tillman, K. (2016). An overview of testosterone therapy. *American Journal of Men's Health*, 10(1), 68-72.
- Lennernäs, H. (1997). Human jejunal effective permeability and its correlation with preclinical drug absorption models. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49(7), 627-638.
- Levine, G. N., Keaney Jr, J. F., & Vita, J. A. (1995). Cholesterol reduction in cardiovascular disease—clinical benefits and possible mechanisms. *New England Journal of Medicine*, 332(8), 512-521.
- Leite, G. A. A., Sanabria, M., Cavariani, M. M., Anselmo-Franci, J. A., Pinheiro, P. F. F., Domeniconi, R. F., & Kempinas, W. D. G. (2018). Lower sperm quality and testicular and epididymal structural impairment in adult rats exposed to rosuvastatin during prepuberty. *Journal of Applied Toxicology*, 38(6), 914-929.
- Li, N., Wang, T., & Han, D. (2012). Structural, cellular and molecular aspects of immune privilege in the testis. *Frontiers in immunology*, 3, 152.
- Li, W., Zhou, J., & Xu, Y. (2015). Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomedical reports*, 3(5), 617-620.

- Liberales, L., Carbone, F., Camici, G. G., & Montecucco, F. (2019). IL-1 β and statin treatment in patients with myocardial infarction and diabetic cardiomyopathy. *Journal of clinical medicine*, 8(11), 1764.
- Lie, P. P., Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2011). The biology of the desmosome-like junction: a versatile anchoring junction and signal transducer in the seminiferous epithelium. *International review of cell and molecular biology*, 286, 223-269.
- Lilja, J. J., Kivistö, K. T., & Neuvonen, P. J. (1999). Grapefruit juice increases serum concentrations of atorvastatin and has no effect on pravastatin. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 66(2), 118-127.
- Linnebur, S. A., & Hiatt, W. H. (2007). Probable statin-induced testicular pain. *Annals of Pharmacotherapy*, 41(1), 138-142.
- Lipshultz, L. I., Murthy, L., & Tindall, D. J. (1982). Characterization of human Sertoli cells in vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 55(2), 228-237.
- Littarru, G. P., & Langsjoen, P. (2007). Coenzyme Q10 and statins: biochemical and clinical implications. *Mitochondrion*, 7, S168-S174.
- Littlefield, N., Beckstrand, R. L., & Luthy, K. E. (2014). Statins' effect on plasma levels of Coenzyme Q10 and improvement in myopathy with supplementation. *Journal of the American Association of Nurse Practitioners*, 26(2), 85-90.
- L. Schrödinger, LigPrep, Version 3.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, USA, (2016).
- L. Schrödinger, Glide, Version 7.1, Schrödinger, LLC: New York, NY, USA, (2016).
- Lysiak, J. J. (2004). The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in the mammalian testis and their involvement in testicular torsion and autoimmune orchitis. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2, 1-10.
- Manna, P. R., Cohen-Tannoudji, J., Counis, R., Garner, C. W., Huhtaniemi, I., Kraemer, F. B., & Stocco, D. M. (2013). Mechanisms of action of hormone-sensitive lipase in mouse Leydig cells: its role in the regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. *Journal of Biological Chemistry*, 288(12), 8505-8518.
- Mao, B., Bu, T., Mruk, D., Li, C., Sun, F., & Cheng, C. Y. (2020). Modulating the blood–testis barrier towards increasing Drug delivery. *Trends in Pharmacological Sciences*, 41(10), 690-700.
- Mawhinney, M., & Mariotti, A. (2013). Physiology, pathology and pharmacology of the male reproductive system. *Periodontology 2000*, 61(1), 232-251.

- McClure, D. L., Valuck, R. J., Glanz, M., Murphy, J. R., & Hokanson, J. E. (2007). Statin and statin–fibrate use was significantly associated with increased myositis risk in a managed care population. *Journal of clinical epidemiology*, 60(8), 812-818.
- McIver, L. A., & Siddique, M. S. (2017). Atorvastatin.
- Menotti, A., Lanti, M., Zanchetti, A., Botta, G., Laurenzi, M., Terradura-Vagnarelli, O., & Mancini, M. (2011). The role of HDL cholesterol in metabolic syndrome predicting cardiovascular events. The Gubbio population study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 21(5), 315-322.
- Middendorff, R., Müller, D., Mewe, M., Mukhopadhyay, A. K., Holstein, A. F., & Davidoff, M. S. (2002). The tunica albuginea of the human testis is characterized by complex contraction and relaxation activities regulated by cyclic GMP. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(7), 3486-3499.
- Mohamad, N. V., Wong, S. K., Hasan, W. N. W., Jolly, J. J., Nur-Farhana, M. F., Ima-Nirwana, S., & Chin, K. Y. (2018). The relationship between circulating testosterone and inflammatory cytokines in men. *The Aging Male*.
- Morgan, D. M. (1998). Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Polyamine protocols*, 179-184.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Myant, N. B. (1981). Cholesterol gallstones; plasma cholesterol in liver disease. *The Biology of Cholesterol and Related Steroids*. London: Heinemann Medical Books, 853-387.
- Naeimi, R. A., Amiri, F. T., Khalatbary, A. R., Ghasemi, A., Zargari, M., Ghesemi, M., & Hosseinimehr, S. J. (2017). Atorvastatin mitigates testicular injuries induced by ionizing radiation in mice. *Reproductive Toxicology*, 72, 115-121.
- Narwal, V., Deswal, R., Batra, B., Kalra, V., Hooda, R., Sharma, M., & Rana, J. S. (2019). Cholesterol biosensors: A review. *Steroids*, 143, 6-17.
- Nassar, G. N., & Leslie, S. W. (2018). Physiology, testosterone.
- Nemati, M., Srai, M., & Rudrangi, R. (2021). Statin-Induced Autoimmune Myopathy. *Cureus*, 13(2).

- New, D. A. T. (1978). Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biological Reviews*, 53(1), 81-122.
- Niederberger, C. (2005). Atorvastatin and male infertility: is there a link?. *Journal of Andrology*, 26(1), 12-12.
- Niethammer, M., Burgdorf, T., Wistorf, E., Schönfelder, G., & Kleinsorge, M. (2022). In vitro models of human development and their potential application in developmental toxicity testing. *Development*, 149(20), dev200933.
- Oakes, D. J., Webster, W. S., Brown-Woodman, P. D. C., & Ritchie, H. E. (2002). Testicular changes induced by chronic exposure to the herbicide formulation, Tordon 75D®(2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and picloram) in rats. *Reproductive Toxicology*, 16(3), 281-289.
- O'Donnell, L., Pratis, K., Wagenfeld, A., Gottwald, U., Müller, J., Leder, G., ... & Stanton, P. G. (2009). Transcriptional profiling of the hormone-responsive stages of spermatogenesis reveals cell-, stage-, and hormone-specific events. *Endocrinology*, 150(11), 5074-5084.
- O'donnell, L., Robertson, K. M., Jones, M. E., & Simpson, E. R. (2001). Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine reviews*, 22(3), 289-318.
- Omar, M. A., Wilson, J. P., & Cox, T. S. (2001). Rhabdomyolysis and HMG-CoA reductase inhibitors. *Annals of Pharmacotherapy*, 35(9), 1096-1107.
- Omolaoye, T. S., Cyril, A. C., Radhakrishnan, R., Rawat, S. S., Karuvantevida, N., & du Plessis, S. S. (2023). The Effect of Statins on Male Reproductive Parameters: A Mechanism Involving Dysregulation of Gonadal Hormone Receptors and TRPV1. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9221.
- Omolaoye, T. S., Halabi, M. O., Mubarak, M., Cyril, A. C., Duvuru, R., Radhakrishnan, R., & Du Plessis, S. S. (2022). Statins and male fertility: is there a cause for concern?. *Toxics*, 10(10), 627.
- O'shaughnessy, P. J., Verhoeven, G., De Gendt, K., Monteiro, A., & Abel, M. H. (2010). Direct action through the Sertoli cells is essential for androgen stimulation of spermatogenesis. *Endocrinology*, 151(5), 2343-2348.
- Padron, R. S., Mas, J., Zamora, R., Riverol, F., Licea, M., Mallea, L., & Rodriguez, J. (1989). Lipids and testicular function. *International Urology and Nephrology*, 21(5), 515-519.

- Pasovic, L., Utheim, T. P., Maria, R., Lyberg, T., Messelt, E. B., Aabel, P., ... & Eidet, J. R. (2013). Optimization of storage temperature for cultured ARPE-19 Cells. *Journal of ophthalmology*, 2013(1), 216359.
- Paquette, J. A., Kumpf, S. W., Streck, R. D., Thomson, J. J., Chapin, R. E., & Stedman, D. B. (2008). Assessment of the embryonic stem cell test and application and use in the pharmaceutical industry. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 83(2), 104-111.
- Payne, A. H., & Youngblood, G. L. (1995). Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biology of reproduction*, 52(2), 217-225.
- Pelletier, R. M. (2011). The blood-testis barrier: the junctional permeability, the proteins and the lipids. *Progress in histochemistry and cytochemistry*, 46(2), 49-127.
- Phillips, K. P., & Tanphaichitr, N. (2008). Human exposure to endocrine disrupters and semen quality. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 11(3-4), 188-220.
- Pons-Rejraji, H., Brugnon, F., Sion, B., Maqdasy, S., Gouby, G., Pereira, B., ... & Tauveron, I. (2014). Evaluation of atorvastatin efficacy and toxicity on spermatozoa, accessory glands and gonadal hormones of healthy men: a pilot prospective clinical trial. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12, 1-12.
- Pons-Rejraji, H., Sion, B., Brugnon, F., Artonne, C., Gouby, G., Grizard, G., ... & Tauveron, I. (2010, April). Effects of atorvastatin on male fertility. In *Endocrine Abstracts* (Vol. 22). Bioscientifica.
- Prueksaritanont, T., Tang, C., Qiu, Y., Mu, L., Subramanian, R., & Lin, J. H. (2002). Effects of fibrates on metabolism of statins in human hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*, 30(11), 1280-1287.
- Pundir, C. S., & Narwal, V. (2018). Biosensing methods for determination of triglycerides: a review. *Biosensors and Bioelectronics*, 100, 214-227.
- Raddino, R., Della Pina, P., Gorga, E., Caretta, G., Madureri, A., & Dei Cas, L. (2010). Indications for statin therapy in patients with acute coronary syndrome of ischemic origin. *Giornale Italiano di Cardiologia (2006)*, 11(10 Suppl 1), 78S-83S.

- Rajagopal, R., Baltazar, M. T., Carmichael, P. L., Dent, M. P., Head, J., Li, H., ... & Kukic, P. (2022). Beyond AOPs: A mechanistic evaluation of NAMs in DART testing. *Frontiers in toxicology*, 4, 838466.
- Ramirez-Torres, M. A., Carrera, A., & Zambrana, M. (2000). High incidence of hyperestrogenemia and dyslipidemia in a group of infertile men. *Ginecologia y obstetricia de Mexico*, 68, 224-229.
- Rastrelli, G., Corona, G., & Maggi, M. (2018). Testosterone and sexual function in men. *Maturitas*, 112, 46-52.
- Repetto, G., Del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols*, 3(7), 1125-1131.
- Ross, A., & Bhasin, S. (2016). Hypogonadism: its prevalence and diagnosis. *Urologic Clinics*, 43(2), 163-176.
- Sadasivam, M., Ramatchandirin, B., Balakrishnan, S., & Prahalathan, C. (2015). TNF- α -mediated suppression of Leydig cell steroidogenesis involves DAX-1. *Inflammation Research*, 64, 549-556.
- Said, T. M., Paasch, U., Glander, H. J., & Agarwal, A. (2004). Role of caspases in male infertility. *Human reproduction update*, 10(1), 39-51.
- Sakamaki, K., & Satou, Y. (2009). Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates. *Journal of fish biology*, 74(4), 727-753.
- Schrödinger Release 2020-3, Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, USA, 2020.
- Schrödinger Suite 2020 Update 2; Schrödinger LLC: New York, NY, USA, 2020.
- Scott, T. W., Voglmayr, J. K., & Setchell, B. P. (1967). Lipid composition and metabolism in testicular and ejaculated ram spermatozoa. *Biochemical Journal*, 102(2), 456.
- Sharma, R., & Agarwal, A. (2011). Spermatogenesis: an overview. *Sperm chromatin: biological and clinical applications in male infertility and assisted reproduction*, 19-44.
- Sharpe, R. M. (1990). Intratesticular control of steroidogenesis. *Clinical endocrinology*, 33(6), 787-807.
- Sharpe, R. M. (1992). Monitoring of spermatogenesis in man-measurement of Sertoli cell-or germ cell-secreted proteins in semen or blood. *International journal of andrology*, 15(3), 201-210.

- Sharpe, R. M. (1994). Regulation of spermatogenesis. The physiology of reproduction. *Raven Press. New York*, 1, 1363-1434.
- Shima, Y., Miyabayashi, K., Haraguchi, S., Arakawa, T., Otake, H., Baba, T., ... & Morohashi, K. I. (2013). Contribution of Leydig and Sertoli cells to testosterone production in mouse fetal testes. *Molecular endocrinology*, 27(1), 63-73.
- Sirtori, C. R. (2014). The pharmacology of statins. *Pharmacological research*, 88, 3-11.
- Solomon, K. R., & Freeman, M. R. (2008). Do the cholesterol-lowering properties of statins affect cancer risk?. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 19(4), 113-121.
- Song, N., Liu, J., An, S., Nishino, T., Hishikawa, Y., & Koji, T. (2011). Immunohistochemical analysis of histone H3 modifications in germ cells during mouse spermatogenesis. *Acta histochemica et cytochemica*, 44(4), 183-190.
- Spielmann, H., Pohl, I., Doring, B., Liebsch, M., & Moldenhauer, F. (1997). The embryonic stem cell test, an in vitro embryotoxicity test using two permanent mouse cell lines: 3T3 fibroblasts and embryonic stem cells. *In Vitro Toxicology*, 10(1), 119-128.
- Stanton, P. G., Sluka, P., Foo, C. F. H., Stephens, A. N., Smith, A. I., McLachlan, R. I., & O'Donnell, L. (2012). Proteomic changes in rat spermatogenesis in response to in vivo androgen manipulation; impact on meiotic cells.
- Stern, R. H., Yang, B. B., Horton, M., Moore, S., Abel, R. B., & Olson, S. C. (1997). Renal dysfunction does not alter the pharmacokinetics or LDL-cholesterol reduction of atorvastatin. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 37(9), 816-819.
- Stone, N. J., Robinson, J. G., Lichtenstein, A. H., Bairey Merz, C. N., Blum, C. B., Eckel, R. H., ... & Wilson, P. W. (2014). 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*, 129(25_suppl_2), S1-S45.
- Strober, W. (1997). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, 21(1), A-3B.
- Su, L., Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. (2011). Drug transporters, the blood–testis barrier, and spermatogenesis. *The Journal of endocrinology*, 208(3), 207.

- Su, L., Mruk, D. D., Lui, W. Y., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2011). P-glycoprotein regulates blood–testis barrier dynamics via its effects on the occludin/zonula occludens 1 (ZO-1) protein complex mediated by focal adhesion kinase (FAK). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(49), 19623-19628.
- Superko, H. R., & Krauss, R. M. (1994). Coronary artery disease regression. Convincing evidence for the benefit of aggressive lipoprotein management. *Circulation*, 90(2), 1056-1069.
- Svvs, R., Trivedi, P. P., Kushwaha, S., Vikram, A., & Jena, G. B. (2013). Protective role of atorvastatin against doxorubicin-induced cardiotoxicity and testicular toxicity in mice. *Journal of physiology and biochemistry*, 69, 513-525.
- Syriou, V., Papanikolaou, D., Kozyraki, A., & Goulis, D. G. (2018). Cytokines and male infertility. *European cytokine network*, 29, 73-82.
- Tandra, S., & Vuppalandhi, R. (2009). Use of statins in patients with liver disease. *Current treatment options in cardiovascular medicine*, 11(4), 272-278.
- Tiwana, M. S., & Leslie, S. W. (2017). Anatomy, abdomen and pelvis, testicle.
- Turner, T. T., Jones, C. E., Howards, S. S., Ewing, L. L., Zegeye, B., & Gunsalus, G. L. (1984). On the androgen microenvironment of maturing spermatozoa. *Endocrinology*, 115(5), 1925-1932.
- van Leuven, S. I., & Kastelein, J. J. (2005). Atorvastatin. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 6(7), 1191-1203.
- Walker, J. F. (1989). Simvastatin: the clinical profile. *The American Journal of Medicine*, 87, S44-S46.
- Walum, E., Clemenson, C., & Ekwall, B. (1994). Principles for the validation of in vitro toxicology test methods. *Toxicology in vitro*, 8(4), 807-812.
- Wang, X. Q., Luo, N. S., CHEN, Z. Q., Lin, Y. Q., Gu, M. N., & Chen, Y. X. (2014). Atorvastatin attenuates TNF-alpha production via heme oxygenase-1 pathway in LPS-stimulated RAW264. 7 macrophages. *Biomedical and Environmental Sciences*, 27(10), 786-793.
- Wassmann, S., Laufs, U., Müller, K., Konkol, C., Ahlbory, K., Bäumer, A. T., ... & Nickenig, G. (2002). Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 22(2), 300-305.

- Welsh, M., Saunders, P. T., Atanassova, N., Sharpe, R. M., & Smith, L. B. (2009). Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *The FASEB Journal*, 23(12), 4218.
- Wenisch, C., Krause, R., Fladerer, P., El Menjawi, I., & Pohanka, E. (2000). Acute rhabdomyolysis after atorvastatin and fusidic acid therapy. *The American journal of medicine*, 109(1), 78.
- Whitlow, S., Bürgin, H., & Clemann, N. (2007). The embryonic stem cell test for the early selection of pharmaceutical compounds. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, 24(1), 3-7.
- Willems, A., Roesl, C., Mitchell, R. T., Milne, L., Jeffery, N., Smith, S., ... & Smith, L. B. (2015). Sertoli cell androgen receptor signalling in adulthood is essential for post-meiotic germ cell development. *Molecular reproduction and development*.
- Working, P. K. (1988). Male reproductive toxicology: comparison of the human to animal models. *Environmental health perspectives*, 77, 37-44.
- World Health Organization. Food Safety Programme. (2002). *Health Implications of Acrylamide in Food: Report of a Joint FAO/WHO Consultation*, WHO Headquarters, Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002. World health organization.
- World Health Organization. (2003). Progress report in reproductive health research, no. 23. Geneva, Switzerland.
- Wroblewski, F., & Ladue, J. S. (1956). Serum glutamic pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 91(4), 569-571.
- Yang, J., Pan, Y., Li, X., & Wang, X. (2015). Atorvastatin attenuates cognitive deficits through Akt1/caspase-3 signaling pathway in ischemic stroke. *Brain Research*, 1629, 231-239.
- Yokoyama, S. (2000). Release of cellular cholesterol: molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cells and in the body. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1529(1-3), 231-244.
- Zarek, J., & Koren, G. (2014). The fetal safety of statins: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 36(6), 506-509.

- Zhong, L., Sun, J., Liu, G. H., Zhu, Y. J., & Zhu, J. (2013). Research on the steroidogenesis of proliferated Leydig cells in vitro. *Journal of Artificial Organs*, 16, 229-233.
- Zhou, Q., & Liao, J. K. (2010). Pleiotropic Effects of Statins—Basic Research and Clinical Perspectives—. *Circulation journal*, 74(5), 818-826.
- Żółciński, M., Cieśla-Dul, M., Potaczek, D. P., & Undas, A. (2013). Atorvastatin favorably modulates proinflammatory cytokine profile in patients following deep vein thrombosis. *Thrombosis Research*, 132(1), e31-e35.