

**T.C.
BASBAKANLIK
VAKIFLAR GENEL MÜDÜRLÜĞÜ
BEZM-İ ALEM VALİDE SULTAN
VAKIF GUREBA
EĞİTİM ve ARAŞTIRMA HASTANESİ
KALP DAMAR CERRAHİ KLİNİĞİ**

**KLİNİK SEFİ
Doç.Dr.Tahsin Yaşar**

**ENDOTEL HASARI OLUŞTURULAN
RATLARDA STATİNLERİN İNTİMAL
HİPERPLAZİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Uzmanlık Tezi

Dr.Ünal Aydın

İSTANBUL 2007

Önsöz:

Asistanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım ayrıca eğitim sürecimde önümü açan, pratik yaklaşımlarda beni cesaretlendiren değerli hocam Doç.Dr.Tahsin Yaşar'a teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasında katkı ve yardımlarından ötürü Dr.Bekir İnan'a, Dr.Pınar Özay'a, Dr.Ahmet Rıza Uras'a ve Dr Ali.Volkan Özdemir'e, Dr.Sedat Ziyade'ye teşekkür ederim.

Aynı zamanda asistanlık hayatım sürecinde bilgi ve becerilerini benimle paylaşan Op.Dr.Müslüm Duru'ya, Op.Dr.Yusuf Kalko'ya, Op.Dr.Bekir İnan'a teşekkür ederim. Beraber çalıştığım tüm asistan, hemşire ve personel arkadaşlara da bu süreçteki katkılarından ötürü teşekkür ederim.

Tababet bilgi ve becerisini tüm insanlığın hizmetine sunmak amacı ve görevi ile ...

İçindekiler:

| | |
|-----------------------|-----------|
| ÖNSÖZ..... | 1 |
| ÖZET | 3 |
| GİRİŞ | 5 |
| METOD | 15 |
| BULGULAR | 18 |
| TARTIŞMA | 32 |
| SONUÇ | 35 |
| KAYNAKLAR..... | 36 |

Özet:

Giriş: Vasküler hasarla gelişen enflamatuar yanıt, intimal hiperplazi formunda vasküler bir komplikasyon olarak ortaya çıkması ciddi bir morbidite ve mortalite kaynağı olmaktadır. Dolayısıyla intimal hiperplazi ile mücadelenin yollarının araştırılması ve bu konuda çeşitli ip uçlarına varılabilmesi için birçok çalışma yapılmaktadır. Biz de atorvastatinin intimal hiperplazi üzerindeki olası etkilerini araştırdık.

Metod: Statinlerin intimal hiperplazi üzerine olan etkisinin araştırılması için ratlarda intimal vasküler hasar-intimal hiperplazi modeli oluşturuldu. Ratlar 4 gruba ayrıldı; 3 gruba aortada intimal hasar oluşturuldu, bir gruba ise sadece laparotomi yapıldı. Birinci gruba 1mg/kg dozunda atorvastatin, ikinci gruba taşıyıcı madde karboksi metil selüloz 1cc/gün, üçüncü gruba ise izotonik 1cc/gün, transperitoneal yolla verildi son gruba ise herhangi bir madde verilmedi. Tüm gruplar 3 hafta standart bir şekilde beslendi ve 3. haftanın sonunda sakrifiye edildiler. Bu esnada total kolesterol ve LDL değerlerini tespit amacıyla 3 cc kan biokimyasal analize tabi tutuldu. Ayrıca hasar oluşturulan aort segmentine de histopatolojik inceleme yapıldı. Histopatolojik değerlendirme ise intima media oranı, luminal daralma oranı ve intimal düz kas hücre artışı parametrelerine göre yapıldı.

Bulgular: Statin uygulanan grupta total kolesterol ve LDL değerleri diğer gruplardan anlamlı ölçüde düşük olarak izlendi. Bununla birlikte intima media oranı statin uygulanan grupta diğer iki gruptan anlamlı olarak daha az çıktı. Düz kas hücre artışı ise yine statin uygulanan grupta daha az olarak tespit edildi. Bununla birlikte luminal daralma yönünden değerlendirilen segmentlerde ise statin uygulanan grup ile diğer gruplar arasında fark olmasına rağmen istatistiki olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Tartışma: Atorvastatinin antioksidan, antiplatelet ve antiinflamatuvar etkileri mevcuttur.

Bu pleiotropik etki gücü özelliği ile intimal hiperplaziyi baskılayıcı bir etkide bulunmuştur. Gerek in vivo gerekse de in vitro çalışmalarda atorvastatinin pleiotropik etkisinin ancak asetil salisilik asit veya klopidogrel gibi kombinasyonlarla ortaya çıkacağı iddia edilse de bizim çalışmamızda atorvastatinin bu etkileri tek başına da oluturabileceği görülmüştür.

Sonuç: Hipolipidemik bir ajan olan atorvastatin pleiotropik etkileri ile intimal hiperplazi oluşumunu baskılamakta ve intimanın yeniden yapılanmasına destek olmaktadır.

Giriş:

İntimal hiperplazi perkütan ve açık vasküler girişimlerin komplikasyonu olan morbidite ve mortalite oluşturan önemli bir patofizyolojik süreç ve sonuçtur.

Etyolojisi kesin olarak ortaya çıkarılmamışsa da platelet, lökosit ve damar düz kas hücrelerinin çeşitli mediatörler aracılığı ile oluşturduğu bir kaskadın sonucudur.[1]

Hidroksi Metil Glutaril Ko-A Redüktaz inhibitörlerinin (statinler) kolesterol düzeyini düşürme etkilerinin yanı sıra birçok farklı etkilerinin de olduğu ortaya çıkarılmıştır.[2,3]

Statinlerin antienflamatuar, antiplatelet aggregasyonu ve antitrombotik özellikleri bilinmektedir.[4] Buna ek olarak statinlerin endotelial hücre fonksiyonlarının yönlendirilmesinde, sitokin üretiminde ve büyüme faktörü inhibisyonunda rolü olduğu gösterilmiştir.[2]

Statin grubundan bir ajan olan ve geniş kullanım alanı bulan atorvastatin'in antienflamatuar, antioksidan, antiplatelet aggregasyonu etkileri mevcuttur.[5,6] Bunun yanı sıra damar duvarı düz kas hücre migrasyonunu da inhibe ettiği ortaya konmuştur.[7]

Atorvastatinin bu etkilerinin kliniğe dönük olarak araştırılması amacıyla bir rat vasküler hasar-intimal hiperplazi modeli oluşturuldu. Bu model için 4 grup ratta atorvastatin, plasebo ve kontrol grupları oluşturularak total kolesterol, LDL düzeyleri ile birlikte histopatolojik düzeyde intimal hiperplazi araştırıldı.

Genel Bilgiler:

Vasküler anatomi:

Vasküler sistem kanı pıhtılaşmadan taşıma özelliğine sahip non-trombojenik yapılardır.

Damarlar sadece kanı pıhtılaşmadan taşımakla kalmaz vasküler ve ekstravasküler alanlar arasındaki moleküler ve selüler trafiği de organize ederler.

Arteriel sistem kanı kalpten dokulara ulaştırıcı taşıyıcı sistemdir. Arterler 3 grupta

sınıflanırlar: - Büyük (elastik) arterler

- Orta (müsküler) arterler

- Küçük arterler

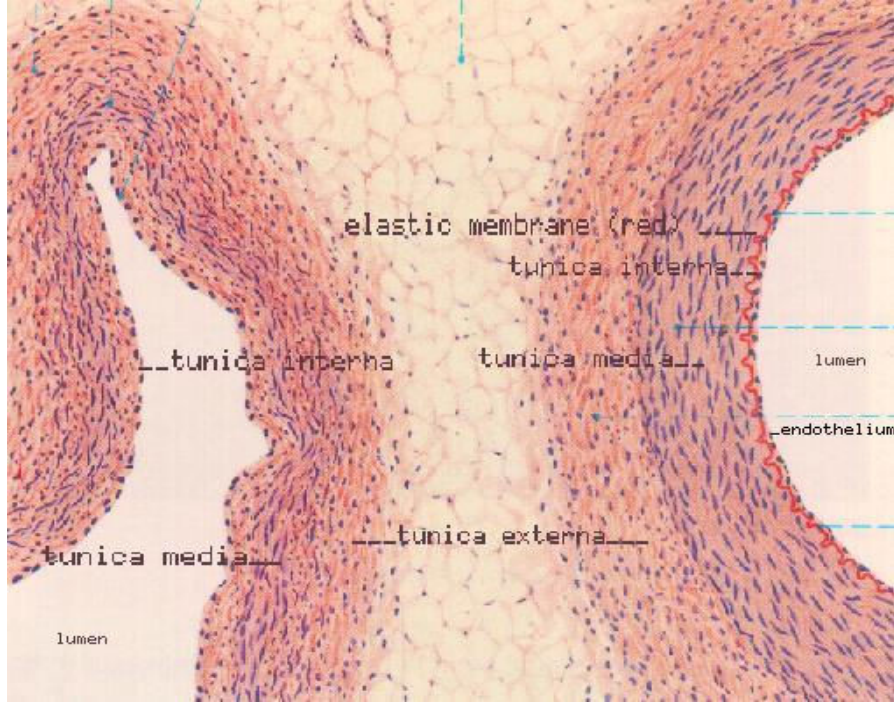
Tüm arterler intima, media ve adventisia olmak üzere 3 yapıya sahiptirler. Arterler

media tabakasındaki elastik doku miktarı ile diğerlerinden ayrılırlar. Damarlar

küçüldükçe elastik doku azalır, internal ve elastik laminaların devamlılığı bozulur.

Vücuttaki diğer damarlarla karşılaştırıldığında küçük arterlerde lümene oranla daha geniş bir media tabakası vardır.

Arterioskleroz elastik ve müsküler arterlerin media tabakasında kalsifik skleroza neden olurken küçük çaplı arterlerde ise yaygın fibromüsküler kalınlaşma ve hyalinizasyon görülür.[8]



(Frithjof Hammersen, M.D., 1985. Sobotta/Hammersen Histology, Color Atlas of Microscopic Anatomy. Urban & Schwarzenberg, Baltimore. pgs. 128-129)

Resim 1: Arter yapısı, histolojik kompartmanları

İntimal Hiperplazi:

İntimal hiperplazi, damar duvarının yaralanmaya karşı verdiği cevap ve travmatize edilmiş arterlerde, arteriolize venlerde ve prostetik bypas greftlerinde kronik yapısal değişiklikleri ifade etmektedir. Aynı zamanda intimal hiperplazi damar düz kas hücrelerinin anormal migrasyonu ve proliferasyonu ile birlikte ekstraselüler bağ dokusu depolanması, takiben de yeni bir dokunun oluşması olarak da tanımlanabilir.

Makroskopik olarak kronik lezyon sıkı, renksiz ve homojen bir yapıdadır. Kapsanmış alan arterin endoteliumu ile internal elastik membran arasındadır. İntimal hiperplazinin dağılımı ise anastomoz bölgesinde veya damar duvarının bizzat kendisindedir.

Vasküler hasarlanmaya cevap olarak ortaya çıkan intimal hiperplazi ile birlikte intimal hasarlanma için sistematik bir sınıflamaya gidilmesine yol açmıştır.

Vasküler duvar yaralanması:

Tip I: Morfolojik değişikliğe yol açmayan fonksiyonel hafif değişiklikler

Tip II: İntimal ve medial hasarlanma oluşturmada endotelial erozyon

Tip III: İntimal ve medial hasarlanma ile birlikte endotelial erozyon [9]

Arteriel Hasarlanmaya Cevap:

Endotelial hücre yaralanması; luminal trombozis, enflamatuar hücre infiltrasyonu,

hücrel proliferasyon ve neoendoteliumun oluşması ile trombotik materyalin

temizlenme sürecini içerir. Adventisiya ve düz kas hücre yaralanması ise hücrel

proliferasyon ve migrasyona sebep olur. Progenitör hücreler damar duvarına penetre

olurlar. Adventisiyel hücrelerin ve düz kas hücrelerinin migrasyonu ve proliferasyonu ile

birlikte ekstraselüler matriks depolanması artar sonuçta intimal hiperplazi oluşur.

Zamanla bu lezyon şekillenir ya pozitif yönde değişime uğrayarak damar çapının

artmasına ya da negatif değişime uğrayarak luminal çapın azalmasına yol açar. İntimal

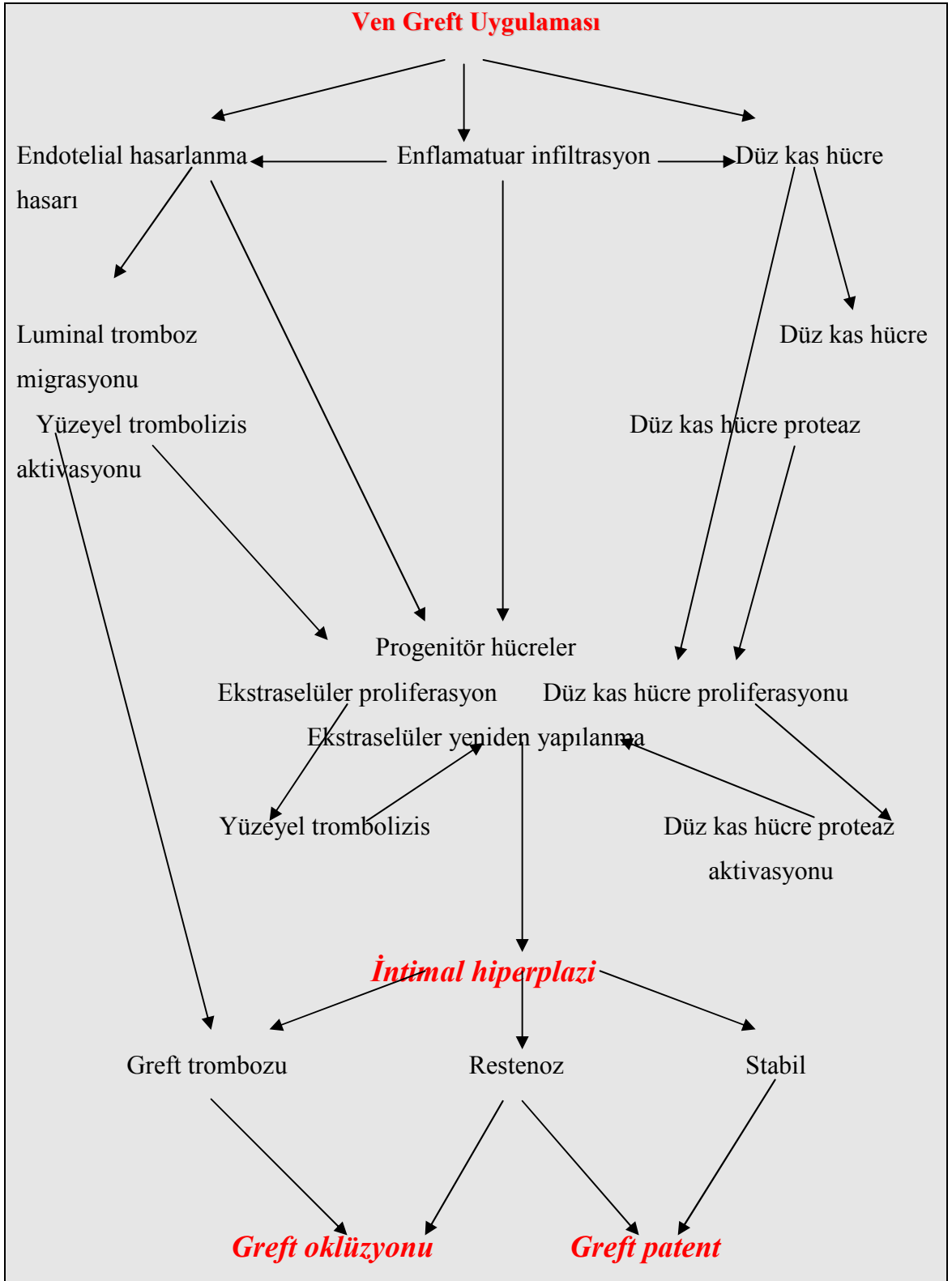
lezyondaki bu kronik değişiklikler patensin devamına, restenoz veya oklüzyona sebep

olurlar.[10,11,12]

| | Damar lümeni | Damar duvarı |
|--|-------------------------------|---|
| Evre 1: Hiperakut (dakika-saat) | Endotelial hücre hasarı | Düz kas hücre hasarı |
| | Platelet agregasyonu | Düz kas hücre aktivasyonu |
| | Büyüme promotor salınımı | Proto-onkogen salınımı |
| | | Büyüme promotor salınımı |
| Evre 2: Akut (saat-hafta) | Tromboz organizasyonu | Media düz kas hücre replikasyonu |
| | Endotelial hücre büyümesi | Media düz kas hücre migrasyonu |
| | Büyüme inhibitörleri salınımı | Lökosit infiltrasyonu |
| | Progenitör hücre depolanması | Adventisiel hücre infiltrasyonu |
| | | Progenitör hücre infiltrasyonu |
| | | Büyüme promotor sentezi |
| | | Büyüme inhibitörleri sentezi |
| Evre 3: Kronik (hafta-ay) | Re-endotelizasyon | İntimal düz kas hücre replikasyonu |
| | Luminal çapların değişimi | Ekstraselüler matriks intimal düz kas hücre sentezi |
| | | Ekstraselüler matriks yeniden yapılanması |
| | | Büyüme inhibitörlerinin sentezi |
| | | Damar yeniden yapılanması |

Tablo 1: Vasküler hasarlanmayı takip eden süreçte gelişen histopatolojik değişiklikler

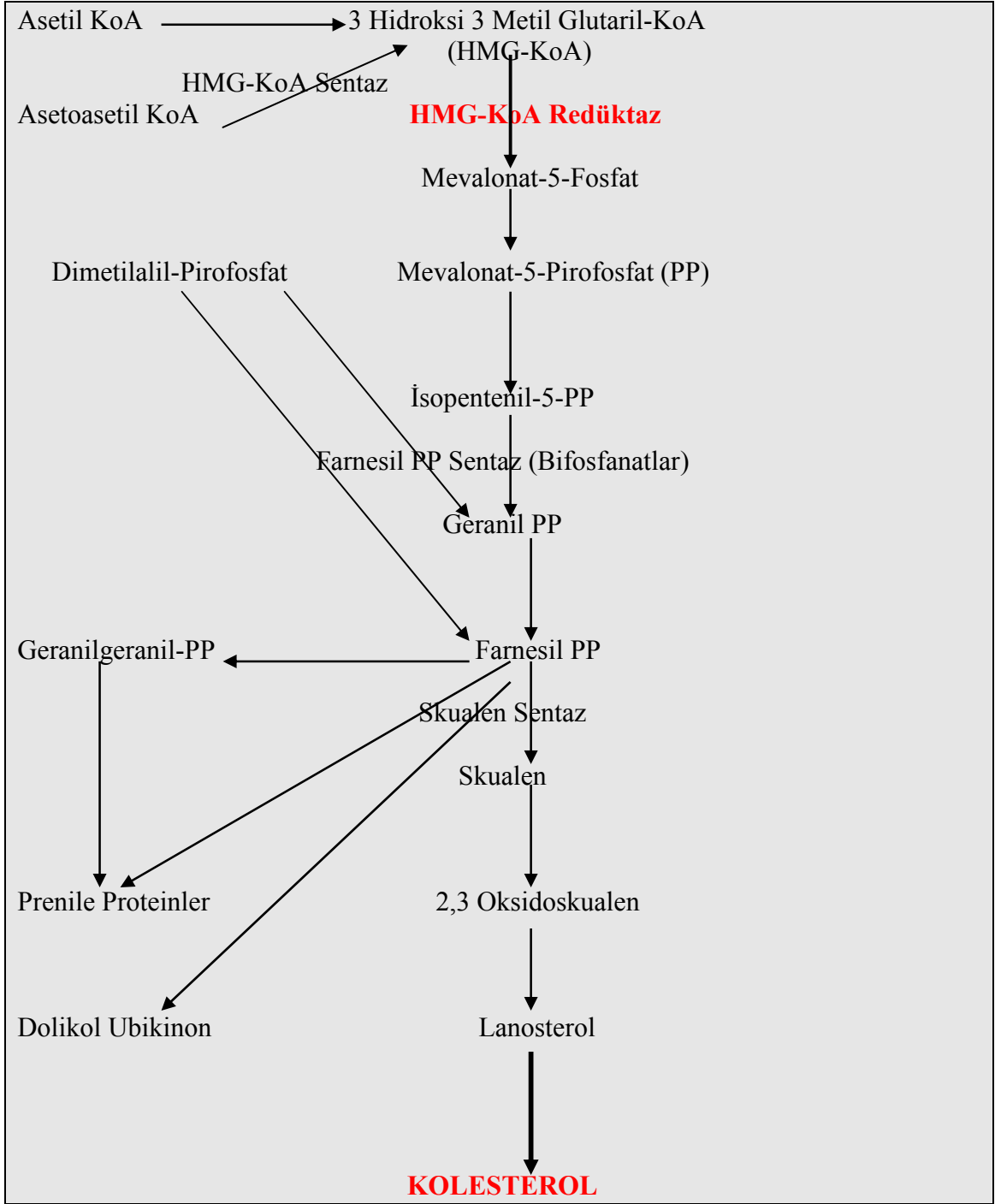
Venöz greft uygulamasını takiben gelişen süreç tablo 2’de özetlenmiştir.



Tablo 2: Venöz greft uygulaması ile oluşan değişiklikler [13]

Statinler:

HMG-KoA redüktaz inhibitörleri (statinler) hipolipidemik ajanlardır ve serum kolesterol seviyesini HMG-KoA redüktaz inhibisyonu ile de novo kolesterol sentezinin kilit molekülü olan mevalonat yapımını engelleyerek düşürürler. Böylece hepatositler kandan kolesterol çekerek serum kolesterol değerini aşağıya çekerler. Kolesterol suda çözünmez kanda lipoprotein formunda taşınır, bağlanan apoproteine göre de tipi belirlenir. Low Dansity Lipoprotein (LDL) ve Very Low Dansity Lipoprotein (VLDL) kolesterolü dokulara taşırken High Density Lipoprotein (HDL) ise kolesterolü dokulardan karaciğere taşır. Statinlerin intraselüler kolesterol seviyesini düşürmesi ile LDL ve VLDL reseptörleri uyarılarak kandan bu kolesterolleri alırlar, kan seviyelerini düşürürler, HDL'i ise artırırılar. [14] LDL ve VLDL düzeylerinin kanda yükselmesi ile birlikte damar duvarında yağ içerikli birikimlerin oluşumuna yol açtığı görülmüştür.[15,16] Statinler sadece aterogenezi önlemekle kalmaz endotelial gelişimi düzenler, enflamatuvar cevabı organize eder, plak stabilitesini sağlar ve trombüs oluşumunu engeller.[17] Bu noktadan hareketle biz de deneysel çalışmamızda statinin bu etkilerinden faydalanarak intimal hiperplazi üzerindeki etkilerini araştırdık.



Tablo 3: Kolesterol sentezi ve HMG-KoA Redüktaz enziminin etkisi

Atorvastatin:HMG-KoA redüktaz inhibitörü ve hipokolesterolemik bir ajan olarak yaygın klinik kullanımı olan bir moleküldür. Farmakolojik ve biokimyasal özellikleri

itibari ile diğer statinlere benzemektedir. Ancak atorvastatinin diğer statinlere oranla hipokolesterolemik etkisinin daha yüksek, rabdomyoliz ve transaminazları yükseltme oranının ise daha düşük olduğu yönündeki bilgilerden dolayı araştırmamız için tercih ettik.[18]

Statinlerin İntimal Hiperplazi Üzerine Etkisi:

Hiperkolesterolemi ile birlikte LDL'nin oksidasyonu LOX-1 reseptörü ile gerçekleştirilerek okside LDL ortaya çıkarılır. Okside LDL enflamasyonu, makrofaj ve düz kas hücrelerinin migrasyonunu, endotel hücreleri tarafından adezyon moleküllerinin salınmasını ve kompleman bağlanmasını uyarır. [19,20] Aynı zamanda monosit fonksiyonlarını da uyarır sonuçta da intimal hiperplazi oluşumunu sağlar. [21]

Hiperkolesterolemi oksijen radikali oluşumunun artışı ile de ilişkilidir.[22,23] Oksijen radikalleri platelet ve lökositleri uyararak dolaylı olarak düz kas hücre proliferasyonunu gerçekleştirirler. Dolayısıyla lipid düşürücü etkisi ile statinler okside LDL ve oksijen radikallerinin oranını düşürerek intimal hiperplaziyi azaltırlar.[24]

Statinler oksidatif stresi 2 mekanizma ile azaltırlar.1-Direk olarak kolesterolü, okside LDL'i azaltarak 2-İndirek olarak da platelet aktivasyonunu inhibe ederek [27] Bunun ötesinde sadece oksijen radikalleri plateletleri aktive etmez aktive plateletler de oksijen radikali üretimini uyarır. [28]

İntimal hiperplazinin oluşumunu sağlayan, düz kas hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu da içeren ve birçok hücre tipinde artan, azalan fonksiyonları ve proliferasyonu yöneten hücre fonksiyon yönetici molekülleri olarak büyüme faktörleri bilinmektedir. Statinlerin Ras proteini izoprenilasyonunu (hidrofobik bağla proteine bağlanma özelliği) engelleyerek GTPaz aktivasyonu taşıyan bir proteinin hücresel

regülasyona dahil olmasını ve böylece de vasküler düz kas hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu azalttığı bilinmektedir. [29,24]

Sitokinlerin de intimal hiperplazi oluşumunda önemli katkıları vardır. Enflamatuar sitokinler hasarlanmış endotel hücreleri, aktif lökositler, plateletler ve intimal hiperplazi gelişiminin tüm ana karakterleri tarafından salınırlar. Restenoz ile sonuçlanan vasküler hasar IL-6 tarafından artırılan doku faktörü, monosit kemotaksisi, LDL reseptörleri, nötrofil adezyonu ve düz kas hücre proliferasyonu faktörleri tarafından gerçekleştirilmektedir. [30,31,32] IL-1-beta da düz kas hücre proliferasyonunu ve hücresel adezyon moleküllerini stimüle etmektedir. [33,34,35] IL-8 de lökositler için bir uyarıcı ajandır ve intimal hiperplazide rol almaktadır. Statinlerin IL-6, IL-1-beta ve IL-8 sentezini azalttıkları gösterilmiştir. [36,37,38]

Metod:

Hayvanlar:

Statinlerin intimal hiperplazi üzerine olan etkisinin araştırılması için erkek Wistar Albino türü ratlar (n:30, ağırlık 400-/+50 gram) 12 saat ışık/karanlık siklusunda 25 C ısıda tutularak ve standart gıdalarla beslenerek deneysel çalışmada kullanıldı. Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından değerlendirilip onaylandı ve takibi yapıldı.

Tedavi rejimi:

Atorvastatin (Abdi İbrahim İlaç Sanayi, İstanbul) 1 mg/kg/gün transperitoneal yolla verilmek üzere enjektabl formda hazırlandı. Bu formda verilebilmesi için de atorvastatin molekülü %0.5 Karboksi Metil Selüloz (4, 9000-11-2, C4146, Sigma-Aldrich, 2007) solüsyonu içinde çözüldü.

Deneysel model için ratlar 4 gruba ayrıldılar.3 hafta süren çalışma sürecinde 1.gruba (n:8) atorvastatin 1mg/kg/gün, 2.gruba (n:6) karboksi metil selüloz 1cc/gün, 3.gruba (n:8) % 0.9 salin 1 cc/gün ve 4.gruba da herhangi bir madde verilmedi.

Cerrahi Girişim:

Vasküler hasar oluşturmak ve aynı zamanda cerrahi girişimlere benzer bir model yaratmak amacıyla rat abdominal aortuna cerrahi girişimde bulunuldu. Ratlara 100 mg/kg Ketamin'in intramüsküler uygulanması ile anestezi sağlandı. Anesteziyi takiben batın orta hatta 3 cm uzunluğunda bir kesi ile laparotomi yapıldı. Laparotomi ile birlikte bağırsaklar sağa deviye edilerek abdominal aort eksplere edildi. Rata 100 U /kg heparin yapıldı. İnfrarenal düzeyde aort mikrobuldog klemplerle proksimal ve distalden klempe edildi. 11 numara bistüri ile aorta 0.5 mm kadar bir transvers kesi yapıldı. Kesiden aort içine sokulan 27 Gauge iğne ile endotel hasarı sağlandı. Bu kesi alanı 8.0 monofilaman

propilen sütür ile dikilerek aort kapatıldı, klempler kaldırıldı. Aort kan akımından ve kanama kontrolünden emin olunduktan sonra organlar yerlerine yerleştirildi ve tüm anatomik katlar kapatılarak operasyon sona erdirildi. Ratlar tam uyandıktan ve normal yaşamsal işleyişlerine döndükten sonra kafeslerine yerleştirildiler. Bu işlem 3 gruba yapıldı, 4. gruba ise yalnızca laparotomi yapıldı, aorta herhangi bir girişimde bulunulmadı.

Araştırma Seyri Ve Sonuçlandırılması:

Üç hafta boyunca 1. gruba 1 mg/kg/gün dozunda transperitoneal yolla atorvastatin, 2.gruba 1 cc/gün % 0.5 karboksi metil selüloz, 3. gruba 1 cc/gün % 0.9 salin, 4. gruba ise herhangi bir madde verilmedi. Dört grubun da günlük gözlemleri ve enjeksiyonları yapıldı. Ratlarda herhangi bir komplikasyonveya anormal bir durumla kaşılaşılmadı.

nc haftanın sonunda çalışma sonlandırıldı. Sonlandırma aşamasında ratlar eterle uyutuldu. Tekrar laparotomi yapılarak işlem yapılan aort segmenti eksplere edildi. Bu esnada biokimyasal analiz için 3 cc kan alındı. Aortotomi yapılan yerin 1 cm proksimal ve distalinden aort segmenti kesilerek çıkarıldı ve % 10 formol içinde muhafaza edildi. Takiben eter dozu artırılarak ratlar sakrifiye edildi. Bu işlem 4 gruba da yapıldı.

Biokimyasal analiz:

Ratlardan alınan 3 cc kan Total kolesterol ve LDL düzeylerinin tespiti için biokimyasal analize tabi tutuldu (Architect C 8000 Autoanalyzer, Abbot Park, Illinois 60064, USA).

Histopatolojik alışmalar:

% 10 formol içinde saklanan 3 mikron boyutunda kesitleri alınan aort segmentleri patoloji laboratuvarında Verhoeff-von Gieson ve Hemotoksilen Eozin boyası ile boyanarak elastin liflerinin dağılımı gözlenerek çalışıldı. Patolojik çalışmalarda 3

parametre araştırıldı: 1-İntima media oranı 2-Kesit alan daralma oranı 3-Düz kas hücre artışı

Olympus CX31 mikroskobu ve Olympus DP2-BSW görüntüleme sistemleri kullanılarak intima ve media alanları ölçülerek birbirine oranlandı.[39] Böylece yalnızca intimadaki hiperplaziye bağlı kalınlaşma analiz edilebildi. Aort kesit alanı daralması ölçümü ise aort segmentinin normal olduğu kesitteki yüzey alanının intimal hasara uğratılmış kesitteki alana oranlanmasıyla elde edildi.[40] Son parametre olan düz kas hücre artışı ise mediadan intimaya göç eden ve proliferen olan düz kas hücre sayımlarının hafif, orta, ileri kategorilerinde sınıflandırılmasıyla intimal hiperplazi analizinde kullanıldı.[41,42,43]

İstatistiksel Analiz:

Dört grubumuzun da intima media oranı, luminal daralma oranı, LDL ve Total kolesterol değerleri bir varyans analiz olan Kruskal-Wallis Testi ile değerlendirildi. Gruplar arasında $p < 0.05$ olanlar anlamlı olarak kabul edildi. Saptanan farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını anlayabilmek için Bonferroni düzeltmesi ile Mann-Whitney U Testi uygulandı. Bonferroni düzeltmesi anlamlılık oranı $0.05/4 = 0.0125$ olarak kabul edildi. Düz kas hücre artışı ise var-yok olarak değerlendirildi ve Fischer's Exact Test kullanılarak analiz edildi.

,

Bulgular:

Biokimyasal Analiz:

Tüm grupların biokimyasal analizleri yapıldı. Total kolesterol ve LDL değerleri monitörize edildi. LDL değerleri açısından gruplar birbirleri ile karşılaştırıldığında Grup 1'in (Statin uygulanan grup, 9.5-/+2.56) diğer 3 gruptan (22.3-/+5.39, 16.8-/+3.83, 16.5-7+5.37) anlamlı fark gösterdiği izlendi.

LDL değerleri analizi

| | Grup 1 | Grup 2 | Grup 3 | Grup 4 |
|----------------|---------|---------|---------|---------|
| Ortalama | 9.5 | 22.3 | 16.8 | 16.5 |
| Standart sapma | -/+2.56 | -/+5.39 | -/+3.83 | -/+5.37 |

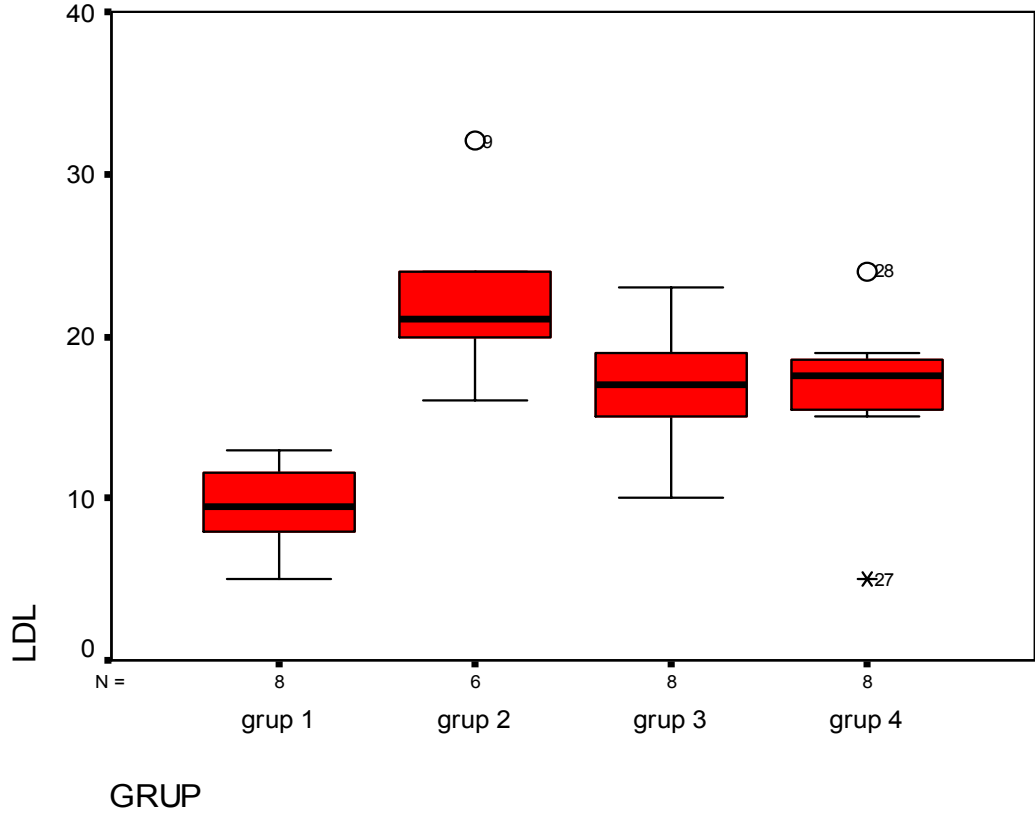
Tablo 4: LDL değerleri ortalama ve Standard sapma değerleri

Varyans analiz sonuna göre, dört grup olgunun LDL oranları arasındaki farklılık, istatistiksel olarak çok anlamlıdır (X^2_{K-W} :16.428 SD:3, p: 0.001)

| Karşılaştırma | U değeri | p değeri |
|-----------------|----------|--------------|
| Grup 1 & Grup 2 | 0.000 | 0.002 |
| Grup 1 & Grup 3 | 3.500 | 0.003 |
| Grup 1 & Grup 4 | 7.500 | 0.010 |
| Grup 2 & Grup 3 | 8.500 | 0.044 |
| Grup 2 & Grup 4 | 9.000 | 0.052 |
| Grup 3 & Grup 4 | 30.000 | 0.832 |

Tablo 5: LDL değerlerinin gruplar içinde karşılaştırılması

Bonferroni anlamlılık düzeyi (0.0125) dikkate alındığında, farkın grup 1'den kaynaklandığı görülmektedir.



Grafik 1: LDL değerlerinin analizi

Total kolesterol değerlerine göre gruplar irdelenip değerler analiz edildiğinde ise yine Grup 1 (47.8-/+9.65) diğer gruplarla (67.1-/+ 8.99, 63.0-/+8.36, 62.2-/+7.88) karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark göstermektedir.

| | Grup 1 | Grup 2 | Grup 3 | Grup 4 |
|----------------|---------|---------|---------|---------|
| Ortalama | 47.8 | 67.1 | 63.0 | 62.2 |
| Standart sapma | -/+9.65 | -/+8.99 | -/+8.36 | -/+7.88 |

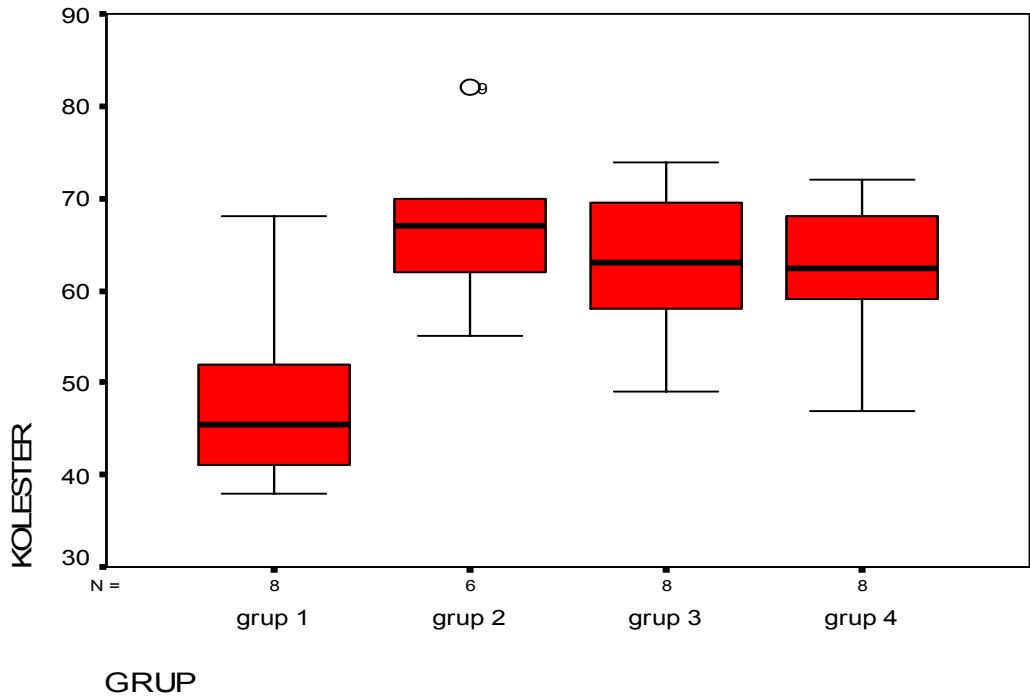
Tablo 6: Total kolesterol değerlerinin ortalama ve standard sapma değerleri

Varyans analiz sonuna göre, dört grup olgunun kolesterol oranları arasındaki farklılık, istatistiksel olarak anlamlıdır ($X^2_{K-W}:11.013$ SD:3, p:0.012)

| Karşılaştırma | U değeri | p değeri |
|-----------------|----------|--------------|
| Grup 1 & Grup 2 | 3.500 | 0.008 |
| Grup 1 & Grup 3 | 8.000 | 0.012 |
| Grup 1 & Grup 4 | 8.000 | 0.012 |
| Grup 2 & Grup 3 | 17.500 | 0.400 |
| Grup 2 & Grup 4 | 17.500 | 0.401 |
| Grup 3 & Grup 4 | 29.000 | 0.752 |

Tablo 7: Total kolesterol değerlerinin gruplar içinde karşılaştırılması

Bonferroni anlamlılık düzeyi (0.0125) dikkate alındığında, farkın grup 1'den kaynaklandığı görülmektedir.



Grafik 2: Total kolesterol değerlerinin analizi

Histopatolojik analiz:

Tüm gruplar intima media oranı, luminal daralam oranı ve düz kas hücre artışı parametrelerine göre analiz edildi.

İntima media oranı: Bu açıdan değerlendirildiğinde ise Grup 1'in (0.07-/+0.02), Grup 2 (1.15-/+1.22) ve Grup 3'ten (0.38-/+0.45) istatistiki olarak anlamlı fark oluşturduğu gözlemlendi. Bununla birlikte Grup 4'ün (0.07-/+0.02) de Grup 2 ve 3 ile anlamlı fark oluşturduğu izlendi. Aynı zamanda Grup 4 ile Grup 1 arasında anlamlı fark izlenemedi. İntima media oranının benzer seyrettiği görüldü.

| | Grup 1 | Grup 2 | Grup 3 | Grup 4 |
|----------------|---------|---------|---------|---------|
| Ortalama | 0.07 | 1.15 | 0.38 | 0.07 |
| Standart sapma | -/+0.02 | -/+1.22 | -/+0.45 | -/+0.02 |

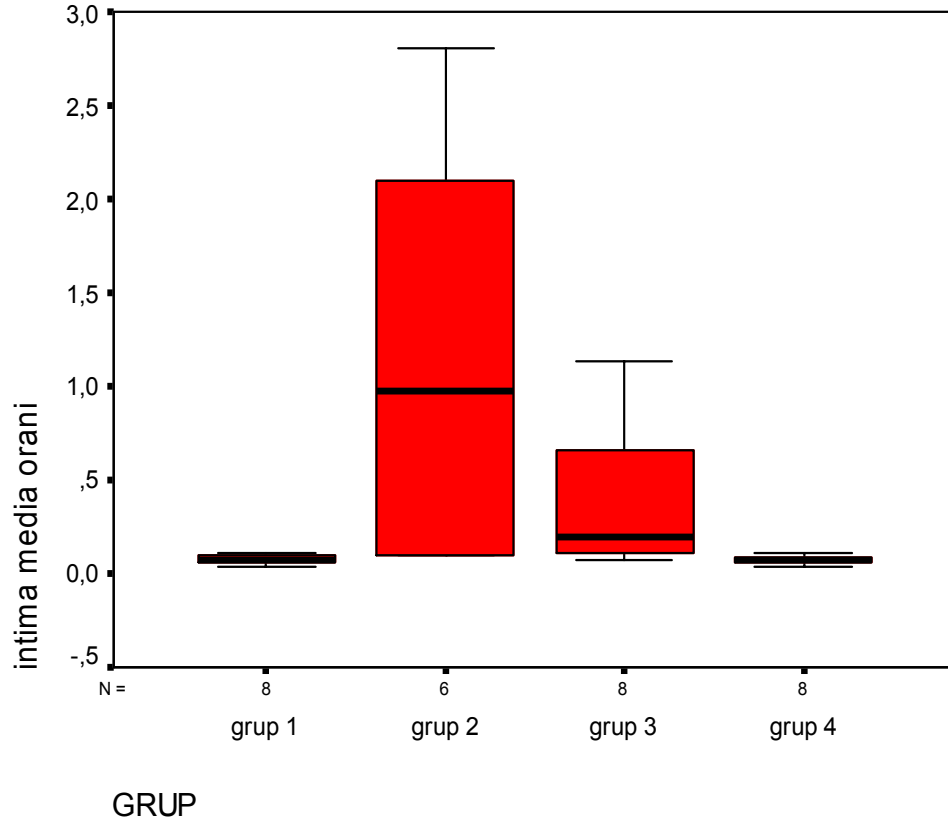
Tablo 8: İntima media oranlarının ortalama ve standart sapma değerleri

Varyans analiz sonuna göre, dört grup olgunun intima media oranları arasındaki farklılık, istatistiksel olarak anlamlıdır (X^2_{K-W} : 14.910 SD:3, p:0.002).

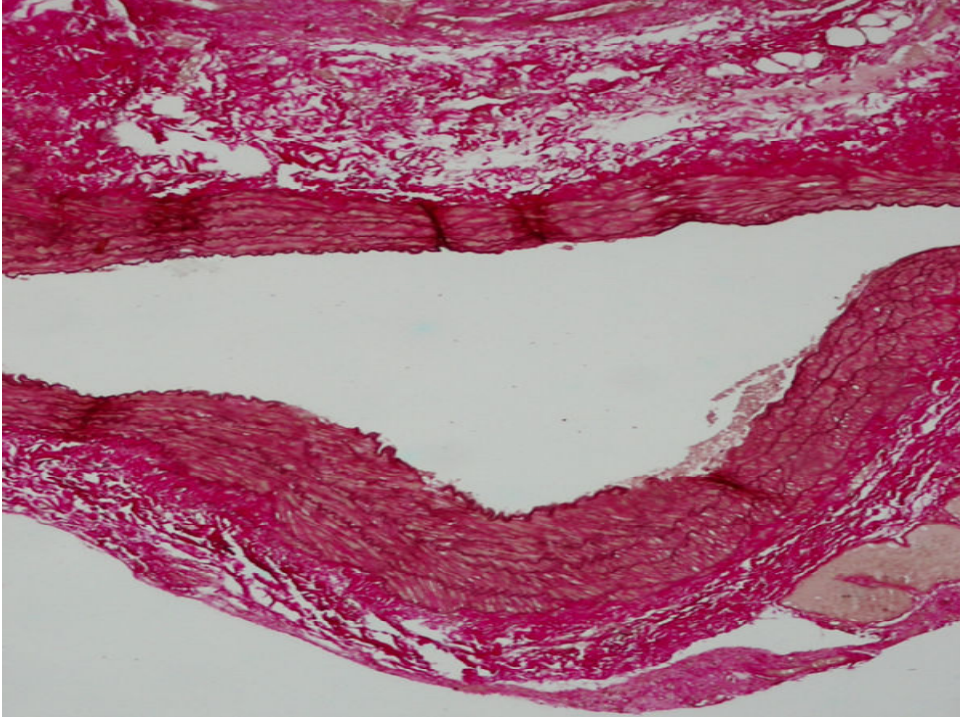
| Karşılaştırma | U değeri | p değeri |
|-----------------|----------|--------------|
| Grup 1 & Grup 2 | 4.000 | 0.009 |
| Grup 1 & Grup 3 | 7.500 | 0.010 |
| Grup 1 & Grup 4 | 29.500 | 0.791 |
| Grup 2 & Grup 3 | 17.000 | 0.366 |
| Grup 2 & Grup 4 | 3.000 | 0.006 |
| Grup 3 & Grup 4 | 6.000 | 0.006 |

Tablo 9: İntima media oranlarının gruplar içinde karşılaştırılması

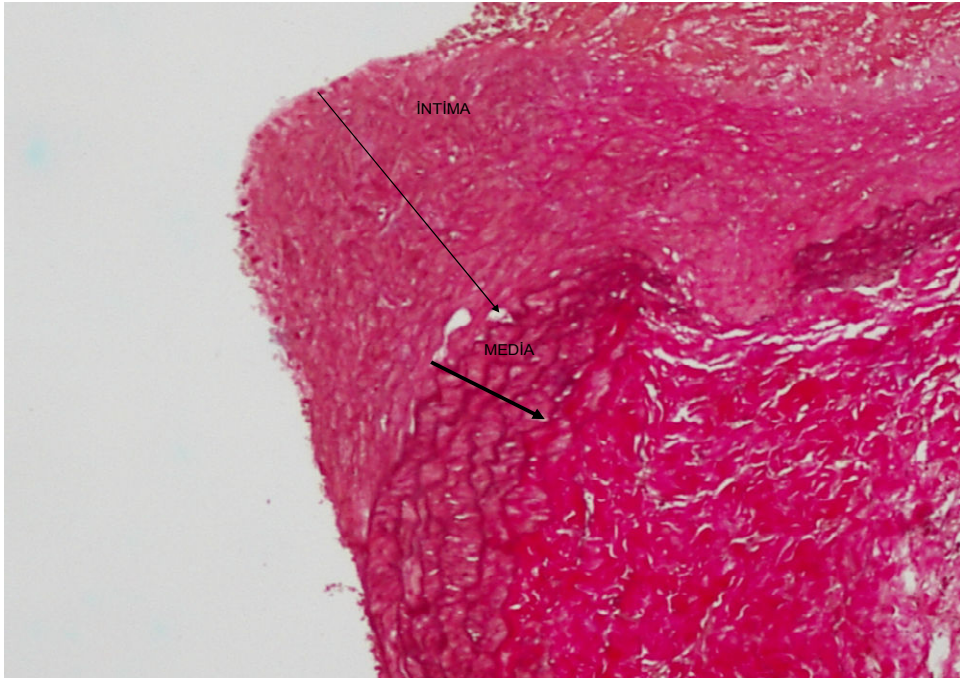
Bonferroni anlamlılık düzeyi (0.0125) dikkate alındığında, farkın grup 2'den kaynaklandığı görülmektedir.



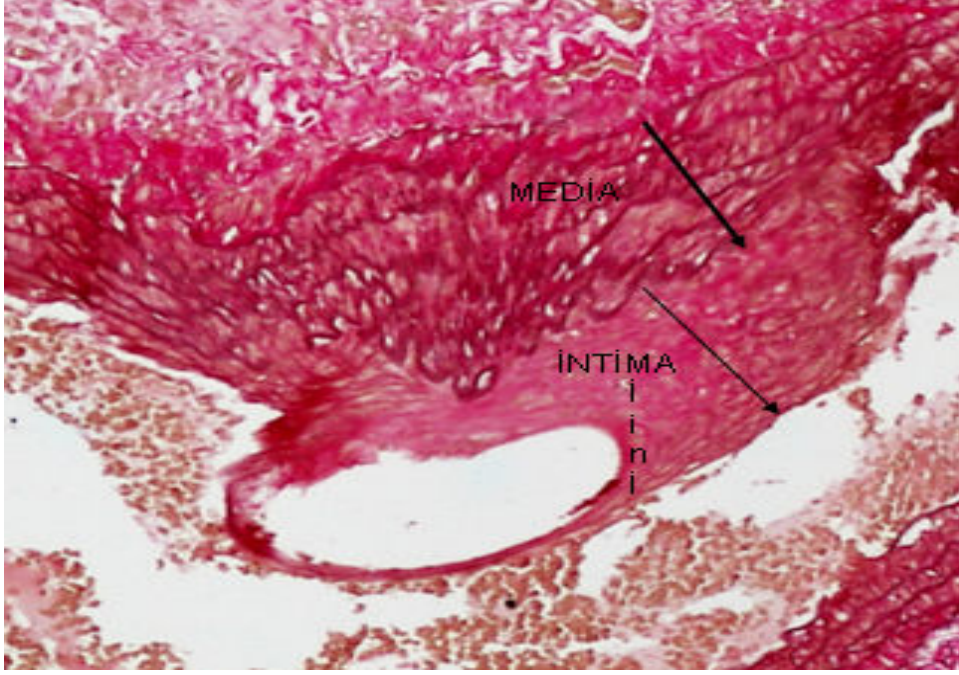
Grafik 3: İntima media oranlarının gruplar içinde analizi



Resim Ia - Grup 1 (statin): İntima media oranı >Normal değerler
(Verhoff von Gieson boyama, X100, Olympus DP2-BSW)



Resim Ib - Grup 2 (çözücü) : İntima media oranı >İntimal hiperplazi
(Verhoff von Gieson boyama, X100, Olympus DP2-BSW)



Resim 1c - Grup 3 (izotonik) : İntima media oranı > İntimal hiperplazi

(Verhoff von Gieson boyama, X100, Olympus DP2-BSW)



Resim 1d - Grup 4 (kontrol) > İntima media oranı > Normal değerler

(Verhoff von Gieson boyama, X100, Olympus DP2-BSW)

Luminal daralma: Grup 1'in (0.33-/+0.35) Grup 3 (1.25-/+0.92) ve Grup 2(1.8-/+2.1) ile karşılaştırıldığında farklı olmakla birlikte istatistiki olarak anlamlı fark göstermediği izlendi. Grup 4'ün (0.05-/+0.09) ise yine Grup 2 (1.8-/+2.1) ve Grup 3 (1.25-/+0.92) farklı olduğu ayrıca Grup 2'den de istatistiki olarak da anlamlı fark gösterdiği tespit edildi.

| | Grup 1 | Grup 2 | Grup 3 | Grup 4 |
|----------------|--------|--------|--------|--------|
| Ortalama | 3.3 | 18 | 12.5 | 0.5 |
| Standart sapma | -/+3.5 | -/+21 | -/+9.2 | -/+0.9 |

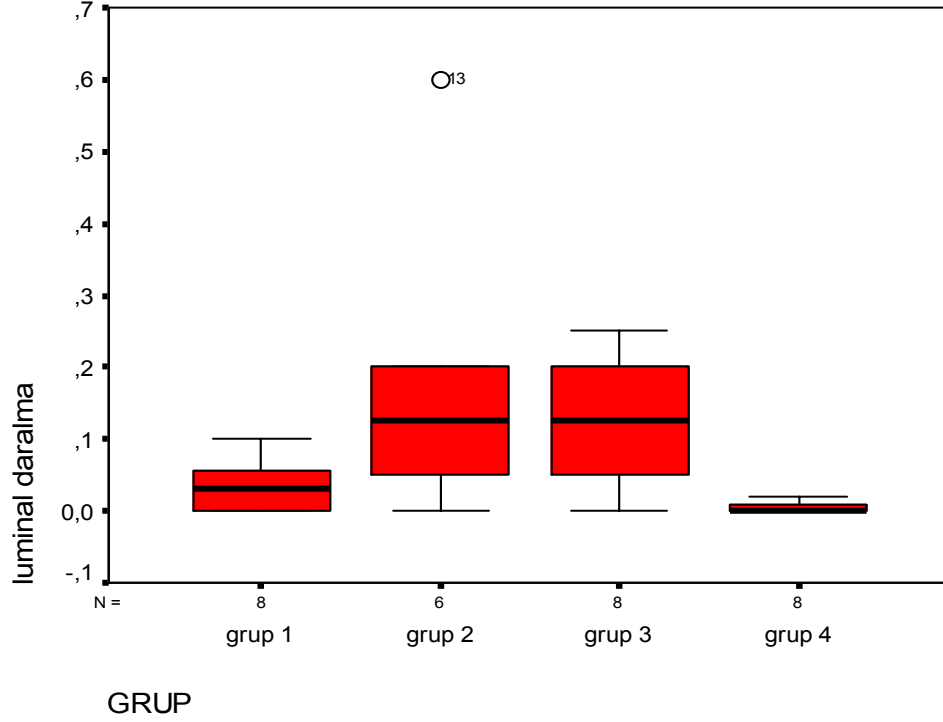
Tablo 10 : Luminal daralma oranı ortalama ve standard sapma değerleri

Varyans analiz sonuna göre, dört grup olgunun luminal daralma oranları arasındaki farklılık, istatistiksel olarak anlamlıdır (X^2_{K-W} :11.462 SD:3, p:0.009)

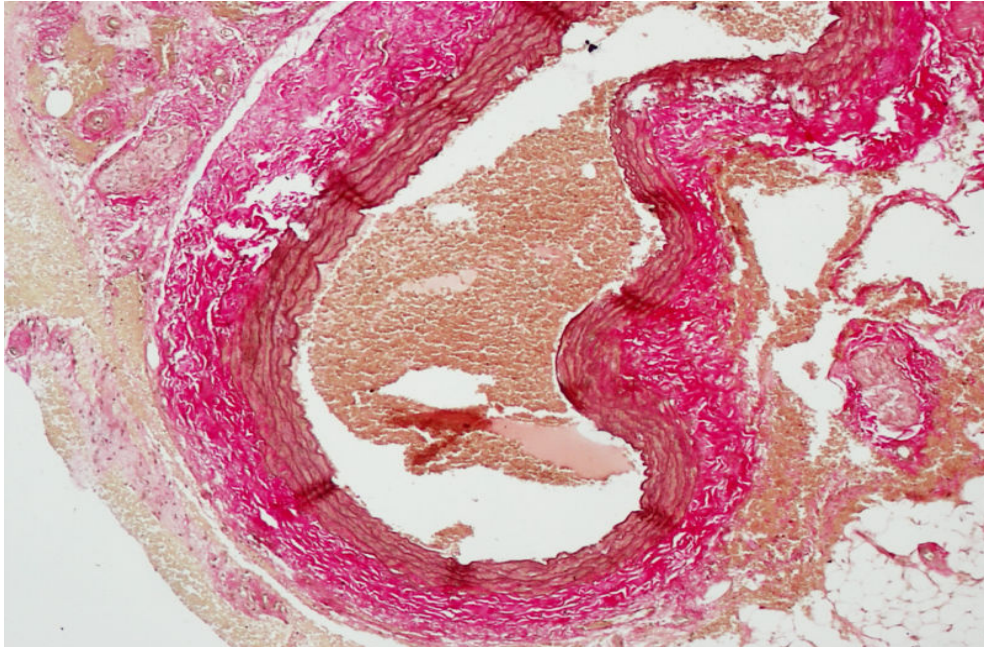
| Karşılaştırma | U değeri | p değeri |
|-----------------|----------|--------------|
| Grup 1 & Grup 2 | 9.500 | 0.058 |
| Grup 1 & Grup 3 | 14.000 | 0.054 |
| Grup 1 & Grup 4 | 16.000 | 0.063 |
| Grup 2 & Grup 3 | 23.500 | 0.948 |
| Grup 2 & Grup 4 | 5.000 | 0.009 |
| Grup 3 & Grup 4 | 10.000 | 0.013 |

Tablo 11: Luminal daralma oranlarının gruplar içinde karşılaştırılması

Bonferroni anlamlılık düzeyi (0.0125) dikkate alındığında, farkın grup 4'ten kaynaklandığı görülmektedir.

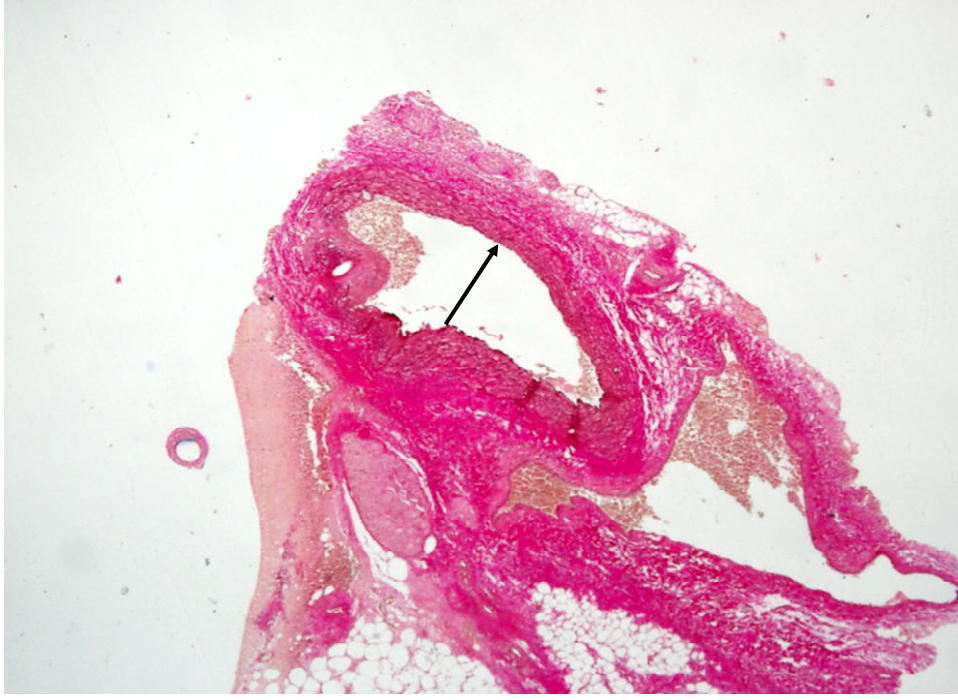


Grafik 4 : Luminal daralma oranları analizi



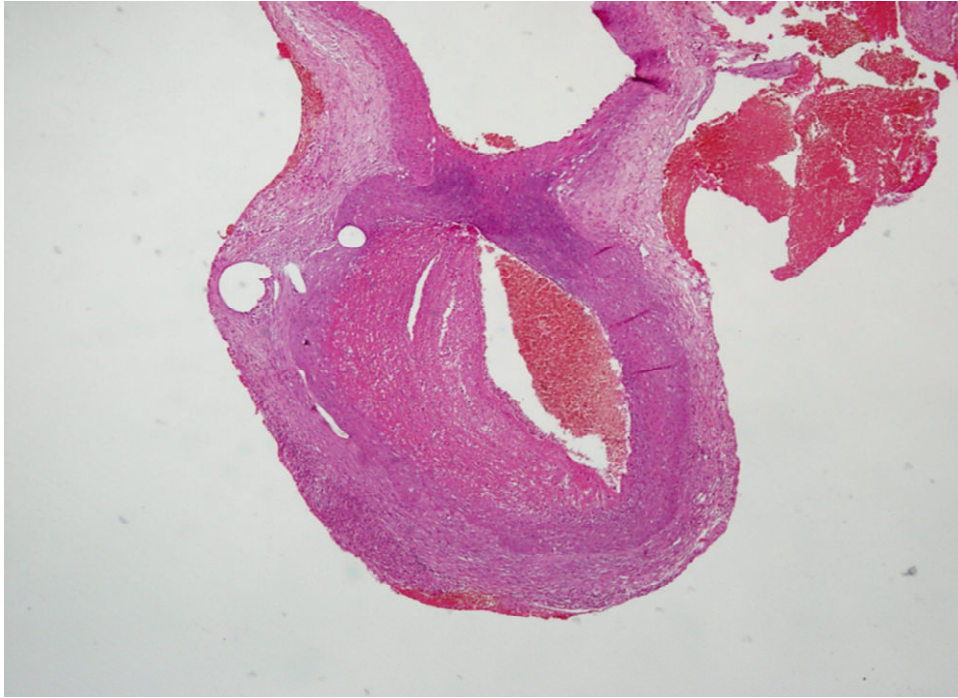
Resim IIa -Grup 1 (statin) : Kesit alan çapı normale yakın izlenmekte

(Verhoff von Gieson boyama, X40, Olympus DP2-BSW)



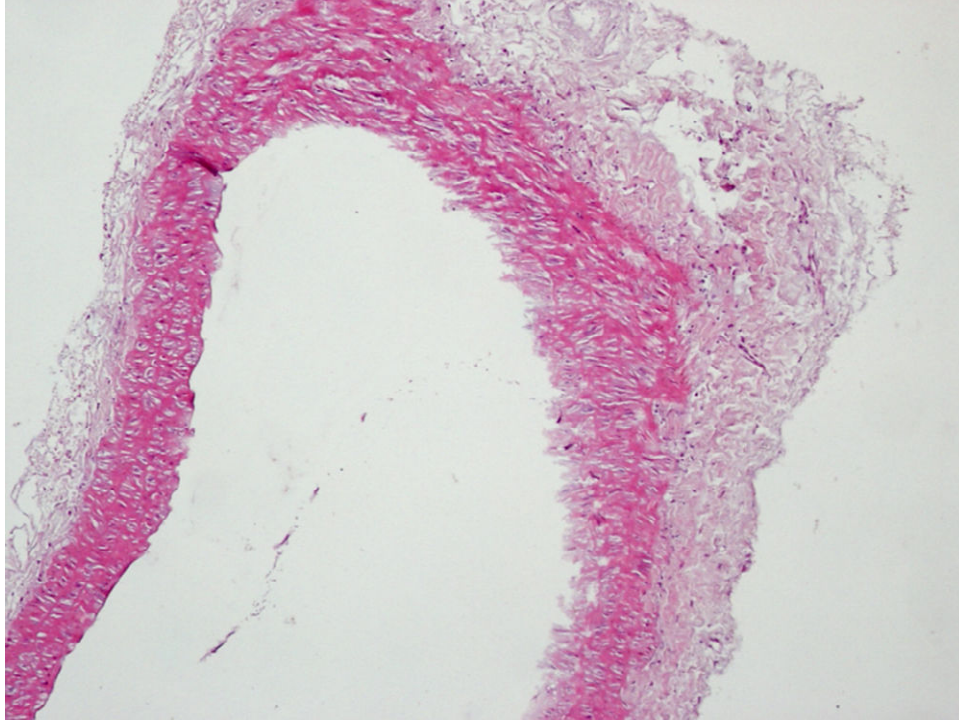
Resim IIb -Grup 2 (çözücü): Kesit alan çapında daralma

(Verhoff von Gieson boyama, X40, Olympus DP2-BSW)



Resim IIc - Grup 3 (izotonik) : Kesit alan çapında daralma

(Verhoff von Gieson boyama, X40, Olympus DP2-BSW)



Resim 11d - Grup 4 (kontrol) : Kesit alan normal değerlerde

(Verhoff von Gieson boyama, X40, Olympus DP2-BSW)

İntimal düz kas hücre artışı: Düz kas hücre artışı hafif , orta, şiddetli olarak kategorize edilmesine rağmen istatistiki çalışmalarda düz kas hücre artışı var-yok olarak değerlendirildi. Bu analize göre ise Grup 1 ile Grup 2 ve 3 arasında anlamlı fark izlendi. Ayrıca Grup 4 ile de Grup 2 ve 3 arasında anlamlı fark gözlemlendi.

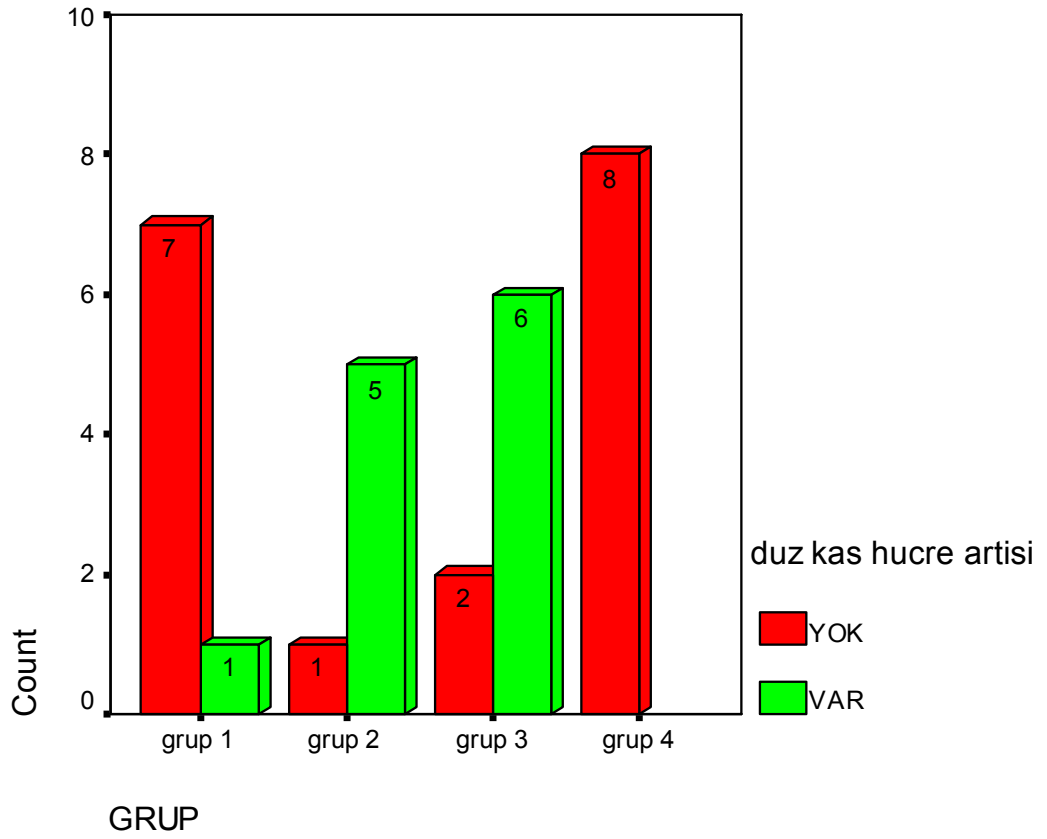
| | Yok | Hafif | Orta | Şiddetli |
|--------|------------|--------------|-------------|-----------------|
| Grup 1 | % 87 | % 13 | -- | -- |
| Grup 2 | % 16 | % 16 | % 50 | % 16 |
| Grup 3 | % 25 | % 25 | % 50 | -- |
| Grup 4 | % 100 | -- | -- | -- |

Tablo 12 :Düz kas hücre artışının yok, hafif, orta, şiddetli olarak derecelendirilip kategorize edilmesi ile oluşturulan tablo

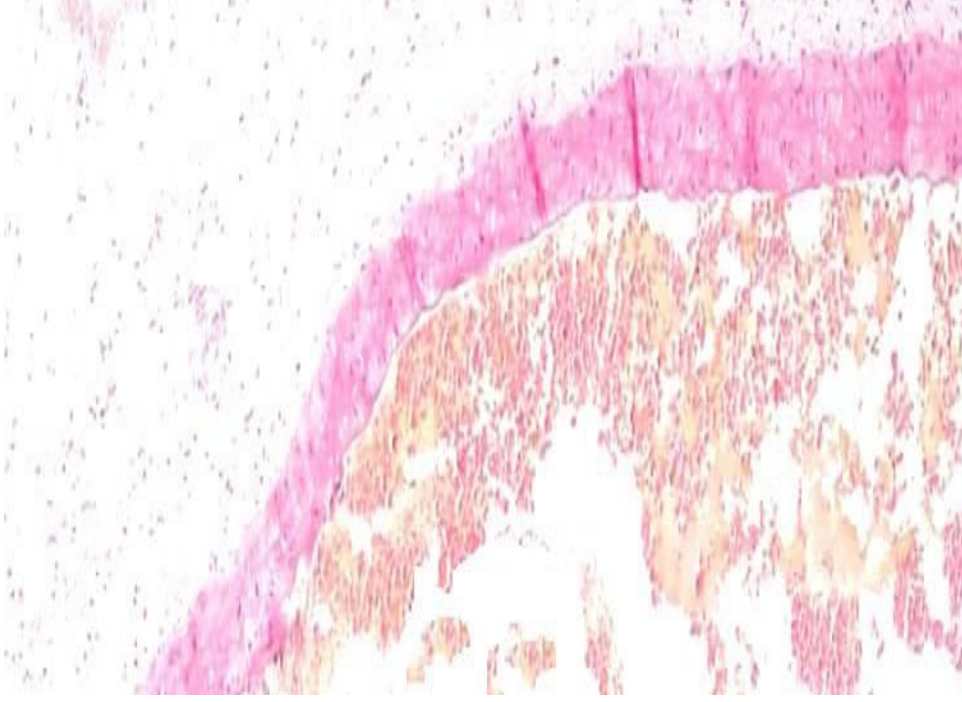
Fischer's Exact Test analizine göre karşılaştırılan gruplar arasındaki fark anlamlıdır. ($p < 0.05$)

| Karşılaştırma | % | p değeri |
|-----------------|--------------|----------|
| Grup 1 & Grup 2 | % 12 -- % 83 | 0.026 |
| Grup 1 & Grup 3 | % 12 -- % 75 | 0.041 |
| Grup 2 & Grup 4 | % 83 -- % 0 | 0.003 |
| Grup 3 & Grup 4 | % 75 -- % 0 | 0.007 |

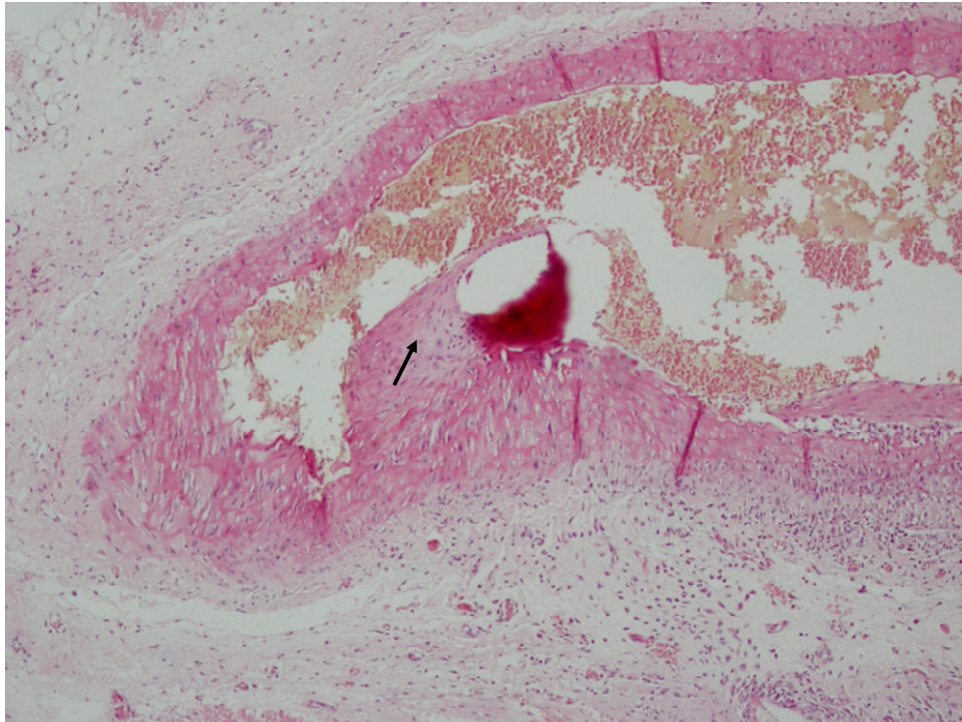
Tablo 13 : Düz kas hücre artışının gruplar arasında karşılaştırılması



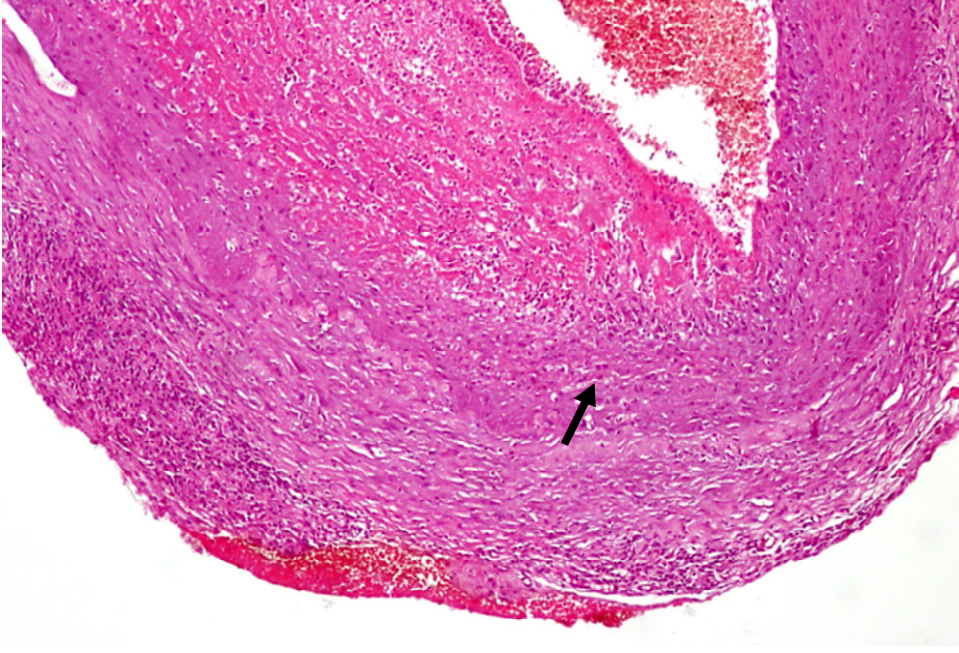
Grafik 5 : Düz kas hücre artışının gruplara göre değerlendirilmesi



Resim IIIa - Grup 1 (statin): İntimal düz kas hücre artışı izlenmemekte
(Hemotoksilen Eozin boyama, X100, Olympus DP2-BSW)

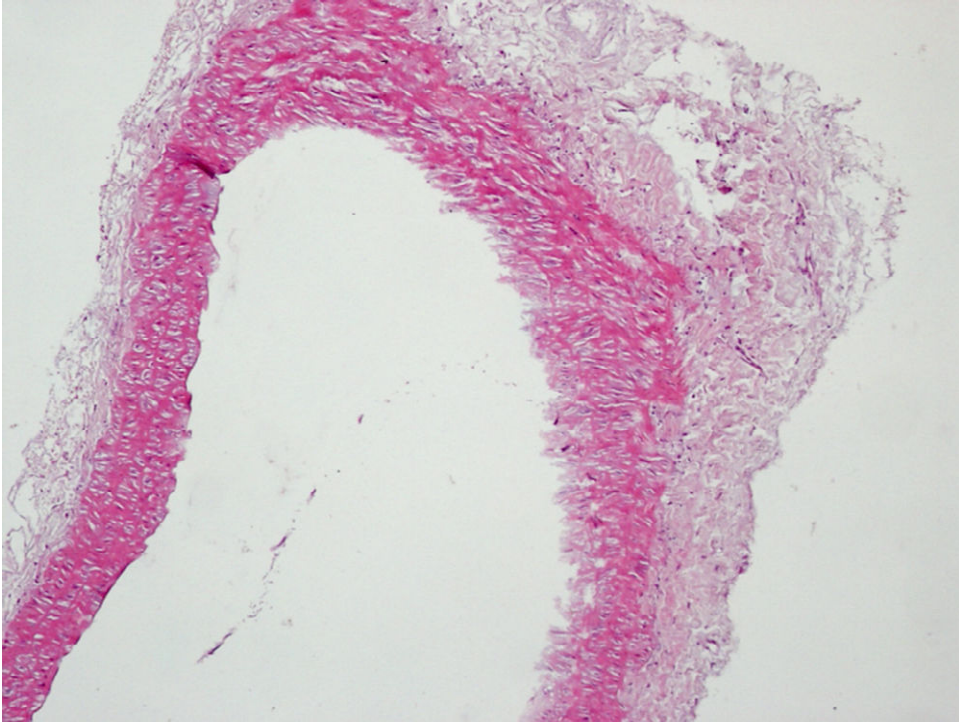


Resim IIIb - Grup 2 (çözücü): İntimal düz kas hücre artışı
(Hemotoksilen Eozin boyama, X100, Olympus DP2-BSW)



Resim IIIc - Grup 3 (izotonik): İntimal düz kas hücre artışı

(Verhoff von Gieson boyama, X100, Olympus DP2-BSW)



Resim III d - Grup 4 (kontrol): İntimal düz kas hücre artışı görülmemekte

(Hemotoksilen Eozin boyama, X40, Olympus DP2-BSW)

Tartışma:

Bu çalışmada ortaya çıkan en belirgin özellik intimal hasarlanmaya karşı olan hiperplazi cevabının atorvastatin tarafından inhibe edilmesidir. İntimal hasarlanmayı takiben ortaya çıkan histopatolojik değişiklikler (tablo 2,3) atorvastatinin hipokolesterolemik, antiplatelet ve sitokin salınım ve dağılımını baskılama etkileri ile birlikte intimal düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonu inhibe edilmiştir. Ayrıca atorvastatinin rat LDL ve total kolesterol düzeylerini çözücü, plasebo ve kontrol gruplarına göre anlamlı derecede düşürdüğü tespit edildi.(Tablo 5, 7)

Yüksek kolesterol, LDL ve bunlarla birlikte ortaya çıkan oksidan maddelerin intima üzerindeki etkileri ve gerek intimal hiperplazi ve gerekse de aterogenezde oynadıkları rol ortaya çıkarılmıştır.[46,47,48] Serum C-reaktif proteini (CRP), enflamasyonun önemli belirteçlerinden biri olmasının yanında kardiovasküler hastalıklarda mortalite ve morbidite ile serum düzeyi korelasyon göstermektedir.[49] CRP intimal hiperplazi oluşumunda da bir belirteçtir.[50] Atorvastatinin tüm bu süreçlerde antienflamatuar etkisi ile intimal hiperplazi, aterogenez gelişimini baskılamaktadır ve bu antienflamatuar özelliği de CRP düzeyindeki gerileme ile izlenebilmektedir.[51] Shelly ve ark.'nin statin tedavisine ek olarak klopidogrel tedavisi de eklemiştir ve bu kombine tedavinin intimal hiperplazi üzerinde baskılayıcı etkisinin daha yüksek olmasını beklemiştir. Buna rağmen araştırma sonuçlarında yalnızca Statin verilen grupta statin+klopidogrel verilen grup arasında anlamlı bir fark tespit etmemişlerdir.[44] Bununla birlikte Vasilios G ve ark.'nin yaptığı bir çalışmada ise atorvastatin ve asetil salisilik asitin (ASA) kombine etkisi ve her bir etken maddenin yalnız başına etkisi araştırılmıştır. Kombine etkileri yüksek olmakla birlikte atorvastatinin yalnız başına olan etkisi de oldukça yüksek bulunmuştur. [45] Bu bulgular da atorvastatinin

antiplatelet etkisinin diğer antiplateletlerden bağımsız olarak ortaya çıktığını göstermektedir.

İntimal hiperplazinin temel faktör ve yapıtaşlarından biri de düz kas hücre proliferasyonudur (tablo 2). Bu süreci ise plateletler, hasarlanan intima tabakasından salınan sitokinler ve/veya okside ajanlar (okside LDL gibi) çeşitli mediatörler aracılığı ile gerçekleştirmektedir.[28,30,33,34] İndolfi C ve ark.'nin yaptıkları bir çalışma ile sitokinlerin in vitro düz kas hücre kültürü üzerine olan etkisi araştırılmıştır.[52] İn vitro hazırlanan hücre kültüründe statinin düz kas hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu engellediği gösterilmiştir.

Bizim çalışmamızda da düz kas hücre artışı statin uygulanan grupta oldukça düşük olarak izlenmekte ve diğer iki grupla (çözücü ve izotonik uygulanan gruplar) anlamlı fark oluşturmaktadır.(p 0.026, p 0.041) Düz kas hücre artışı derecelendirmesi yapıldığında ise Grup 1'de hücre artışı hafif düzeyde ve % 13 olarak izlenmektedir. (Tablo 12)

Gruplar intima media oranı yönlerinden karşılaştırıldıklarında ise Grup 1 ve 4'ün anlamlı derecede Grup 2 ve 3'ten farklılık gösterdiği saptanmaktadır. Aynı zamanda Grup 1 ile Grup 4 kendi aralarında karşılaştırıldıklarında ise istatistiksel olarak fark göstermedikleri izlendi. (Tablo 9) Bu da intimada oluşturulan endotel hasarının atorvastatin uygulanması ile birlikte sınırlandırıldığı ve reorganize edildiğinin göstergesi olmuştur.

Arteriel luminal daralma oranı sonuçlarında ise arteriotomi yapılmayan ve herhangi bir madde verilmeyen 4.grubun (0.05-/+0.09) istatistiksel olarak farklı grubu oluşturduğunu görmekteyiz. Statin uygulanan Grup 1 (0.33-/+0.35) ise Grup 2 (1.8-/+2.1) ve Grup 3'ten (1.25-7+0.92) (Tablo 11) farklı olmakla birlikte istatistiksel hesaplarda anlamlı

fark oluşturmadığı görüldü. Grup1'deki standard sapmanın çok geniş bir aralığı kapsamasının ve Grup 4'ün ise arteriel yapısının tamamen normal olmasının bu sonucu ortaya çıkardığını düşünmekteyiz. Bununla birlikte statinlerin luminal daralma üzerine olan etkisinin anlamlı fark gösterecek derecede olduğu tespit edilemedi. Ancak statinlerin intimal hiperplazi ve olası etkileri üzerine yapılan diğer çalışmalarda luminal daralma üzerine statinlerin anlamlı derecede etkisinin olduğu gösterilmiştir. [44,53]

Sonuç:

Vasküler hasarlanma sonucu ortaya çıkan intimal hiperplazi arteriel oklüzyon, restenoz veya greft kullanılmış ise greft oklüzyonuna sebep olabilmektedir. Bu da klinikte perkütan veya açık vasküler girişim uygulanmış hastalar için ciddi bir risk faktörü oluşturmaktadır. Statinlerin antienflamatuar, antiplatelet, antioksidan etkileri sonucu normal düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonu sınırlanmakta ve arteriel yeniden yapılanma oluşmaktadır.

Çalışmamızda atorvastatinin intimal hiperplazi gelişim parametreleri (intima media oranı, luminal daralma oranı, düz kas hücre artışı) yönünden karşılaştırıldığı hayvan modeli oluşturuldu. Bu modelde atorvastatinin kontrol gruplarına göre intimal hiperplaziyi sınırladığı, baskıladığı ve arteriel yeniden yapılanmaya olumlu katkıda bulunduğu tespit edildi.

Kaynaklar:

- 1-Davis C, Fischer J, Ley K, et al: The role of inflammation in vascular injury and repair. *J Thromb Haemost* 1:1699-1709, 2003.
- 2-Mason JC: Statins and their role in vascular protection. *Clin Sci* 105:251-266, 2003.
- 3-Sowers JR: Effects of statins on the vasculature: Implications for aggressive lipid management in the cardiovascular metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 91(suppl):14B-22B, 2003.
- 4-Coelho-Filho OR, De Luca IM, Tanus-Santos JE, et al: Pravastatin reduces myocardial lesions induced by acute inhibition of nitric oxide biosynthesis in normocholesterolemic rats. *Int J Cardiol* 79:215-221, 2001.
- 5-Mason RP. Direct antioksidan effects of atorvastatin and active metabolite : A comparative analysis. *Circulation* I-541,1999.
- 6-Christina Norela, Charles H. Hennekens: Hypothesis: Atorvastatin Has Pleiotropic Effects that Translate into Early Clinical Benefits on Cardiovascular Disease. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, Vol 9, No.1, 61-63, 2004.
- 7-Bysiani Chandrasekar, Srinivas Mummidi, Lenin Mahimainathan, et al: Interleukin-18-induced Human Coronary Artery Smooth Muscle Cell Migration Is Dependent on NF-Kb-and AP-1-mediated Matrix Metalloproteinase-9 Expression and Is Inhibited by Atorvastatin. *J Biol Chem*. Vol 281, Issue 22, 15099-15109, June 2, 2006.
- 8- Cortan RS, Kramar V, Robbins SL. *Pathologic Basis of Disease*. Philedelphia, WB Saunders Company, 1989, p553-604.
- 9-Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: An update. *N Engl J Med* 314: 488-500,1986.

- 10-Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM: Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I: Smooth muscle cell growth in the absence of endothelium. *Lab Invest* 49:327-333, 1983.
- 11-Clowes AW, Schwartz SM: Significance of quiescent smooth muscle cell migration in the injured rat carotid artery. *Circ Res* 56:139-145, 1985.
- 12-Hanke H, Strochsneider T, Oberhoff M, et al. Time course of smooth muscle cell proliferation in the intima and media of arteries following experimental angioplasty. *Circ Res* 67:651-659, 1990.
- 13- *Vascular Surgery* / [Edited by Robert B. Rutherford – 6th edition, p.150. ISBN 0-7216-0299-1 Copyright 2005 by Elsevier, Inc 0-7216-0299-1 Copyright 2005 by Elsevier, Inc.
- 14-MA PT, Gil G, Sudhof TC et al. Mevinolinan inhibitor of cholesterol synthesis, induces mRNA for low density lipoprotein receptors in livers of hamster and rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:8370-4. PMID 3464957.
- 15-Ross R: Mechanism of atherosclerosis – a review. *Adv.Nephrol.*16:79, 1990.(An excellent delineation of atherogenesis with particular emphasis on the response –to-injury hypothesis by its originator.
- 16-Schwartz C.J. et al: Pathophysiology of the atherogenic process. *Am.J.Cardiol.* 64:23G, 1989. (A multi author consideration of the complex events contributing to the development of atheromatous lesions.)
- 17-Furberg, Curt D.(1999). 'Natural Statins and Stroke Risk'. *Circulation* 99: 185-188. Retrieved on 2007-03-04.
- 18-Jones P, Kafonek S, Laurora I, Hunninghake D(1998). Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin and fluvastatin in

patients with hypercholesterolemia (the CURVES study). *Am J Cardiol* 81(5): 582-7
PMID 9514454.

19-Dimmeler S, Haendeler J, Galle J, et al: Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases: A mechanistic clue to the 'response to injury' hypothesis. *Circulation* 95:1760-1763, 1997.

20-Halcox JPJ, Deanfield JE: Beyond the laboratory: Clinical implications for statin pleiotropy. *Circulation* 109:II42-II48, 2004.

21-Chen M, Masaki T, Sawamura T: LOX-1 the receptor for oxidized low density lipoprotein identified from endothelial cells: Implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacol Ther* 95:89-100, 2002.

22-Ohara Y, Peterson te, Sayegh HS, et al: Dietary correction of hypercholesterolemia in the rabbit normalizes endothelial superoxide anion production. *Circulation* 92:898-903, 1995.

23-Reilly MP, Practico D, Delanty N, et al: Increased formation of F2 isoprostanes in hypercholesterolemia. *Circulation* 98:2822-2828, 1998.

24-Yasunari K, Maeda K, Minami M, et al: HMG-CoA reductase inhibitors prevent migration of human coronary smooth muscle cells through suppression of increase in oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:937-942, 2001.

25-Tamura A, Watarebe T, Nasa M: Effects of atorvastatin and pravastatin on malondialdehyde-modified LDL in hypercholesterolemic patients. *Circulation* 103:926-933, 2001.

26-Crisby M, Nordin-Fredrikson G, Shah PK, et al: Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content and cell death in human carotid plaques: Implications for plaque stabilization. *Circulation* 103:926-933, 2001.

- 27-Chen M, Kakutani M, Naruko T, et al: Activation dependent surface expression of LOX-1 in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 282:153-158, 2001.
- 28-Bengtsson T, Greenegard M: Leucocyte activation by collagen-stimulated platelets in whole blood. *Scand J Clin Lab Invest* 62:451-461, 2002.
- 29-Katznelson S, Ramirez A, Perez R, et al: Pravastatin and cyclosporine inhibit platelet-derived growth factor-stimulated vascular smooth muscle cell mitogenesis: An investigation of mechanisms. *Transplant Proc* 30:998-999, 1998.
- 30-Neumann F, Ott I, Marx N, et al: Effect of human recombinant interleukin-6 and interleukin-8 on monocyte procoagulant activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:3399-3405, 1997.
- 31-Omi H, Okayama N, Shimizu M, et al: Statin inhibit high glucose-mediated neutrophil-endothelial cell adhesion through decreasing surface expression of endothelial adhesion molecules by stimulating production of endothelial nitric oxide. *Microvasc Res* 65:118-124, 2003.
- 32-Teng X, Zhang H, Snead C, et al: Molecular mechanism of iNOS by IL-1-beta and IFN gamma in rat aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C144-C152, 2002.
- 33-Wierzbicki AS, Poston R, Ferro A: The lipid and non-lipid effects of statins. *Pharmacol Ther* 99:95-112, 2003.
- 34-Takahashi M, Takahashi S, Shimpo M, et al: Beta very low density lipoprotein enhances inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 162:307-313, 2002.
- 35-Lin SJ, Yen Ht, Chen YH, et al: Expression of interleukin-1-beta and interleukin-1 receptor antagonist in oxLDL-treated human aortic smooth muscle cells and in the

neointima of cholesterol-fed endothelial-denuded rabbits. *J Cell Biochem* 88:836-847, 2003.

36-Ito T, Ikeda U, Shimpo M, et al: HMG-CoA Reductase inhibitors reduce interleukin-6 synthesis in human vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular Drugs Ther* 16:121-126, 2002.

37-Asakage M, Tsuno NH, Kitayama J, et al: HMG-CoA reductase inhibitor inhibits endothelial cell proliferation dependent on G1 cell cycle arrest. *Anticancer Drugs* 15:625-632, 2004.

38-Takat M, Urakaze M, Temara R, et al: Pravastatin suppresses interleukin 8 production induced by thrombin in human p44/42 mitogen activated protein kinase. *Br J Pharmacol Sci* 93:87-94, 2003.

39-Hiroshi Masuda, Maritaka Goto, Satoru Tamaoki, et al: Accelerated intimal hyperplasia and increased endogenous inhibitors for NO synthesis in rabbits with alloxan-induced hyperglycemia. *British Journal OF Pharmacology* 126, 211-218, 1999.

40-Southern FN, Fink LM, et al: Hyperhomocysteinemia increases intimal hyperplasia in a rat carotid endarterectomy model. *J Vasc Surg* 28:909-918, 1998.

41-Ross R. (1999) *Am Heart J.* 138, 419-420.

42-Ross R. (1999) *N. Engl. J. Med.* 340, 115-126.

43-Libby P. (2002) *Nature* 420, 868-874.

44-Shelly L, Bledsoe MD, John C. Barr, et al: Pravastatin and Clopidogrel Combined Inhibit Intimal Hyperplasia in a Rat Carotid Endarterectomy Model. *Vasc and Endovasc Surg* 40:49-57, 2006.

45-Vasilias G, Athyros Dimitri P, Mikhailidis, Athanasios A, Parageorgiou et al: Effect of statins and aspirin alone and in combination on clinical outcome in dyslipidemic

patients with coronary heart disease. A subgroup analysis of the GREACE study. *Platelet* 16:65-71, 2005.

46-Padurari I, Hurjui I, Filimon O, et al: Recent data about the LDL-atherogenesis relationship. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2001 Jan-Mar;105(1):31-6.

47-Iuliano L. The oxidant stress hypothesis of atherogenesis. *Lipids*. 2001;36 Suppl : S41-4.

48-Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA, et al: The pathogenesis of atherosclerosis:an overview. *Clin Cardiol*. 1991 Feb; 14 (2 Suppl 1) : I1-16.

49-Che-Yi Chou, Huey-Linang Kuo, Ya-Fei Young, et al: C-reactive protein predicts vascular access thrombosis in hemodialysis patients. *Blood Purif* 2006, 24:342-346.

50-De Graaf R, Rammers R, Vainas T, et al: Detection of cell-cycle regulators in failed arteriovenous fistulas for hemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:814-818.

51-W.F.Riesen, H.Engler, M.Risch et al:Short term effects of atorvastatin on C-reactive protein. *European Heart Journal* Volume 23, Number 10,794-799.

52-Indolfi C. Cioppa A, Stabile E, et al: Effects of HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin on smooth muscle cell proliferation in vitro and neointimal formation in vivo after vascular injury. *J Am Coll Cardiol*, 2002 Jan; 35(1): 214-21.

53-Michael K. Barron, MD; R. Scott Lake, BS; Andrew J. Buda, MD; et al: Intimal hyperplasia after balloon injury is attenuated by blocking selectins. *Circulation*. 1997; 96; 3587-3592