

İçindekiler

Sayfa No

ÖNSÖZ

ÖZET

SUMMARY

İÇİNDEKİLER

RESİMLER DİZİNİ

KISALTMALAR DİZİNİ

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Menopoz	3
2.1.1 Menopoz ve Kardiovasküler Hastalıklar	4
2.2 Ateroskleroz	5
2.3 Östrojen ve Ateroskleroz	5
2.3.1 Östrojenin Damar Yatağına Etkileri	11
2.3.2 Östrojen Reseptörleri	11
2.3.3 Damar Duvarında Östrojen Reseptörleri	12
2.3.4 Östrojenin Endotele Etkileri	13
2.3.5 Östrojenin Damar Düz Kas Hücrelerine Etkisi	14
2.3.6 Östrojenin Endotel Hücrelerine Etkisi	15
2.3.7 Endotelden Bağımsız Vazodilatasyon	15
2.3.8 Lipoprotein Oksidasyonunun Engellenmesi	15
2.4 Nitrik Oksit ve Ateroskleroz	16
2.5 Endotelin-1 ve Ateroskleroz	19
2.6 Monosit Kemotaktik Protein-1 ve Ateroskleroz	20
2.7 Tümör Nekrosis Faktör ve Ateroskleroz	21
2.8 Selektif Östrojen Reseptör Modülatörleri- Raloksifen	24
2.9 HMG-KoA Redüktaz inhibitörleri(Statinler)	28
2.9.1 Pleotrofik Etkiler	29
3. MATERYAL METOD	32
3.1 Deneysel Gereç ve Yöntem	32
3.1.1 Deney Hayvanları	32
3.2 Işık Mikroskopik Gereç ve Yöntemi	33

	<u>Sayfa No</u>
3.3 İndirek İmmünohistokimya Yöntemi	35
4. BULGULAR	37
4.1 Histokimyasal Bulgular	37
4.2 İmmunohistokimyasal Bulgular	37
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ	51
7. RESİMLER	52
8. KAYNAKLAR	60

Resimler Dizini

Sayfa No

Resim1a:HE ile boyanmış kontrol grubu	52
Resim1b:HE ile boyanmış Atorvastatin grubu	52
Resim1c:HE ile boyanmış Raloksifen grubu	52
Resim1d:HE ile boyanmış Atorvastatin-Raloksifen grubu	52
Resim2a:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış ER α kontrol grubu	53
Resim2b:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış ER α Atorvastatin grubu	53
Resim2c:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış ER α Raloksifen grubu	53
Resim2d:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış ER α Raloksifen-Atorvastatin grubu	53
Resim3a:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış ER β kontrol grubu	54
Resim3b:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış ER β Atorvastatin grubu	54
Resim3c:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış ER β Raloksifen grubu	54
Resim3d:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış ER β Raloksifen-Atorvastatin grubu	54
Resim4a:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış iNOS kontrol grubu	55
Resim4b:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış iNOS Atorvastatin grubu	55
Resim4c:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış iNOS Raloksifen grubu	55
Resim4d:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış iNOS Raloksifen-Atorvastatin grubu	55
Resim5a:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış eNOS kontrol grubu	56
Resim5b:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış eNOS Atorvastatin grubu	56
Resim5c:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış eNOS Raloksifen grubu	56
Resim5d:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış eNOS Raloksifen-Atorvastatin grubu	56
Resim6a:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış TNF α kontrol grubu	57
Resim6b:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış TNF α Atorvastatin grubu	57
Resim6c:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış TNF α Raloksifen grubu	57
Resim6d:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış TNF α Raloksifen-Atorvastatin grubu	57
Resim7a:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış ET-1 kontrol grubu	58
Resim7b:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış ET-1 Atorvastatin grubu	58
Resim7c:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış ET-1 Raloksifen grubu	58
Resim7d:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış ET-1 Raloksifen-Atorvastatin grubu	58
Resim8a:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış MCP-1 kontrol grubu	59
Resim8b:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış MCP-1 Atorvastatin grubu	59
Resim8c:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış MCP-1 Raloksifen grubu	59
Resim8d:İmmünohistokimyasal olarak boyanmış MCP-1Raloksifen-Atorvastatin grubu	59

Kısaltmalar Dizini

- KVH: Kardiyovasküler hastalıklar
KKH: Konjestif kalp hastalığı
LDL: Düşük dansiteli lipoprotein
VLDL: Çok düşük dansiteli lipoprotein
HDL: Yüksek dansiteli lipoprotein
ICAM-1: İntersellüler adezyon molekülü-1
VCAM-1: Vasküler hücre adezyon molekülü-1
MCP-1: Mnosit kemotaktik protein-1
ER α : Östrojen reseptör alfa
ER β : Östrojen reseptör beta
ET-1: Endotelin-1
ERE: Östrojen responsive element
TAF-1:Transkripsiyon Aktivatör Fonksiyonu-1
TAF-2: Transkripsiyon Aktivatör Fonksiyonu-2
PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
CEE : Konjuge equin östrojen
NO: Nitrik oksit
i-NOS: İndüklenen nitrik oksit sentetaz
e-NOS: Endotelyal nitrik oksit sentetaz
nNOS : Nöronal nitrik oksit sentetaz
EDRF: Endotel kaynaklı relaksasyon faktörü
TNF: Tümör nekrozis faktör
SERM: Selektif Östrojen Reseptör Modulatörleri
HMG-KoA: 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A
hs-CRP: Yüksek sensitif C-reaktif proteini
TXA2: Tomboksan A2
COX-2: Siklooksijenaz-2

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH) batı ülkelerinde 50 yaş üzerindeki kadınlarda birinci ölüm nedenidir (1). Türkiye nüfusunun yaklaşık %15–20 si bu riskli yaş dönemini oluşturmaktadır (2). ABD de kardiyovasküler hastalık nedeniyle her yıl 500000 kadın ölmektedir.

Premenopoz döneminde KVH mortalitesi erkeklere oranla 1/5 'iken, menopoz sonrasında giderek artar ve erkek KVH mortalitesine yaklaşır (3). Bu etki östrojenin KVH riskini azaltmasından kaynaklanmaktadır. Yapılan çalışmalarda kardiyovasküler hastalığı olan postmenopozal hastalarda KVH riskini azaltmak için hormon replasman tedavisinin kullanılmayacağı bulunmuş olmasına karşın östrojenin yalnız başına olumlu kardiyovasküler etkileri yadsınamaz (4,5). Raloksifenin içinde bulunduğu selektif östrojen reseptör modulatorleri progesteronla karşılanmasına gerek kalmaksızın kardiyovasküler hastalıklı postmenopozal kadınlarda KVH riskini önemli ölçüde azaltmıştır(6). Östrojenin ve de raloksifenin bu etkisini hangi mekanizmalar vasıtasıyla gerçekleştirdiği halen araştırılmaktadır.

Aterosklerozun patofizyolojisi daha iyi anlaşıldıkça sadece basit bir lipit depo hastalığı olmadığı kanaatine varılmıştır. İnflamasyon, endotelial disfonksiyon, plak instabilitesi, tromboz, düz kas proliferasyonu aterosklerozun gelişim ve ilerlemesinde önemli rol oynar (7).

Östrojenin önemli endotelial olaylarda rol aldığı bilinmektedir. Vazodilatör ve antitrombotik etkileri nitrik oksit (NO) ve prostosiklin üretimini artırması sayesinde gelişir. Endotelde (Düşük dansiteli lipoprotein) LDL'nin oksidasyonunu engeller ve okside olmuş LDL nin endotele olan toksik etkisini azaltır(8). NO Birçok endovasküler işlemi düzenleyerek aterosklerotik sürecin oluşumunu yavaşlatır. Ayrıca aterosklerozda monosit ve makrofajlar da önemli rol oynar (9). Tüm bunlar aterosklerozun kronik inflamatuvar hastalık kabul edilmesini sağlamıştır (10).

HMG-KoA Redüktaz İnhibitörleri (Statinler) hipolipidemik ajan olarak LDL kolesterol düşürülmesinden bağımsız olarak birçok organ sistemini ve metabolik yolu etkileyerek birçok hastalığı olumlu yönde etkiler (7). Postmenopozal kardiyovasküler

hastalıklı pek çok kadında yaygın kullanılmaktadır. Ateroskleroza etkileri hala araştırılmaktadır.

Çalışmanın Amacı; postmenopozal dönemde ateroskleroz gelişiminde raloksifen gibi selektif östrojen reseptör modülatörü bir ilacı ve statin gibi bir hipolipidemik bir ilacı karşılaştırmaktır. Yaygın kullanımı olan bu iki ilacın postmenopozal dönemde kullanımlarında hormon replasman tedavisine olan yakınlık ve üstünlüklerine yol göstermek. Ratlarda bu iki ilacın birlikte çalışıldığı bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 MENOPOZ

Klimakterium, kadın hayatında klinik, metabolik ve psikoseksüel özellikleri ile ayrı bir yer tutan, cinsel olgunluk çağından üreme fonksiyonlarının son bulunduğu yıllara bir geçiş dönemidir. Menopoz ise klimakterium içinde bir kilometre taşıdır. Kelime anlamı, son menstrual siklustur. Dünya Sağlık Örgütü tarafında ovaryum aktivitesinin yitilmesi sonucunda menstruasyonun kalıcı olarak sonlanması olarak tanımlanır ancak kadın hayatında yeni bir dönemin de başlangıcıdır (11). Menopoz aslında retrospektif olarak tanımlanan bir kavramdır. Eğer bu dönemdeki kadın bir yıl süreyle adet görmemişse, gördüğü son adete menopoz denilir ve kadın menopoza girmiş kabul edilir. Bu andan sonraki senilyum sınırı olarak kabul edilen 64 yaşa kadar geçen döneme postmenopoz, önceki döneme premenopoz adı verilir. Yaşayan her kadın için fizyolojik olmasına karşın oluşturacağı sonuçlar açısından patolojik kabul edilebilecek bir süreçtir.

Menopoz yaşı genetik olarak tespit edilir. Irk ve beslenme durumu ile ilişkisi görülmektedir. Menopoz, histerektomi geçirenlerde, vücut yağ kitlesinin östrojen üretimindeki rolü nedeniyle zayıf kadınlarda, sigara içenlerde, doğum yapmamış kadınlarda daha erken görülür (12,13). Yurdumuzda menopoz yaşı için çeşitli kliniklerden bildirilen rakamlar 45-49 arasında değişmekte, ortalama olarak 47 yaş kabul edilmektedir (14).

Son yıllarda klimakteriyum ve postmenopozal döneme artan ilginin başlıca sebebi ortalama yaşam süresindeki ve hayat standartlarındaki artıştır. Yaşam beklentisindeki artışla birlikte bir kadın artık yaşamının üçte birini bu dönüşüm sonrası geçirmektedir. Bu nedenle menopoz, günümüzde gerçek bir sağlık problemi olarak kabul edilmektedir. İnsanlığın ilk gününden bu yana olan teknolojik gelişmenin %90'ı son yüzyılda gerçekleşmiştir. Bu inanılmaz hızlı gelişme yaşam kalitesi ve yaşam süresini arttırarak dünya yaşlı nüfusunun çoğalmasına yol açmıştır. MÖ 1000 yılında 18 olarak bilinen kadın yaşı bugün, 80'nin ötesine uzanmıştır. Bu nedenle 2000'li yıllarda da pre- ve postmenopozal dönem ve beraberindeki hastalıklar en önemli sağlık problemi olarak karşımıza çıkmıştır (15).

Klimakterik dönemde iki nedene bağlı organ ve sistem değişiklikleri olmaktadır. Birincisi, yaşlanmaya bağlı morfolojik değişiklikler, ikincisi ise overlerdeki östrojen eksikliğine bağlı genital ve ekstra genital değişikliklerdir. Bunların içinde en önemli yeri kardiovasküler sistem ve kemik dokusunda oluşan değişiklikler tutmaktadır.

Menopozla birlikte ve sonrasında, östrojen eksikliğinin farklı organlarda ve doku sistemlerinde etkisiyle bazı semptomlar ortaya çıkmaktadır. Merkezi sinir sisteminde sıcak basması, depresyon, uyku bozuklukları, konsantrasyon bozukluğu; iskelet sisteminde osteoporoz, spontan fraktürler; genital sistemde vajinal atrofi; kardiovasküler sistemde ateroskleroz, koroner kalp hastalıkları bunlardan bazılarıdır (15).

2.1.1 Menopoz ve Kardiovasküler Hastalıklar

Kardiovasküler hastalıklar (KVH), ilk planda daha çok erkeklerin hastalığı olarak görölse de menopoz sonrası dönemde kadınlar için de önemli bir morbidite ve mortalite sebebidir. Artan yaşam beklentisi ile birlikte kadın sayısındaki artış, yaşlı popölasyonun hastalıklarını ön plana almamızı gerektirmektedir.

1900'lerin başında Amerika Birleşik Devletleri'nde her 100 yaşlı kadına 102 erkek yaşlı düşmekte iken bu oran 1980 yılında 100'e 68 olmuştur. 85 yaşına gelindiğinde 100 kadına karşı 40 erkek yaşamaktadır. Kadın ve erkek yaşla birlikte farklı sağlık problemleri ile karşılaşırlar. Seks hormonlarına bağlı olarak kolesterol-lipoprotein profilindeki farklılık, erkeklerde ateroskleroz ve ölümü erken yaşa çeker (8).

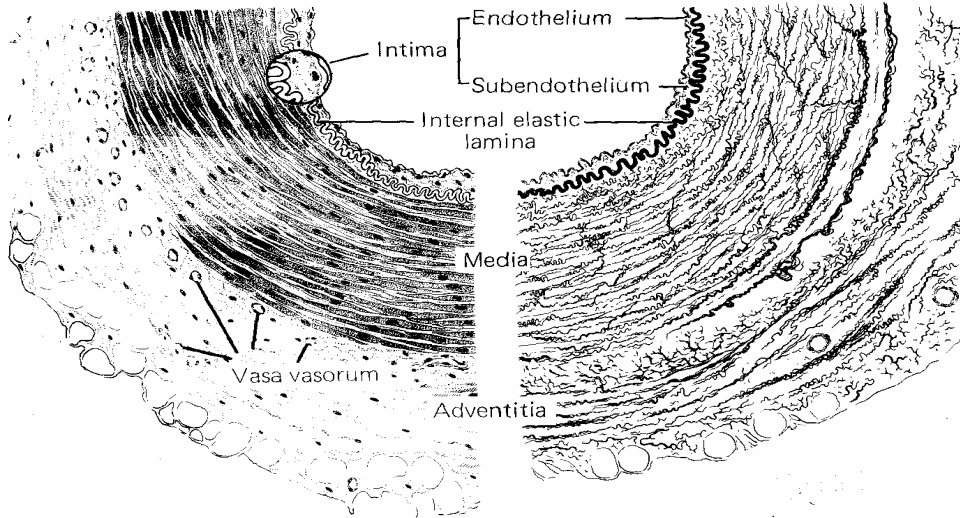
Dünyadaki ölüm nedenlerinin başında iskemik kalp hastalığı gelmektedir. Reprodüktif dönemdeki kadınlar, aynı yaştaki erkeklere oranla 2.5-4.5 kat daha az kardiovasküler hastalık riskine sahip olmakla birlikte, 55 yaşını aşmış bir kadında koroner damar hastalığı görölme sıklığı, 35-45 yaş grubuna göre 10 kat artış gösterir. Böylelikle 50 yaşından itibaren bir kadında yaşam boyunca koroner kalp hastalığına yakalanma ihtimali %46, bu hastalıktan ölüm ihtimali ise %31'e ulaşır (15). ABD'de kardiovasküler hastalıklardan ölüm, bayanlar için tüm kanser tiplerinin sebep olduğu ölümden daha fazlasını oluşurmaktadır (16). Kadınlarda meme kanseri en sık görülen kanserdir. Kıyaslanan 25 kadından 1 tanesi meme kanserinden ölmekteyken,

KVH nedeniyle 2 kadından 1 tanesi ölmektedir (17). Tüm bu veriler bize konunun ne kadar önemli olduğunu ve ciddiyetle ele alınması gerektiğini göstermektedir.

Menopoz, KVH açısından kesin bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Ancak yaş ilerledikçe başka pek çok risk faktörleri de devreye girmektedir. Kadınlar ve erkekler için risk faktörleri aynıdır (kalıtım, yaş, yüksek kan basıncı, sigara, diabetes mellitus, obezite) fakat bu faktörler kontrol altına alınmış bile olsa erkeklerde koroner kalp hastalığı kadınlardan 3.5 kat daha fazladır. Kadınların değişen hayat tarzına rağmen riskleri halen düşüktür. Reprodüktif yıllarda kadınlar koroner kalp hastalıklarından korunurlar. Böylece koroner hastalıklarda erkeklerin 10 yıl gerisinden gelirler. Ancak artan yaşla birlikte bu avantajlı durum giderek azalır ve kardiovasküler hastalıklar ileri yaşlarda her iki cins için de ölüm nedeni olarak ilk sıraya oturur (8).

2.2 ATEROSKLEROZ

Kan damarları başlıca üç katmandan oluşur (Şekil 1). Kapiller ve venüllerde basitleşmesine rağmen bu yapı tüm damar yatağında fizyolojik gerekliliğine göre değişerek korunur (18).



Şekil 1: Damar duvarı yapısı

Tunika İntima; Damar içini döşeyen endotelial hücrelerden oluşmuştur. Bazal laminanın üzerine oturan bu hücreler tek katlıdır. Endotelin altında düz kas hücresi ve gevşek bağ doku içeren subendotel bulunur. Subendotelde bulunan bağ doku ve düz kas hücreleri longitudinal olarak yerleşmişlerdir. Arterlerde intima tabakası media tabakasından internal elastik lamina ile ayrılır. İnternal elastik lamina ışık mikroskopisinde devamlı belirgin bir tabaka olarak görülürken elektron mikroskopunda pencereler içerdiği görülür.

Tunika Media; Helikal olarak yerleşmiş yaklaşık kırk kat düz kas hücrelerinden oluşmuştur. Bu düz kas hücrelerinin arasında çeşitli miktarda elastik lifler, retiküler lifler ve proteoglikanlar bulunur. Bu ekstraselüler matriksin kaynağı yine düz kas hücreleridir. Büyük arterlerde media ve adventisya tabakası arasında ince eksternal elastik lamina bulunur.

Tunika Adventisya: Longitudinal olarak uzanmış kollajen ve elastik liflerden oluşmuştur. Media tabakasından bulunan kollajen tip III iken adventisya tabakasından kollajen Tip I bulunur. Adventisya tabakası genellikle damarın içerisinde bulunduğu dokunun bağ dokusunun devamı şeklinde yer alır (18).

Ateroskleroz, damar duvarında intima altında lipid birikmesi ve buna bağlı gelişen ikincil olaylar sonucunda ateroskleroz plağının oluşması ile karakterize bir arter hastalığıdır.

Aterosklerozun gelişiminde endotel hasarı olsun ya da olmasın bazı gelişim basamakları mevcuttur (9). Bunlar;

1. Düz kas hücrelerinin proliferasyonu
2. Bağ doku matriksinin sentezi
3. Monosit-makrofajların bölgeye birikimi
4. Lenfosit infiltrasyonu
5. İntra ve ekstraselüler lipid birikimi
6. Stenotik plağın oluşumu'dur.

Erken bulgu olarak karşımıza çıkan intima kalınlaşması, intima ve mediada hücreler arası mesafede lipid birikmesi sonucu oluşmaktadır. Damar cidarına göç eden doku

makrofajları biriken lipitleri fagosite ederek köpük hücrelerine dönüşürler (9,19). Bu değişimlerin olduğu bölgelerde bazal membran endotel ve düz kas hücrelerinden ayrılır, böylece intima ile diğer dokular arasındaki bağlantılar bozulur. İntimanın bütünlüğünü kaybettiği alanlarda trombüsler oluşabilmektedir (19). Ayrıca endotel, düz kas hücreleri ve fibroblastlarda mitotik aktivite artarak proliferatif değişiklikler görülür (19,20).

Kardiovasküler hastalıkların çoğunda majör damarlarda ateroskleroz mevcuttur. Aterosklerozun en belirgin tutulum bölgeleri; aorta, karotisler, serebral ve renal arterler gibi sistemik arterlerdir. Bu arterlerin dallanma yerleri ateroskleroz gelişiminin klinik olarak en sık görülen kısımlarıdır.

Kardiovasküler hastalıklar özellikle de ateroskleroz bir çok metabolik değişikliğin bir arada olması sonucu meydana gelir (8). Bu değişiklikler şöyle özetlenebilir;

1. Dolaşımdaki lipid-lipoprotein profilindeki değişiklikler
2. LDL'nin oksidasyonu
3. Nitrik oksit ve prostasiklin üretimine yol açan endotel hasarı ve disfonksiyonu
4. Sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından uyarılan makrofaj migrasyonu ve fonksiyonları
5. Fibröz plağın baskın hücresi olup bağ doku matriksini oluşturan ve büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından uyarılan düz kas hücrelerinin proliferasyonu.
6. Vazokonstriksiyon ve trombojenik olaylar
7. Koroner arterlerde remodelling

Ateroskleroz ve onun arterini bozduğu organların hastalıkları sanayileşmiş ülkelerde en başta gelen ölüm sebebidir. Aterosklerozun en ölümcül yanı konjestif kalp hastalığı (KKH) insidansını ve ona bağlı mortaliteyi arttırmasıdır; gelişmiş ülkelerde yapılan istatistikler, toplam ölümlerin %30- 35 dolayındaki bir bölümünün KKH'ye bağlı olduğunu göstermiştir (15).

Ateroskleroz ve onun en yaygın ve ölümcül sonucu olan koroner kalp hastalığı ile hiperkolesterolemi arasında yakın bir ilişki olduğu birçok epidemiyolojik incelemede saptanmıştır. Plazma trigliserid düzeyi veya trigliseridden zengin lipoprotein türü olan

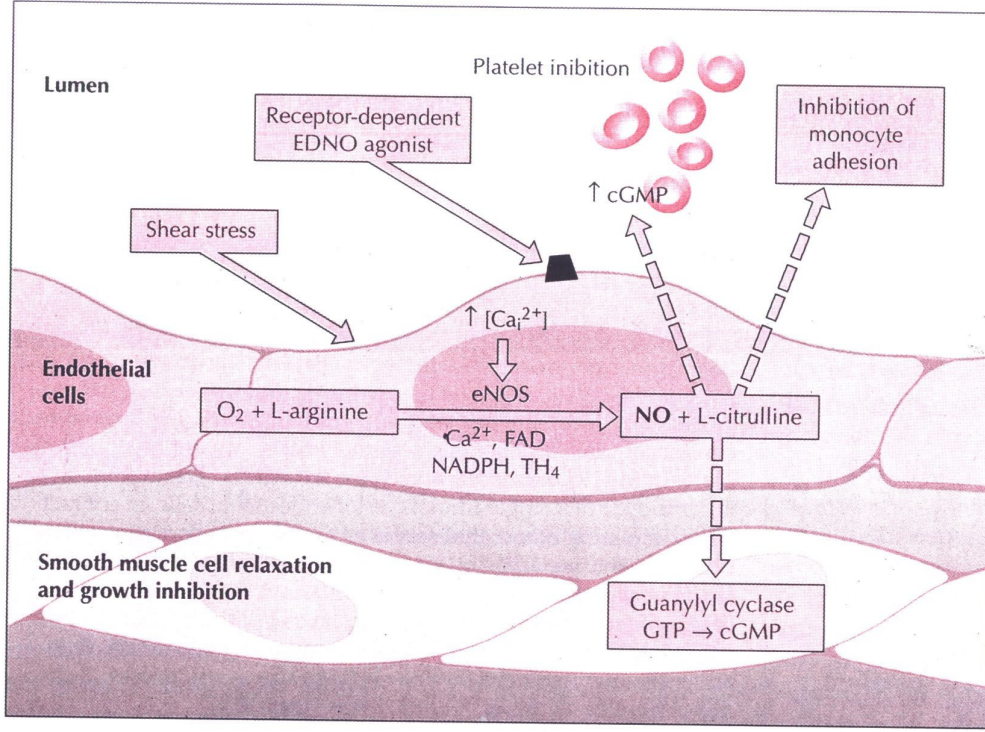
çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) içindeki kolesterol fraksiyonunun yüksekliği ile KKH arasında bağımsız bir ilişki olduğu kesin olarak gösterilmiş değildir ancak KKH meydana gelmesine birçok olguda VLDL kolesterolü dahil total kolesterol düzeyindeki yükselme eşlik eder.

Plazma total kolesterol düzeyi ve onun en büyük ögesi olan düşük dansiteli kolesterol (LDL) ile ateroskleroz arasındaki ilişkiyi gösteren bulgular şunlardır;

1. Ateroskleroza bağlı arter hastalığı olan hastalar kendi yaş gruplarındaki sağlıklı hastalara oranla daha yüksek serum kolesterol düzeyi gösterirler.
2. Serum kolesterol düzeyi yüksek olan toplumlarda ateroskleroz ve onun komplikasyonları daha sık görülür.
3. Deney hayvanlarını kolesterolden zengin diyetle beslemek suretiyle onların arterlerinde aterosklerotik lezyonlar oluşturmak mümkündür.
4. Aterosklerozlularda intima altında toplanan, kolesterolden zengin lipidlerin oluşturdukları aterom plaklarındaki lipid bileşimi, serumdaki lipidlerin bileşimine paralellik gösterir.

Ateroskleroz oluşmasında ilk basamağın endotel disfonksiyonu olduğu bilinmektedir. Normal endotel trombosit ve lökosit adezyonunu, vasospazmı ve düz kas hücre proliferasyonunu engeller, fibrinolizisi başlatır ve böylece antiaterojenik akışkan bir ortam sağlar (9).

Endotelin vasküler tonusu kontrol etmek gibi kritik bir görevi vardır, bunu da vazoaaktif ajanlar salgılayarak temin eder. Prostosiklin, bradikinin, nitrik oksit (NO) gibi vazodilatör, anjiotensin II, prostaglandin H₂ ve endotelin gibi vazokonstriktör maddeler salgılar (Şekil 2) (9).



ŞEKİL 2: Endotelden salınan nitrik oksit sentezi ve etkileri

Aterosklerozda önemi olan inflamatuvar cevapta endotel önemli rol oynamaktadır. Normal fonksiyon gören endotel lökosit adezyonunu, lipid depolanmasını ve düz kas hücre proliferasyonunu engellerken, hasarlanmaya ve çeşitli sitokinlere cevaben aktive olan endotel hücreleri ise intersellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1), vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ve monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1) gibi aterosklerozu uyarıcı bazı faktörler salgılar (9).

Bunun ardından düz kas hücrelerinin mediadan intimaya göç etmeleri, intimada proliferasyona uğramaları ve kandan damar çeperine monositlerin ve makrofajların infiltrasyonu gibi olaylar gelişir. Monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) monositlerin bölgeye toplanmasına yol açar. MCP-1 ve interlökin-8 gibi kemotaktik sitokinler kronik inflamatuvar hücrelerin aterosklerotik alana toplanmasına neden olurlar. MCP-1, makrofaj ve düz kas hücrelerinden salınır (9). Endotel ve düz kas hücreleri, hücreler arası adezyon molekülü (ICAM-1) gibi lökosit adezyon molekülü salgırlar. ICAM-1 aterosklerozlu alana immün sistem hücrelerinin çağrılmasından

ve lezyonlu bölgede lenfosit aktivasyonundan sorumludur (21). Kandan adı geçen hücrelerin hatta T lenfositlerinin infiltrasyonu dikkate alınarak bazı araştırmacılarca aterosklerozun arterlerin kronik inflamatuvar hastalığı olduğu öne sürülmüştür. İnsanlarda yapılan çalışmalarda bu adezyon molekülleri ve ateroskleroz gelişimi arasında ilişki olduğu saptanmıştır (10).

Monosit ve makrofajlar aterosklerotik sürecin tüm aşamalarında önemli rol oynarlar. Monositler vasküler endotelial yüzeye yapışarak erken lezyonların gelişiminde rol alırlar ve bu bariyeri geçerek subendotelial boşluğa ulaşırlar. Bu hücreler ayrıca takip eden basamaklarda da rol oynar, lipid laden makrofajların gelişiminde ve ekstraselüler matriksin serbest bırakılmasında görev alırlar. Son olarak daha matür plakların gelişiminde ve aterom plağının yeniden şekillenmesinde de önemli rolleri vardır (9).

Makrofajlar damar çeperinde kolesterol ile kaplanarak köpük hücreleri haline gelir. NO'nun fizyolojik koşullarda damar çeperinde mitojenez üzerinde ve bu arada çoğalması aktive edilmiş düz kas hücreleri üzerinde inhibitör etkisi vardır. Mediadan intimaya düz kas hücresi göçü ve orada proliferasyona uğraması, anjioplastiden sonra bypass greftlerinin tıkanmasına yol açarak restenoza ve vasküler girişimlerin başarısızlığına neden olabilir (22). Endotel disfonksiyonu geliştirmeye bazı hastaların daha yatkın olduğu sanılmaktadır. Tam gelişmiş bir aterosklerozun tipik göstergesi olan aterom plakları, intimada, esas olarak köpük hücreleri ile infiltre olmuş ve proliferasyona uğramış düz kas hücrelerinden ibarettir. Plakların üzerini örten endotelde çok önceden başlamış olan disfonksiyon nedeniyle, antitrombotik ve vazodilatör etkili iki endotel kaynaklı lokal hormon olan nitrik oksit (NO) ve prostasiklinin üretimi ve saliverilmesi azalmıştır (9) .

Östrojen tedavisi hem sağlıklı hem de koroner hastalığı bulunan postmenopozal kadınlarda adezyon moleküllerinin seviyesini azaltmıştır ancak aynı etki statin kullanımı ile gözlenmemiştir (23). Raloksifen ise insan endotelial hücre kültürü ile yapılan çalışmalarda postmenopozal dönemde E-selectin ve ICAM-1 seviyelerini azaltmış ancak VCAM-1 seviyelerini azaltamamıştır.

2.3 ÖSTROJEN VE ATEROSKLEROZ

2.3.1 Östrojenin Damar Yatağına Etkileri

Epidemiyolojik çalışmalar göstermiştir ki koroner arter hastalıklarının insidansı premenopozal dönemde ki kadınlarda aynı yaştaki erkeklere kıyasla daha azdır. Ancak postmenopozal dönemde yaştaş erkek ve kadında koroner arter hastalığına bağlı mortalite eşittir (24) . Östrojenin kardioprotektif yönünü araştırmak için birçok çalışma yapılmıştır. Östrojen serum LDL seviyesini düşürürken yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) düzeyini yükseltir. Ancak östrojenin lipid profili üzerine olan bu etkisi kardioprotektif etkisinin sadece %30'unu oluşturmaktadır (25). Bu etkinin yanı sıra östrojenin önemli endotelial olaylarda rol aldığı bilinmektedir. Vazodilatör ve antitrombotik etkileri NO ve prostosiklin üretimini artırması sayesinde gelişir. Endotelde LDL'nin oksidasyonunu engeller ve okside olmuş LDL'nin endotele olan toksik etkisini azaltır (8) .

2.3.2 Östrojen Reseptörleri

İki tane östrojen reseptörü bulunmaktadır; Östrojen reseptör alfa ($ER\alpha$) ve östrojen reseptör beta ($ER\beta$). Alfa reseptörü 1960 yılında keşfedilmiş, amino asit dizilimi 1986 yılında tam olarak yapılabilmıştır (26). Altıncı kromozomun uzun kolundan kodlanır. Yarı ömrü yaklaşık 4-7 saattir. Beta reseptörü ise ratlarda 1996 (27), insanlarda 1996 ve 1998 (27) de izole edilmiştir. 14,q22-q24 kromozomundan kodlanır (26). Östrojen reseptörü spesifik olarak östrojenle bağlanarak östrojen responsive element (ERE) aracılığıyla gen transkripsiyonunu regüle eder. Östrojen reseptörleri 5 domainde 6 bölgeye ayrılır; A-F. $ER\beta$ DNA bağlayıcı domainde $ER\alpha$ ile %97 oranında , hormon bağlayıcı domainde ise %59 oranında aynı aminoasit sekansına sahiptir. Her iki reseptörün hormon bağlama karakteristikleri benzerlik göstermekle birlikte örneğin, fitoöstrojenler $ER\beta$ 'ya $ER\alpha$ 'dan daha yüksek afinite gösterirler. Sadece bağlanma farklılıkları nedeniyle değil aynı zamanda konformasyonel şekil ve hücresel etkinlik nedeni ile de farklı genetik mesajlara yol açabilirler. Ayrıca $ER\beta$ düzenleyici domainde Transkripsiyon Aktivatör Fonksiyonu-1 (TAF-1)'e sahip olmadığından gen transkripsiyonunda farklılıklar oluşur (26). Biyolojik aktivitelerinin farklı olmasının sebepleri şöyle özetlenebilir;

1. Reseptörün hormon bağlayan domainine karşı hormonun afinitesi
2. Farklı dokularda farklı reseptör subtiplerinin baskın olması
3. Dimerizasyon ve adaptör proteinlerin düzenlenmesi gibi iki önemli görevde etkisi olan ligand-reseptör konformasyonel şekil değişikliği
4. Dokuda adaptör protein ekspresyonunda ve fosforilasyonda farklılıklar

Farklı dokularda farklı reseptörler bulunmaktadır. Erkek ve dişi farelerde üretilmiş alfa reseptörü olmayan genetik tipin her iki cins için de kısır olduğu izlenmiştir (26). Alfa reseptörü olmayan dişi farede ovulasyon gözlenmemiş, overler gonadotropılara cevap vermemiştir. Memede bez dokusu ve alveolar yapı gelişmemiştir. Seksüel davranışlarında eksiklik saptanmıştır. Buna karşın fetal adrenalde de ER β daha baskın olarak üretilmektedir (26). Beyinde bazı bölgelerde ve kardiovasküler sistemde baskın olan ER β 'dir. İnsan granülosa hücrelerinde sadece ER β mRNA'sı, meme dokusunda hem alfa hem de beta reseptörü bulunmaktadır (26). İnsan umbilikal ven hücre kültüründe endotelial hücrelerde sadece ER β üretilmiştir, ER α bulunmamaktadır (8).

Östrojen reseptörleri ve uyarıcıları için sonuçlar gerçekten karmaşıktır. Östradiol ER α ve belli bir ERE alanı ile gen transkripsiyonunu uyarmakta iken, ER β ile aynı alanda transkripsiyonu engeller. Böyle olunca östrojen tipi, reseptör tipi ve hedeflenen response element kombinasyonu ile farklı ve özgül mesajlar ortaya çıkar. Ayrıca ER α ve ER β arasındaki farklılıklar TAF-1 ve TAF-2 aktivasyonu nedeniyle de farklılık gösterir. Selektif östrojen reseptör modulatorü gibi agonizm ve antagonizm etkisi olan uyarıcılar ER α ile TAF-1 aracılığıyla agonist etki ederken ER β ile tam antagonist etki oluşturabilirler. ER α ve ER β hücre içindeki koaktivatör ve korepresör gibi peptidlerin yapısını ve miktarını da farklı düzenler (26).

2.3.3 Damar Duvarında Östrojen Reseptörleri

Endotelde ve damar düz kasında seks steroidleri için reseptörler bulunur (28). Koroner arterlerde ateroskleroza olan premenopozal kadınların koroner arterlerindeki düşük seviyedeki östrojen reseptörleri ile ateroskleroza olmayan damar duvarında

bulunan östrojen reseptörleri arasındaki farklılıklar, aterosklerozun gelişiminde östrojen reseptör ekspresyonunun etkili olabileceğini düşündürmüştür (29).

2.3.4 Östrojenin Endotele Etkileri

Oksijen, sitokinler, hormonlar gibi kandan kaynaklanan maddeler, basınç gibi mekanik güçler nedeni ile endotel koagülasyona, lökositlerin adezyon ve migrasyonuna, endotel düz kas hücrelerinin proliferasyonuna neden olan bazı lokal faktörler salgılar (30). Östrojen endotel hücrelerinin adezyon, migrasyon ve proliferasyonunu artırır (31). Böylece hasarlanmış damarda hızla yenilenen endotel hücrelerinden antiinflamatuvar ve antiproliferatif sitokinler salınmaya devam eder ve düz kas hücrelerinin hasarlanmadan en az etkilenmesi sağlanır.

Endotelden salgılanan birçok faktör vardır; serbest radikaller (NO ve süperoksit), araşididik asit metabolitleri (prostosiklin, tromboksan A2) peptidler (endotelin, anjiotensin, natriüretik peptidler) gibi. Tüm bu faktörlerin birçok etkisi mevcuttur. Örneğin, NO düz kasların kontraksiyonunu ve proliferasyonunu engellerken endotelin, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) düz kaslarda kontraksiyona ve proliferasyona yol açar (32,33). Bu faktörler arasındaki vazodilatör/ antimitojenik, promitojenik/vazokonstriktör dengenin seks steroid hormonları tarafından dengelenmesi koroner arter hastalıkları gibi damar yatağı proliferasyonu ile seyreden hastalıklarda önem kazanır.

Östrojen ooferektomize hayvanlarda ve menopozdaki kadınlarda endotelden salınan damar gevşetici faktörlerin salınımını artırır (34). Muskarinik reseptörler veya direkt etki ile endotel hücrelerinden NO üretim ve salınımını artırır (35). Yapılan çalışmalarda aortadan bazal NO salınımının erkek hayvanlara kıyasla dişi hayvanlarda daha fazla olduğu görülmüştür (36). Kadınlarda östrojenin artan seviyesiyle paralel olarak serumda nitrik oksidin okside ürünlerinin miktarında da artış saptanmaktadır (36). Ayrıca östrojen damar düz kas hücrelerinin NO'ya duyarlılığını artırır (37). Lipid peroksidlerin oluşmasını azaltarak düz kas hücrelerine ulaşan NO miktarını artırır (37). NO guanilat siklaz enzimini uyararak GTPZGMP dönüşümünü sağlar. Bu da kalsiyum hareketlerini değiştirerek vazodilatasyona ve damar düz kas hücre relaksasyonuna neden olmaktadır (38).

Nitrik oksit ve östrojen prostosiklin ile sinerji göstererek trombositlerin adezyon ve agregasyonunu engeller (8). Koroner arterlerde endotelial olaylara cevap olarak östrojenin vazodilatör ve antitrombosit etkileri gözlenir. Östrojen, vasküler tonus ve reaktivitesini dilatasyon yönüne çeker. Bunu da düz kas hücreleri üzerinde hiperpolarizasyon ile gevşeme yaparak ve prostosiklin sekresyonunun bazal düzeyini arttırarak yapmaktadır (39- 40). Postmenapozal kadınlarda strese bağılı nöroendokrin ve kan basıncı değişikliği cevapları daha belirgin olurken östrojen tedavisi bunu azaltır (8).

Asetilkolin koroner arterlerde vazokonstriksiyon oluşturur, oysa östradiolun fizyolojik dozlarda koroner arterlere infüzyonu asetilkolin kaynaklı vazokonstriksiyonu vazodilatasyona çevirir (41). Bu etkiyi transdermal östrojen uygulamalarında ve ateroskleroza olup östrojen kullanan kadınlarda görmekteyiz (42). Bu etki nitrik oksit artışı ile oluşan endotele bağılı bir etkidir (43). Koroner arter hastalığı olan kadınlara verilen standart dozda östrojen, iskemiye azaltır, elektrokardiogramda enfarktüs bulgularının ortaya çıkışını geciktirir ve egzersize toleransı yükseltir (8). Normal kadınlarda standart 0,625 mg konjuge östrojenin koşubandı egzersizlerinde hemodinamik parametrelere etkisi yoktur (8).

2.3.5 Östrojenin Damar Düz Kas Hücrelerine Etkisi

Ateroskleroz düz kaslarda proliferasyon ile ilişkilidir, bu proliferasyon aynı zamanda intimala migrasyon ile birlikte dir. Arteriyal intimal kalınlaşma aterosklerozun erken belirtilerindendir. Östrojen ve onun düzenlediğı NO bu proliferasyon ve migrasyonu engeller (8). Bu düz kas cevabı damar zedelenmesini takiben oluşur ve östrojen östrojen reseptör alfa yokluğunda dahi bu cevabı engeller. Bu da göstermektedir ki damar yatağındaki baskın reseptör, reseptör betadır (44) . Umbilikal venlerden elde edilen endotelial hücrelerde sadece östrojen reseptör beta bulunur (45). Görüntüleme çalışmaları da postmenapozal hormon kullanan kadınlarda intimal kalınlığın azaldığını göstermiştir (46) . Bu sonuçlar postmenapozal hormon tedavisinin lipid azaltıcı ilaçlarla kıyaslanabilecek oranda ateroskleroza azalttığını gösterir (46).

2.3.6 Östrojenin Endotel Hücrelerine Etkisi

Hasara karşı endotel hücreleri pıhtılaşma kaskadını ya da ateroskleroza başlatır. Hayvan deneyleri göstermiştir ki östrojen hasara cevaben endotel hücrelerinin hızla iyileşmesini sağlar (47). Sitokinlerin sebep olduğu apoptosisi engeller (48).

2.3.7 Endotelden Bağımsız Vazodilatasyon

Östrojen endotelden bağımsız olarak da koroner arterlerde vazodilatasyona neden olur ve bu cevap prostaglandin sentaz ya da nitrik oksit sentazın inhibe edilmesi ile azalmaz (8). Muhtemelen bu etki Ca bağımlıdır (49). Sodyum nitroprusid tarafından oluşturulan vazodilatasyon endotele bağımlı değildir. Normal ve ateroskleroz açısından riskli postmenopozal kadınlarda yapılan bir çalışmada, östrojenin sodyum nitropurissidin ön kolda oluşturduğu vazodilatasyonu arttırdığı izlenmiştir (50).

2.3.8 Lipoprotein Oksidasyonunun Engellenmesi

LDL partiküllerinin oksidasyonu ateroskleroz mekanizmasında en önemli basamaklardan birisidir. Hayvan deneylerinde yüksek miktarda antioksidanın verilmesi aterosklerozun gelişimini engellerken, oluşmuş lezyonları da geriletir. Antioksidanların verilmesi kardiovasküler hastalık riskini azaltabilir. Östrojen de bir antioksidandır. LDL'nin oksidasyonunu ve lipid peroksitlerin oluşumunu engeller (8). Bu antioksidan özelliği fizyolojik kan değerlerinde mümkündür (51). Ayrıca östrojen dolaşımdaki antioksidanların (tokoferol ve beta karoten) rejenerasyonunu da sağlar (51).

Kısacası; östrojenin vasküler endotel kaynaklı anti-aterojenik etkilerinin başlıcaları şunlardır (8) :

1. Nitrik oksit sentezini artırır.
2. Homosistein, endotelin-1, VEGF (vasküler endotelyal büyüme faktörü), PDGF (trombosit kaynaklı büyüme faktörü) sentezini baskılar.
3. Kalsiyum kanal blokajı yaparken, potasyum kanallarını açar.
4. Lipoproteinlerin vasküler endotele birikimini engeller, katabolizmalarını artırır.

5. Prostosiklin sentezini artırır, tromboksan/ prostosiklin oranını prostosiklin lehine çevirir.
6. Trombosit agregasyonunu ve adezyonunu engeller. Vasküler düz kas hücre tabakası altına migrasyonu azaltır.
7. Hücre proliferasyon ve büyümesini inhibe eder.
8. Damar düz kas hücrelerinde relaksasyon yapar, vasküler reaktiviteyi dilatasyon yönüne çeker.

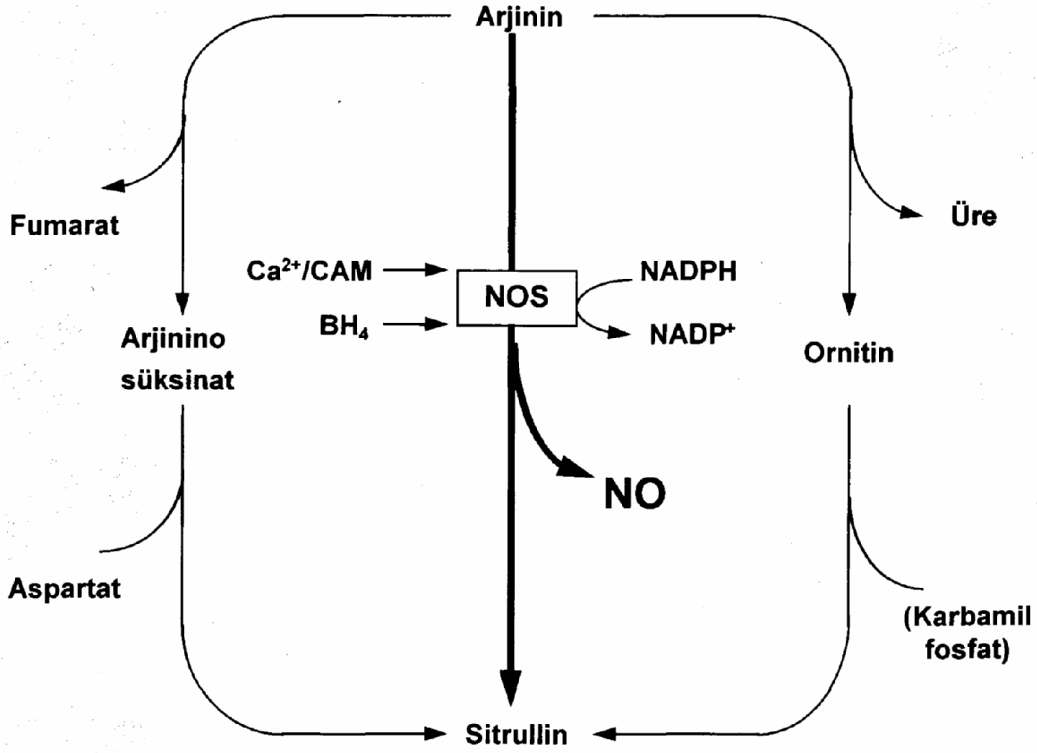
Bu bilgiler ışığında birçok çalışma yapılmış, östrojenin kardiovasküler hastalıklarda primer ve sekonder koruması araştırılmıştır. Hem HERS (Kalp ve Östrojen Progesteron Replasman Çalışması) hem de HERSII (Kalp ve Östrojen Progesteron Replasman Çalışması Takip Çalışması) çalışmalarında KVH'ı olan postmenopozal kadınlarda östrojen ve progesteronun koroner arter hastalığı riskini azaltmadığı, bu sebeple kardiovasküler olay riskini azaltmak için kullanılmayacağı belirtilmiştir (4). WHI çalışmasının konjuge equin östrojen (CEE) ve medroksiprogesteron asetat (MPA)'nın kullanımı ile yapılmış kolunda kardiovasküler hastalık ve meme kanserinde rölatif risk artışı saptanmıştır ama sadece östrojen (CEE) kolunda ise bu artış izlenmemiştir (5).

Bu yüzden kardiovasküler hastalık riski olan postmenopozal kadınlarda hormon tedavisini yeri tartışmalı hal almış bu tedavinin yerine geçebilecek başka alternatifler aranır olmuştur. Endometriumu korumak için progesteronun eklenmesine ihtiyaç duymayacak ideal bir östrojene ya da analoguna ihtiyaç vardır.

2.4 NİTRİK OKSİT VE ATEROSKLEROZ

Nitrik Oksit (NO) memelilerde endojen üretilen basit ve doğal bir moleküldür. Basit olmasına karşın vasküler, nörolojik ve immun sistemde birçok biyolojik olayın fizyolojisi ve fizyopatolojisinde anahtar rolü üstlenmektedir. NO; damar yatağında intra ve interselüler mesafede mesaj ileten bir ajan iken, immun sistemde nörotransmitter gibi davranmaktadır (52-53).

Nitrik Oksit L- argininden Nitrik Oksit Sentaz (NOs) enzimi ile üretilir(Şekil 3).Biyolojik sıvılarda NO hızla oksidasyona uğrayarak nitrite (NO₂) ve nitrata (NO₃) dönüşerek aktivasyonunu kaybetmektedir. Bu sayede su ve oksijen (O₂) oluşmaktadır.



ŞEKİL 3: Nitrik oksit sentezi

üç tip nitrik oksit sentaz enzimi bulunmaktadır;

Tip 1 nöronal (n-NOS, NOS1, bc-NOS, b-NOS, NOS-1)

Tip 2 indüklenen (i-NOS, NOS-2, mac-NOS, NOS-II)

Tip 3 endotelyal (e-NOS, NOS-3, ec-NOS, NOS-III)

Bu izoformlar orijinal klonlanıp pütrifiye edildikleri hücre tipine göre isimlendirilmiş olmalarına karşın, her biri birkaç hücre tipinde üretilmektedir. İndüklenmiş ismi aslında yanlış verilmiş olup, üç izoformun da uyarılabilme özelliği mevcuttur (54). Endotelyal NOS (eNOS) ve Nöronal NOS (nNOS) sentezi Ca bağımlıdır, kalmodülin

ile geri dönüşümlü uyarılabilmekte ve sentezi östrojenle artmaktadır (36), tamoksifen ise enzim seviyesini azaltır. iNOS ise Ca bağımlı değildir.

NO hücrel immunitede nörotransmitter gibi davranarak sitokinlerin fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynar. Bununla beraber demir içeren birçok enzimin fonksiyonlarını düzenleyerek can alıcı noktalarda görev yapmaktadır (cGMP, prostaglandin sentezi, demir hemostazı gibi) (55).

Endotelial NO intravasküler ekstrasvasküler alanların kesişim noktasında sentezlenir. Damar içerisinde NO'nun yarı ömrü yaklaşık 2 milisaniyedir. eNOS'un kardiovasküler koruma sağladığı iyi bilinmektedir. Trombosit adezyon ve agregasyonunu inhibe eder (8). Düz kas hücre proliferasyonunu ve endotel hücresiyle lökosit etkileşimini engellemektedir (56). Tüm bu veriler ateroskleroz gelişiminde kilit noktalardır. Bu sebeple aterogenezis kontrolünün NO üretiminin düzenlenmesiyle mümkün olabileceği tartışması gündeme gelmiştir. Östrojenin NO sentezini genomik ve genomik olmayan yollardan düzenlediği bilinmektedir (57). Genomik transkripsiyonunun artması östrojenin östrojen reseptör alfaya bağlanması ile oluşur (58). Hayvan modellerinde östrojenin ve raloksifenin NO bağımlı mekanizmalar ile iskemiyi azalttığı, koroner kan akımını arttırdığı bulunmuştur (59).

Reaktif oksijen radikallerinin de artışı endotel disfonksiyonuna sebep olur. Raloksifeninin hipertansif ratlarda reaktif oksijen radikal oluşumunu ve eNOS üretimini arttırdığı ve endotelial fonksiyonları düzelttiği bulunmuştur (60).

Biyolojik sistemde tetik görevi olan NO, ilk kez 1980 yılında Furchgot ve Zawadzki tarafından endotel kaynaklı relaksasyon faktörü (EDRF) olarak tanımlanmıştır (61). Sonra 1987 yılında Palmer ve arkadaşları EDRF'nin nitrik oksit (NO) olduğu belirlenerek ismi değiştirilmiştir (62).

NO ateroskleroz gelişiminde ve progresyonunda önemli bir moleküldür. Östrojenin, raloksifenin ve statin grubu ilaçların ateroskleroza karşı olumlu mekanizmalarından birinde NO rol almaktadır.

Raloksifen nitrik oksit sentezini genomik olmayan mekanizmalardan aktive eder (63) ve NO bağımlı bir yoldan hayvanlarda arterleri vazodilatasyona uğratar (64).

Ovariektomi yapılmış ratlarda azalmış Ca^{+2} bağımlı NOS aktivitesi raloksifen tedavisi ile ovariektomi yapılmamış seviyelere dönmüştür (65). Oysaki Ca^{+2} bağımsız iNOS seviyelerinde ovariektomi ile ya da raloksifen ve östrojen eklenmesi ile bir değişiklik olmamıştır (66). Raloksifen damar NOS aktivitesinde östrojen benzeri etki ederek ateroskleroz gelişimini baskılar (66).

Statinler enzim inhibisyonu ile mevalonat sentezini durdurur. Bu yolla endotelial NO sentazın (eNOS) aktivitesini arttırarak bozulmuş dengeyi düzeltirler (7). Ayrıca endotelin-1 sentezini azaltırlar (7).

Nitrik oksidin anti-aterojenik fonksiyonları kısaca şöyledir;

1. Trombosit agregasyon ve adezyonunu inhibe eder.
2. Düz kas hücrelerinde mitogenez ve proliferasyonu inhibe eder.
3. Endotel hücreleri ile lökosit etkileşimini azaltır.
4. Nitrovazodilatör etkisiyle vasküler tonus ve reaktivitesini dilatasyon yönüne çeker.

2.5 ENDOTELİN-1 VE ATEROSKLEROZ

Endotelin-1 (ET-1) NO gibi vasküler endotelden salınan vazoaktif ajanlardan biridir. Endotelin-1 sistemik ve koroner arterlerde endotelin reseptörleri üzerinden vazokonstriksiyon yapar. Ayrıca monosit adezyonunu arttırır, makrofajları aktive eder ve düz kas hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonuna yol açar (67).

Endotel disfonksiyonu aterosklerozun erken basamağını oluşturur. Aterosklerotik plağı olan hastalarda endotelin-1 seviyeleri, hücre hasarına karşı verilen cevaptan dolayı artmıştır. Endotelin-1 seviyeleri oral hormon tedavisinde ve raloksifen tedavisinde plasmada azalır (68). Yapılan çalışmalarda raloksifenin ET-1 üzerine etkileri konusunda fikir birliği yoktur. Raloksifen tedavisinde plasmada azaldığını kaydeden çalışmalar kadar (68). 12 haftalık tedavi sonrası ET-1 seviyelerinin değişmediğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (68). Statinler ise ET-1 sentezini azaltırlar (7).

2.6 MONOSİT KEMOTAKTİK PROTEİN-1 VE ATEROSKLEROZ

Ateroskleroz inflamatuvar hücrelerin, lipidlerin ve ekstraselüler matriksin arteriyel damar duvarında toplandığı progresif bir hastalıktır. Kompleks aterom plağı birçok hücre tipini barındırır. Aterogeneizde ilk basamaklardan biri damar duvarında subendotele makrofajların toplanmasıdır (9). Makrofajlar erken evrede LDL kolesterolü çevreden temizlerken, kolesterolün artması halinde yuttukları kolesterol ile köpük hücrelerine dönüşürler. Kandaki monositlerin arteriyel duvardaki makrofajların kaynağı olduğu bilinmektedir ancak monositlerin ortama nasıl çağrıldıkları tam netlik kazanmamıştır (9). Yüksek kan basıncı, türbülant kan akımı, hiperlipidemi ve endotel hasarı sonucu ortaya çıkan kemoatraktan proteinler monositlerin dokuya çağrılmasında ve hasarlı endotele yapışmasında rol oynarlar. Yapılan insan ve hayvan deneylerinde makrofajların lezyonun olduğu bölgeye çağrılmasında monosit kemotaktik proteinin (MCP-1) rol oynadığı saptanmıştır (9).

MCP-1, 76 aminoasit içeren peptid yapıda bir moleküldür. C-C kemokin süperfamilyasının en çok çalışılmış peptidlerinden birisidir. Birçok normal ve malign hücreden salınır. Örneğin; monosit, vasküler düz kas hücresi, fibroblast gibi damar yatağında yerleşmiş hücrelerden. Orijinal olarak trombositlerden salınan büyüme faktörünün indüklediği bir gen tarafından kodlanır ve monositleri hasarlı damar duvarına çağırarak aktive eder (69). Hayvan çalışmalarında hiperkolesterolemili ve balon hasarlı damar duvarında salgılandığı (70) ve aterosklerotik plaklarda bulunduğu gösterilmiştir (70).

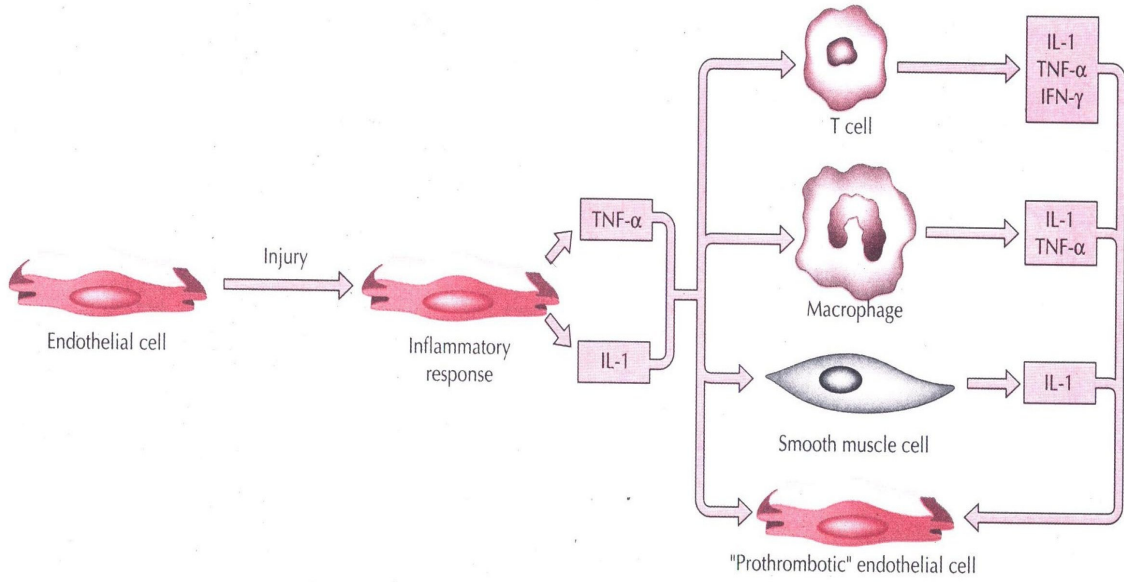
Değişik dokularda östrojenin MCP-1'i downregüle ettiği birçok çalışmada gösterilmiştir (69, 71, 72). İnsan koroner arter endotel hücreleri ile yapılan çalışmada östrojenin MCP-1'i inhibe ettiği gösterilmiştir (73). Aynı çalışma ekibinin insan koroner arter düz kas hücreleri ile yapılan çalışmasında östrojenin konsantrasyona bağlı olarak MCP-1 mRNA ekspresyonunu %40 oranında azalttığı, raloksifenin ve tamoksifenin östrojen kadar etkin olmasa da MCP-1 mRNA ekspresyonunu azalttığı bulunmuştur (69).

Bir başka çalışmada da raloksifenin genomik olmayan ER α üzerinden MCP-1'in monositlerin göçüne yol açmasını engellediği, böylece ateroskleroza engel olabileceği bulunmuştur (74).

2.7 TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR VE ATEROSKLEROZ

Tümör nekrozis faktör (TNF) insanda 6.kromozomda yerleşen tek bir gen ürünüdür. Yapısal ve işlevsel olarak birbirine benzeyen iki şekli vardır. Bunlar TNF- α ve TNF- β 'dir. Tüm vücutta katabolizmayı uyaran bir molekül olan TNF- α 'ya kronik enfeksiyon ve malign hastalıklarda görülen kaşeksiden sorumlu olduğu için 'kaşektin' adı da verilmektedir (75). TNF- α ekspresyonu transkripsiyonel ve translasyonel düzeylerde diğer sitokinler ve bazı bakteriyel ürünler gibi farklı sitokinlerin kontrolü altındadır. İnsan amnion sıvısında, plasental ve desidual dokularda TNF aktivitesi vardır. TNF- α 'nın biyolojik fonksiyonları konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Düşük konsantrasyonlarda kronik üretilimi doku onarımına katkıda bulunmakta, hem bir damar genişletici faktör, hem de bir fibroblast faktör gibi etki etmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda ise endokrin etkisi ortaya çıkmakta ve ölümcül değişikliklere neden olmaktadır (76). TNF tüm bu özellikleriyle immün sisteme yardımcı olması ötesinde birçok patolojinin oluşumunda da etkindir.

TNF- α monositlerden salınan proinflamatuvar bir sitokindir. Hücre kültürü çalışmalarında intimal düz kas hücrelerinin proliferasyonuna neden olduğu görülmüştür (77). Ancak TNF reseptörlerinin aktivasyonu aynı zamanda apoptosiz ile hücre ölümüne de yol açar. Aterom plaklarında yüksek miktarlarda bulunur, plakların yırtılmasında sorumlu tutulmuştur (Şekil 4).



ŞEKİL 4: Endotel hasarında TNF-α salınımı

İntimada yer alan düz kas hücrelerinin proliferasyonu ateroskleroz ve restenozda rol alan erken aşamalardan birisidir. TNF-alfa hücre kültürü çalışmalarında intimal düz kas hücrelerinin proliferasyonuna neden olmuştur (77). Ancak TNF reseptörlerinin aktivasyonu aynı zamanda apoptosis ile hücre ölümüne de yol açar. TNF reseptörlerinin endojen aktivasyonu ve hücrelerde apoptosise yol açması hasarlı duvarda düz kas hücre birikimini sınırlamaktadır. TNF-alfaya karşı antikör uygulaması ile bu sitokin bağımlı apoptosis engellenmiştir (77). Apoptotik süreç matür plaklardaki hücre ölümünden sorumlu olabilir. İnflamatuar süreç de aterosklerozun gelişiminde önemli rol oynar. Yapılan çalışmalarda bakteriyel lipopolisakkarit ile maruz bırakılan rat damar duvarı düz kas hücrelerinin interlökin-1, interlökin-6 ve TNF mRNA'sında artış bulunmuştur (78) .

TNF-alfanın düz kas hücre migrasyonuna olan etkisini araştıran bir çalışmada hücre migrasyonunun doza bağımlı olduğu ve birçok kemotaktik sinyal yolağını kullandığı bulunmuştur (79)

Hiperlipidemiye sekonder oluşan vasküler inflamatuvar yanıtta da TNF rol alır. Yapılan bir çalışmada rat aortik düz kas hücre kültür ortamına düşük dansiteli lipoprotein eklenmesi ile TNF-alfa mRNA ve protein ekspresyonu artmıştır. Aynı etkinin in vivo

oluşup oluşmadığı araştırıldığında LDL verilmesinden 24 saat sonra aorta ve diğer büyük damarlarda TNF-alfa immünreaktivitesi tespit edilmiştir. Bu da bize lipidlerin TNF-alfayı uyararak inflamatuvar süreci başlatıp ateroskleroza neden olduklarını gösterir (80).

Östrojenin antioksidan özelliğinde TNF-alfanın rolünü araştıran bir çalışmada ovariektomize 3 aylık ratların karotid arterleri çıkarılarak florasan boyalı LDL'ye maruz bırakılmışlardır. TNF nedeniyle artış gösteren LDL'nin akümüülasyonunun östradiol ile durdurulduğu saptanmıştır. Yazarlar östradiolün antioksidan özelliğini TNF ile oluşan LDL akümüülasyonunu engelleyerek gösterdiğini bildirmişlerdir (81).

Statinlerin makrofajlarda biriken lipidlere ve makrofajlardan salınan sitokinlere direkt etkisinin araştırıldığı bir çalışmada da, lipid birikiminin engellenemediği ancak IL-1 beta, IL-8 ve TNF-alfa sekresyonunun azaldığı gösterilmiştir (82).

Fonksiyonel Fas ligand açısından defektif farelerde yapılan çalışmada Aprahamian T ve arkadaşları serum TNF-alfa ve interferon gamma seviyelerini azalmış, lenf nodlarında ise IL-4 ve IL-10 seviyelerini artmış bulmuşlardır. Yazarlar statinlerin antiinflamatuvar aktivitelerinin hem ateroskleroz hem de otoimmünitenin düzeltilmesinde kullanılabileceğini vurgulamışlardır (83).

2.8 SELEKTİF ÖSTROJEN RESEPTÖRLERİ - RALOKSİFEN

Selektif Östrojen Reseptör Modulatorleri (SERM) dokuya spesifik olarak östrojen reseptör agonisti ya da antagonisti olarak etki eden bir ilaç grubudur. Bu sebeple etki mekanizmaları organ sistemine ve hastalığa bağlı olarak değişmekte ve karmaşıklaşmaktadır.

Tamoksifen ilk kullanılan SERM'dir. Meme dokusunda antagonist etkisi nedeni ile östrojen reseptör (ER) pozitif meme kanserli hastalarda erken evrede endokrin bir ilaç olarak kullanılmaya başlanmıştır. 1999 da yüksek riskli pre ve postmenopozal kadınlarda meme kanseri gelişme riskini %50 azalttığına dair çalışmalar nedeni ile meme kanserini önleyen ilaç olarak FDA onayı almıştır (84). Ancak yaygın kullanılmaya başlamasından sonra özellikle karsinogenez açısından yan etkileri sorgulanmaya başlamıştır. Meme kanserli hastalarda uzun dönem kullanımı ile endometrial kanser gelişimi izlenmiştir (85).

Raloksifen nonstreoidal benzotiapen türevi ikinci jenerasyon selektif östrojen reseptör modülatörüdür. Postmenopozal osteoporozun tedavi ve önlenmesi için piyasaya sürülmüş bir SERM'dir (6). Tamoksifen gibi meme dokusunda antiöstrojeniktir. Tamoksifenden farklı olarak etinil grubunun olmaması nedeni ile DNA ile reaksiyona girmez ve postmenopozal kadınlarda proliferatif ve endometrial kanser geliştirici etkisi yoktur (6). Raloksifen keoksifen ya da LY156758 adıyla 1980 yıllarında meme kanserine karşı geliştirilmiş olmasına karşın tamoksifen kadar başarılı olmayınca üretimi durdurulmuştur (84). Selektif östrojen reseptör modülatörlerinin neden bazı hücrelerde östrojenik bazılarında antiöstrojenik olduğu net bir şekilde anlaşılamamıştır. Etkilerini açıklayacak 3 mekanizma mevcuttur;

1. Östrojen reseptörünün ligand bağlanması sonrası farklı konformasyonlara girmesi
2. Östrojen reseptörüne farklı koregulator proteinlerin üretilip bağlanması
3. Östrojen response element (ERE) dışı bir yolla östrojen reseptör ekspresyonu ve gen aktivasyonu.

SERM'ler farklı dokularda reseptörlerde kendilerine özgü konformasyonel değişiklikler oluşturur ve böylece farklı farmakolojik etkiler meydana getirirler.

Raloksifenin kesin etki mekanizması halen bilinmemekle birlikte görünen etki yolları oldukça karmaşıktır. Etkisini östrojen reseptör alfa ve beta üzerinden gösterir. Raloksifenin (membran ve nükleustaki) reseptörleriyle genomik ve genomik olmayan yolların aktivasyonunda çoğul potansiyel etkileşimleri var gibi gözükmemektedir. Östrojen reseptörüne (ER) ligand bağlanması ile reseptörde oluşan benzersiz konformasyon değişimleri sonucunda TAF-1 ve TAF-2 aktive edici fonksiyonlarının diferansiyel stimülasyonuna yol açmaktadır. Bu faktörler reseptör dimerizasyonunu ve gen transkripsiyonunu düzenleyen koaktivatör ve korepressör transkripsiyon proteinleriyle etkileşmektedir. Östrojen ER'ye bağlandığında, heliks 12 reseptörün TAF-2 bölgesinin oluşumunu tamamlayarak spesifik koaktivatör proteinlerin bağlanması için kritik öneme sahip birçok amino asidi ekspozit eder. Raloksifen ER'ye bağlandığında heliks 12 sağa doğru kayarak TAF-2 yerini bloke etmek suretiyle koaktivatör bağlanmasını ve böylelikle gen transkripsiyonunu önlemektedir. Ancak yine de raloksifenin ER bağlanmasıyla etkileşimi ve gen transkripsiyonu modülasyonuna katılan diğer potansiyel koaktivatörler veya korepresörlerle etkileşimiyle ilgili bilgiler henüz tam değildir (86).

SERM'lerin östrojen benzeri etkide önemli mekanizmalarından birisi de etki ettikleri dokudaki ER α 'nın ER β 'ya olan oranıdır. Çoğunlukla ER α aktivatör gibi davranırken ER β , ER α ile heterodimer oluşturarak onun etkisini inhibe eder (87). Farelerde yapılan çalışmalarda ER β 'nın östrojen responsive genlerin transkripsiyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir. Tamoksifen ve Raloksifen de ERE varlığında ER β üzerinden etki ederken pür antagonist olarak, ER α üzerinden ise parsiyel agonist olarak etki etmektedirler (87). Yaşla ve hastalık durumunda ER α 'nın ER β 'ya oranında meydana gelen değişiklikler de östrojen ve SERM'lerin etkinliğinde fark yaratmaktadır (88).

Raloksifenin kemik ve lipid metabolizmasında östrojene agonist etkileri varken, endometrium ve meme dokusunda östrojene antagonist etkileri mevcuttur. Meme kanserine karşı geliştirilmiş olan raloksifen postmenopozal osteoporoz için kullanılmakta olan bir SERM'dir. Kardiovasküler hastalıklara karşı olan koruması henüz tam kanıtlanmamıştır. Dört yıl süreyle raloksifen tedavisi, MORE (Raloksifen

Değerlendirmesinin Çoğul Sonuçları çalışması) kohortunun toplamında kardiovasküler olayların riskini anlamlı ölçüde etkilememiştir (6). Ancak kardiovasküler hastalık riski artmış olan kadınların alt kümesinde bu olayların riskinde anlamlı bir azalma meydana gelmiştir (6). Kardiovasküler hastalıklar çalışmanın sekonder bir son noktasıdır. Bunlar koroner olayları (myokard enfarktüsü, unstabil anjina, koroner iskemi) ve serebrovasküler olayları (inme ve geçici iskemik atak) içermektedir. Raloksifenin kohortun toplamında (P=0.94) veya kardiovasküler riski artmış olan kadınlarda (P=0.86) kardiovasküler olayların riskinde erken bir artışa neden olduğuna dair kanıtlar yoktur (6).

Hayvan deneylerinde hem sağlıklı hayvanlarda ateroskleroz gelişimi hem de ateroma oluşturulmuş tavşanlarda ateroskleroz progresyonu, raloksifen tarafından östrojen gibi engellenmiştir (89). Clarkson ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada postmenopozal maymunlarda koroner arterlerde raloksifen ile ateroskleroz gelişiminde gerileme görülmemişken yapılmış diğer çalışmalarda hem ratlarda hem de maymunlarda raloksifen östrojen gibi aterosklerozu geriletmiştir (90,91).

Endotel disfonksiyonu aterosklerozun erken basamağını oluşturur. Aterosklerotik plağı olan hastalarda endotelin-1 seviyeleri, hücre hasarına karşı verilen cevaptan dolayı artmıştır. Endotelin-1 seviyeleri oral hormon tedavisinde ve raloksifen tedavisinde plasmada azalır (92). Reaktif oksijen radikallerinin de artışı endotel disfonksiyonuna sebep olur (60).

Raloksifen nitrik oksit sentezini genomik olmayan mekanizmalardan aktive eder (63) ve NO bağımlı bir yoldan hayvanlarda arterleri vazodilatasyona uğratar (64). Ovariektomi yapılmış ratlarda azalmış Ca^{+2} bağımlı NOS aktivitesi raloksifen tedavisi ile ovariektomi yapılmamış seviyelere dönmüştür (65). Oysaki Ca^{+2} bağımsız iNOS seviyelerinde ovariektomi ile ya da raloksifen ve östrojen eklenmesi ile bir değişiklik olmamıştır (66). Raloksifen damar NOS aktivitesinde östrojen benzeri etki ederek ateroskleroz gelişimini baskılar (66).

Makrofaj ve lenfositlerin arteriyel intimaya göçü aterosklerozda lipidlerin köpük hücrelerine dönüşmesine yol açan önemli bir basamaktır (9). Monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1) monositlerin bölgeye toplanmasına yol açar. Raloksifenin

genomik olmayan ER α üzerinden MCP-1'in monositlerin göçüne yol açmasını engellediği, böylece ateroskleroza engel olabileceği bulunmuştur (74).

Ratlarda yapılan çalışmalar genellikle genç ratlarda ooferektomi ile yapılmışken bizim çalışmamızda olduğu gibi Wong ve arkadaşları 15 aylık yaşlı ratlarda ooferektomi ile raloksifenin endotel disfonksiyonuna etkisini incelemişlerdir (93). Raloksifenin bazal NO salınımını artırarak endotel disfonksiyonunu düzenledikleri, ancak bunun eNOS proteininin üretiminden değil eNOS aktivitesinin stimülasyonundan kaynaklandığını bulmuşlardır (93). Bu da eNOS proteininin raloksifen tarafından upregüle edilmediğini, fosforilasyon basamağının düzenlenmesi ile aktive olduğunu göstermektedir (93).

Postmenopozal kadınlarda raloksifen birçok kardiovasküler olayı iyi yönde etkiliyor gibi görünse de sonuçları kardiovasküler olaylar açısından net olan klinik randomize çalışmalara ihtiyaç vardır. RUTH (Postmenopozal kadınlarda kardiovasküler olaylar ve meme kanserine Raloksifenin Etkileri) çalışması primer olarak SERM'lerin kardiovasküler morbidite ve mortalite üzerindeki etkinliğini belirlemek amacıyla tasarlanmıştır ve iki son noktası mevcuttur; akut koroner sendrom ve meme kanseri (94). Bu iki sonlanım noktasından meme kanserinde azalma tespit edilmiştir. Plasebo grubu ile raloksifen grubu arasında ikinci sonlanım noktası olan akut koroner sendrom ve koroner sebeplerden ölümden bir fark bulunmamıştır. Ancak fatal inme ve tromboembolik olay insidansında artış saptanmıştır. Bu sonuçlar MORE çalışmasını destekler niteliktedir (6). Bu çalışmalarda alınan hasta popülasyonunun yaş ortalaması 65 ve üzerindedir. Bu da ilaçların ateroskleroz geliştikten sonra kullanımı anlamına gelmektedir. Menopoza girildiği ilk yıllardaki önleyici etkisi araştırmaya açıktır.

2.9 HMG-KoA REDÜKTAZ İNHİBİTÖRLERİ (STATİNLER)

HMG-KoA (3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A) redüktaz enzimi, insanda hepatik ve ekstrahepatik kolesterol biyosentezinde hız kısıtlayıcı basamağı oluşturan HMG-KoA'nın mevalonata dönüşmesi olayını katalize eder. Penicillium citrinum'dan elde edilen mevastatin (kompaktin), Aspergillus terreus'tan elde edilen lovastatin ile Nocardia autotrophica'dan elde edilen simvastatin fungal kaynaklı doğal maddelerdir, daha sonra pravastatin, atorvastatin ve benzeri yarı sentetik türevleri yapılmıştır. Bu ilaçlar genellikle ön ilaçlardır ve absorbe edildikten sonra etkin şekillerine dönüştürülürler. Statin grubu ilaçlar HMG-KoA redüktaz enziminin substratı olan HMG-KoA'ya ve onun yarı indirgenmiş metabolitine benzerler, adı geçen enzimi kompetitif bir şekilde inhibe ederler. Bu olay sonucu, karaciğer hücrelerindeki kolesterol ve lipoprotein düzeyinin düşmesi, bu hücrelerin yüzeyindeki LDL reseptörlerinin dansitesinde artmaya yol açarlar (reseptör up regulasyonu). Böylece statinler hem lipoprotein sentezini azaltmak ve hem de apo-B içeren lipoproteinlerin (başta aterojenik LDL olmak üzere) karaciğer hücrelerine ve diğer hücrelere girişini ve orada yıkımını arttırmak suretiyle kanda LDL kolesterol ve total kolesterol düzeyini düşürürler. Hipertrigliseridemiye bir dereceye kadar düşürebilirler. Öte yandan antiaterojenik nitelikteki HDL düzeyinde artma yaparlar (95).

Statinlerin klinik etkinliklerinin yüksek oluşu ve diğer ilaçlara göre yan etkilerinin daha az oluşu nedeniyle belirgin bir uyum problemi yaratmamaları, bu ilaçlara üstünlük sağlayabilecek özelliklerdir. Uzun süreli denemelerle ateroskleroz gelişmesini yavaşlatarak koroner arter hastalığı gelişme riskini azalttıkları, ayrıca koroner arter hastalığı bulunan, akut myokard enfarktüsü geçirenler dahil, hastalarda sekonder profilaksi sağladıkları, tüm kardiovasküler olay insidansını ve mortaliteyi azalttıkları gösterilmiştir. Aterosklerotik lezyonların gelişmesini yavaşlattıkları gösterilmiş ve hatta gerilettikleri koroner anjiyografisi ile doğrulanmıştır. Ayrıca serebral damarlardaki ateroskleroz gelişmesini yavaşlatarak inme ve geçici iskemik atak insidansını azaltırlar (95).

Statinlerin lipid azaltıcı etkileri yanı sıra pleotrofik olarak da adlandırılan diğer dokular üzerinden de etkileri vardır.

2.9.1 Pleotrofik Etkiler

Statinler LDL kolesterol düşürülmesinden bağımsız olarak birçok organ sistemini ve metabolik yolu etkileyerek birçok hastalığı olumlu yönde etkiler.

Aterosklerozun patofizyolojisi daha iyi anlaşıldıkça sadece basit bir lipid depo hastalığı olmadığı kanaatine varılmıştır. İnflamasyon, endotelyal disfonksiyon, plak instabilitesi, tromboz, düz kas proliferasyonu aterosklerozun gelişim ve ilerlemesinde önemli rol oynar (7).

Ateroskleroz geliştirdikleri ratlarda yapılan çalışmasında Kleeman ve ark., statin kullanımı ile lipid azaltıcı etkisinden beklenmeyecek oranda aterosklerotik alanın çapının sayısının ve büyüklüğünün azaldığını göstermişlerdir (96).

Bu etkiler statinlerin, endotele monosit adezyonunu azaltması ve damar duvarından salınan monosit kemoatraktant protein-1 (MCP-1) ve tümör nekrosis factor-alfa (TNF- α) gibi pro-aterojenik sitokinleri azaltmasıyla oluşan antiinflamatuvar etkileri sonucudur (7).

Klinik çalışmalarda da statinlerin antiinflamatuvar etkileri gösterilmiştir. 1999'da CARE (Cholesterol and Recurrent Events) çalışmasında myokard enfarktüsü sonrası 5 yıllık pravastatin kullanımının serum inflamasyon belirteçlerinden yüksek sensitif C-reaktif proteini (hs-CRP) düşürdüğü görülmüştür (97). Akut koroner sendromu olan hastalarda hs-CRP seviyesinin 2 mg/dl'nin altına indirilmesinin tekrarlayan myokard enfarktüsü oranlarını azalttığı bulunmuştur (98). Bu azalmanın lipid seviyelerinin azalmasından bağımsız olduğu belirtilmiştir.

Endotel disfonksiyonu aterosklerozun erken belirteçlerinden birisidir (9). Diabetes mellitus, hipertansiyon, sigara tüketimi ve yükselmiş LDL seviyeleri endotel disfonksiyonuna yol açar (9).

Endotel disfonksiyonu vazodilatör (NO) ve vazokonstriktör endotelin-1 arasındaki doğal dengenin bozulması sonucu ortaya çıkar. HMG-KoA redüktaz enzim inhibisyonu ile mevalonat sentezi durdurulur. Bu yolla kolesterol sentezinin

baskılanmasının ötesinde isoprenoid üretimi de engellenir. Farnesilpirofosfat veya geranilgeranilpirofosfat gibi isoprenoidlerin baskılanması ile küçük G-protein Rho ve Rac inaktive edilir. Rho sinyalizasyonunun engellenmesi endotelial NO sentazın (eNOS) upregülasyonuna ve artmış NO aktivitesine yol açar. Rac sinyalizasyonunun engellenmesi ise NAD(P)H-oksidadaz aktivitesini ve süperoksit üretimini engeller. Böylece NO üretiminin artmasına yol açan endotelial NO sentazın (eNOS) aktivitesini arttırarak bu bozulmuş dengeyi düzeltirler (99). Ayrıca ET-1 sentezini azaltırlar (7).

Ayrıca O'Driscoll ve ark. simvastatinin 4 haftalık kullanımında lipid düşürücü etkisinden bağımsız olarak endotelde NO kaynaklı vazodilatasyon etkisini görmüşlerdir (100).

Aterosklerotik plaklar bazı durumlar gerçekleştiğinde stabilitelerini kaybederler. Bu durumlar şöyle sıralanabilir; çok miktarda makrofajın bulunması ve plak alanındaki intimanın neovaskülarizasyonunun artması (9). Makrofajlar metalloproteinaz enzimleri salgılayarak fibröz kapsülü zayıflatıp kolay kırılğan hale getirerek plakların stabilitesini bozarlar (9).

Statinler bu inflamatuvar hücrelerin endotele adezyonu, dokuya transmigrasyonu, proinflamatuvar sitokin salınımı, serbest radikal salınımı gibi fonksiyonlarına etki eder (101). Williams ve arkadaşları 2 yıllık pravastatin kullanımının neovaskülarizasyonu ve plağın makrofaj yoğunluğunu azalttığını belirtmişlerdir (102).

Aterosklerotik hastaların trombosit agregasyonuna ve vasküler kasılmaya yol açan tromboksan A2 (TXA2) üretimindeki artış ve trombosit hücre zarındaki değişiklikler nedeni ile trombotik potansiyelleri yüksektir (7). Statinler TXA2 üretimini azaltarak antitrombotik etki oluştururlar (7). Ayrıca vazodilatör etkisi olan prostosiklinin sentezinin artmasına yol açacak siklooksijenaz-2 (COX-2) enziminin salınımını arttırırlar (7). Aterosklerozlu hastalarda eNOS ve NO seviyelerini düzenleyerek de trombogenik potansiyeli azaltırlar.

Hem statinler hem de östrojen kardiovasküler hastalıklara karşı lipid profilini düzelterek bir koruma sağlıyor görünmektedir, ancak ayrıca lipid metabolizması üzerinden olmayan yollardan da etki ediyor olmalıdırlar. Raloksifen progesteronla karşılanması gerekmeyen bir ajan olarak östrojene iyi bir alternatiftir. Yapılmış geniş çalışmalarda hormon replasman tedavisi veya raloksifenin kardiovasküler hastalıklardaki koruma etkinliği araştırılırken hasta gruplarında statin kullanımı yaygın olarak bulunmakta idi.

Bu açıdan raloksifenin ve statinin ayrı ayrı ve beraber kullanımında ateroskleroz gelişiminin ilk basamağındaki endotel disfonksiyonu ve inflamatuvar süreçte etkinliklerini immünohistokimyasal olarak karşılaştırmak istedik. Hayvan deneyi olarak planladığımız çalışmamızda 15 aylık ratları tercih ettik. Daha önce yapılmış araştırmalarda 8- 12 hafta büyüklükteki ratları ovariectomi sonrası oluşturulmuş menopoz modelleriyle çalışmışlardır. Biz ise yaş faktörünün de hem menopoz hem de ateroskleroz oluşumuna etkisinin olabileceği düşüncesiyle daha olgun ratları tercih ettik (93). Deney hayvanlarında birçok ajan kullanılarak ateroskleroz geliştirilmiştir (103). Ratlar ateroskleroz-rezistan hayvanlar olarak değerlendirilmişlerdir (103). Ancak biz ve birçok çalışmacı ateroskleroz gelişimindeki ilk basamakları değerlendirdiğimiz için ratları tercih ettik. İnsanlarda yapılmış bir kıyaslama çalışmasında (104) raloksifenin ICAM-1 ve VCAM-1 seviyelerini daha etkin düşürdüğü ancak simvastatinin ise serum kolesterol seviyelerine daha etkili olduğu görülmüştür.

3. MATERYAL METOD

3.1 DENEYSEL GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hayvan Etik Kurulu'nun 07.06.2006/0028 sayılı onayı ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kullanılan histokimyasal ve immünohistokimyasal boyama için gerekli kimyasal malzemeler ve sarf malzemeleri Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından 2006- 68 nolu proje ile desteklenmiştir.

3.1.1 Deney Hayvanları

Çalışmamızda Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında yetiştirilen seksüel olgunluğa erişmiş, daha önce çiftleşmemiş ve deneye girmemiş, ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen kırk adet 12- 15 aylık Wistar albino dişi rat kullanıldı. Ratlar 25 °C oda ısısında, 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık dönemler şeklinde ayarlanmış ortamda serbest su ve gıda sağlanarak; stres ve gürültüden izole bir şekilde çalışmaya alındılar. Deneyler gerektirdiğinde ratlara gonadektomi uygulandı. Yine deneyler gerektirdiğinde raloksifen (Evista, Eli Lilly& Co, İndianapolis) 3 mg/kg, atorvastatin (Ator, Sanovel İlaç) 30 mg/kg veya hem raloksifen 3mg/kg hem atorvastatin 30mg/kg dozundan uygulandı.

Ratlar beşerli gruplar halinde kolonilere ayrıldı. Kafeslerine uyum sağlamaları için dört günlük bekleme periodundan sonra ratlar ketamine 90 mg/kg veya xylasine 10mg/kg dozundan intraperitoneal uygulama ile anesteziye alındı. Anestezi altında povidon iyodür ile dezenfekte edilen cilt kesinden (1 cmlik) overler bulundu. Fallop tüpü ile over bileşkesinden katgüt kullanılarak bağlandı, kesildi ve çıkarıldı. Akabinde boynuzlar abdominal kavite içerisine itildi, cilt katgüt ile kapatıldı. İşlem 10 dakika ile sınırlandırıldı. Cilt kapatılmasından sonra ve postoperatif bakımda yine povidon iyodür kullanıldı. Ratlar anestezinin etkisi ortadan kalkınca laboratuarda kendi ortamlarına bırakıldılar.

Menopoz durumunun oturması için beş haftalık bekleme süresinin ardından ratlar rastgele dört gruba ayrıldı. Her grupta onar rat deneye alındı.

Grup 1: kontrol grubu olarak ayrılarak ilaç uygulamasına alınmadı.

Grup 2: Raloksifen (evista) 3 mg/kg per oral 1 kez/gün

Grup 3: Atorvastatin (ator) 30 mg/kg per oral 1 kez/gün

Grup 4: Raloksifen 3 mg/kg ve atorvasatin 30 mg/kg per oral karışım 1 kez/gün

Oral ilaç nazogastrik lavaj ile uygulandı. İlaç uygulaması dört hafta süreyle gün aralığı verilmeksizin günün aynı saatinde yapıldı.

Dört hafta sonunda ratlar Kloroform anestezisi altında servikal dislokasyon yöntemi ile dekapite edildi. Dekapitasyon sonrasında ratların aortaları alındı, %10luk formalin solüsyonuyla tespit edildi. Dokular 24-36 saat süreyle tespit solüsyonunda bekletildi.

3.2 IŞIK MİKROSKOBİK GEREÇ VE YÖNTEMİ

Parafin Takibi

1-Fiksasyon: % 10 formalin	24-48 saat
2- 24 saat akarsuda yıkama	
3- %60 etil alkol	30 dk
4- %70 etil alkol	30 dk
5- %80 etil alkol	30 dk
6- %95 etil alkol	30 dk
7- %100 etil alkol I'de	1 saat
8- %100 etil alkol II'de	1 saat
9- ksilen-alkol'de	30 dk
10- ksilen I' de	45 dk
11- ksilen II'de	45 dk
12- ksilen-parafinde	30 dk
13- 60°C'lik etüvde erimiş parafinde	1 saat
14- parafin II'de	1 saat
15- parafin III'de	1 saat bekletildiler

Etüvden çıkarılan parçalar parafine gömülerek bloklandı. Işık mikroskopunda incelemek üzere hazırlanan parafin bloklardan 5 mikronluk seri kesitler alındı. Preparatların ilk bölümüne histokimyasal yöntemlerle Hematoksilen-Eosin (hemotoksilen Surgipath Europe 01562E, Eosin Surgipath Europe 01602E) ile boyama yapıldı. Seri kesitlerin diğerlerine ise immünohistokimya boyaması yapıldı. Histokimyasal boyama için ayrılan preparatlar 60 °C'lik etüvde 1 gece deparafinize edildi.

Hematoksilen-Eozin Boyası

1-Ksilen I	30dk
2-Ksilen II	30dk
3-% 95 alkol	2dk
4-%80 alkol	2dk
5-%70 alkol	2dk
6-%60 alkol	2dk
7-Akar su	5dk
8-Hematoksilen	3dk
9-Akarsu	5dk
10-Asit-alkol	1sn
11-Akarsu	2dk
12-Eozin	4dk
13- %80 alkol	2dk
14-%95 alkol	2dk
15-Ksilen	30-60dk
16-Entellan ile kapama	

3.3 İNDİREK İMMÜNOHİSTOKİMYA YÖNTEMİ

Kullanılan Malzemeler:

Ksilen

Alkol

PBS (Fosfat Buffer Solusyonu)

Sitrat buffer (50 ml Sitrat +450 ml Distile su)

Dakopen (Dako, Lot = 8260, Glostrup, Denmark)

%3 Hidrojen Peroksidaz (Dako, Lot = 438, Denmark)

Boyama Yöntemi

İmmunohistokimyasal yöntemle boyanacak preparatlar 60°C'lik etüvde 1 gece bekletilip deparafinizasyon yapıldıktan sonra boyama başlatıldı.

1-Ksilen 30dk

2-Ksilen 30dk

3-% 95 alkol 2dk

4-%80 alkol 2dk

5-%70 alkol 2dk

6-%60 alkol 2dk

7-Kesitler sitrat buffer içinde mikrodalga fırında 600V 6 dakika kaynatıldı.

8-Distile su 5dk

9-Distile sudan alınan kesitlerin doku etrafındaki su silinip, Dakopenle çevresine daire çizildi. Bu işlem dokuların kurummasını engellemek ve uygulanacak maddelerin lam üzerinde dağılmasını engellemek amacıyla yapıldı. Üzerine PBS damlatıldı.

10-PBS'le yıkama gerçekleştirildi (3×5 dk).

11-%3'lük Hidrojen Peroksidaz'da 5 dakika tutuldu.

12-PBS'le yıkama gerçekleştirildi (3×5 dk).

13-Blocking solution damlatıldı .(Mouse ve rabbit için Zymed Histostain- Plus Broad Spectrum Cat No:85-9943, goat için sc-2023), 1saat bekletildi.

14-Dokulara Primer Antikor damlatıldı 1 saat bekletildi. (Bizim çalışmamızda primer antikor olarak; MCP-1 (sc-1785 Santa Cruz, USA), TNF- α (sc-1350 Santa Cruz, USA), eNOS (905-385 assay designs, Michigan, USA), iNOS (905-430 assay

designs, Michigan, USA), endotelin-1 (MA3-005 affinity bioreagents, USA), Estrogen Receptor alpha (MA1-310 affinity bioreagents, USA), Estrogen Receptor beta (PA1-311 affinity boreagants, USA) kullanıldı)

15-PBS'le yıkama gerçekleştirildi (3×5 dk).

16-Biyotinlenmiş sekonder antikor uygulandı.(Mouse ve rabbit için Zymed Histostain-Plus Broad Spectrum Cat No: 85- 9943, goat için sc- 2023) 30dk bekletildi.

17- PBS'le yıkama gerçekleştirildi (3×5 dk).

18-Enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) .(Mouse ve rabbit için Zymed Histostain- Plus Broad Spectrum Cat No: 85- 9943, goat için sc- 2023) 30 dk uygulandı.

19-PBS'le yıkama gerçekleştirildi (3×5 dk).

20-DAB boyaması yapıldı (DBS, K- 007 Pleasanton, USA) 3 dk.

21-Distile su ile yıkandı.

22-Mayers hematoksilenle zıt boyama yapıldı 1-2 dk.

23-Distile su ile yıkandı.

24-%80 etil alkol 2 dk.

25-%90 etil alkol 2 dk.

26-Ksilen 30 dk.

27-Entellan ile kapatıldı.

İmmunohistokimyasal yöntemle boyanan preparatlar, boyanma derecelerine göre kuvvetli (+++), orta (++) , zayıf (+) ve çok hafif (+/-) diye tanımlandı. Preparatlar iki histolog tarafından değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1 Histokimyasal Bulgular

Ovariektomi sonrası dört gruba ayrılan ratların fiksasyon sonrasında hemotoksilen eosin ile boyanan aortalarında ışık mikroskopisi altında damar yatağının katmanları histolojik olarak incelendi.

Tunika intimadaki yassı endotel hücreleri tek sıralı olarak gözlemlendi (resim1a-d). Subendotelde bulunan membrana elastica interna hemotoksilen-eozin ile izlenmedi (resim 1a).

Tunika media tabakası incelendiğinde lümeneye paralel yerleşimli elastik kollajen fibrillerle düz kas hücreleri görüldü. Tunika adventisya ise ince gevşek bağ dokusu olarak gözlemlendi (resim1a-d).

Dört grup olarak incelenen aortalar arasında hemotoksilen-eozin ile boyama farkı gözlemlenmedi (resim1a-d).

4.2 İmmunohistokimyasal Bulgular

Çalışmamızda 5 haftalık menopoz ve 4 haftalık ilaç uygulaması sonrasında rat aortalarında endotel hücreleri, tunika media ve tunika adventisya östrojen reseptör alfa, östrojen reseptör beta, iNOS, eNOS, TNF-alfa, ET-1, MCP-1 markerları açısından primer antikor ile boyanarak immunohistokimyasal olarak incelendi. Gruplar arasındaki endotel boyanma farklılıkları tablo-1 de gösterilmiştir.

ER alfa

ER- α primer antikoruna ile boyanan kontrol grubu olarak ayrılıp ilaç verilmemiş ratların aorta endotel hücrelerinin indirekt immunhistokimya boyanmasında bazı preparatlarda hafif düzeyde immunreaksiyon mevcutken (resim 2a) genel olarak ER- α immünreaktivitesi gözlemlenmemiştir (-).

Atorvastatin grubunda bazı hücrelerde ER- α immunreaktivitesi gözlenirken kontrol grubuna göre boyanan hücre sayısı daha fazla idi (+/-) (resim 2b).

Raloksifen verilen grupta ise endotel hücrelerinin büyük çoğunluğunda ER- α antikoruna ile çok hafif bir boyanma (+/-) gözlemlendi (resim 2c).

Raloksifen ve atorvastatinin birlikte kullanıldığı dördüncü grup ratın aorta incelemesinde ise hücrelerin boyanması yine oldukça az idi (+/-) (resim 2d).

Her dört grubun da tunika mediasında ER- α immunreaktivitesi gözlenmezken tunika adventisyalarda boyanma belirgin idi (resim 2a-d).

ER beta

Kontrol grubunda ER- β antikor ile boyanmış preparatların immünohistokimya incelemesinde endotel hücrelerinde belirgin boyanma izlenirken (+++) (resim 3a), atorvastatin verilen grupta ER- β immunreaktivitesi kontrol grubunun reaktivitesine göre belirgin azalma göstermiş ve zayıf olarak boyanmıştır (+)(resim 3b).

Raloksifen verilip ER- β antikoruna ile indirekt immünohistokimyasal olarak incelenen aorta preparatlarında endotel hücrelerinde atorvastatin grubundan daha fazla ancak yine de kontrol grubundan daha az boyanma gözlemlendi (++) (resim 3c).

Raloksifen ve Atorvastatinin birlikte kullanıldığı dördüncü grupta ise ator grubuyla benzer şekilde zayıf bir immünreaksiyon mevcut idi (+) (resim 3d).

Tüm dört grupta da tunika mediada ER- β immünreaktivitesi yok iken tunika adventisyalarda belirgin immünreaksiyon izlendi (resim 3a-d).

iNOS

Kontrol grubu olarak ayrılarak ilaç verilmemiş ratların aortasında tunika intimalı oluşturan endotelin iNOS antikoruna boyanıp indirekt immünohistokimyasal incelemesinde zayıf reaksiyon izlenmiştir (+). Tunika mediada iNOS antikoruna ile

boyanmada immünreaktivite görülmez iken tunika adventisyada ise az miktarda immunoaktivite gözlemlendi (resim4a).

Atorvastatin grubuna ait preparatlar incelendiğinde ise endotelde kontrol grubundan daha zayıf reaksiyon gözlemlendi (+/-) ve tunika mediada immünreaktivite gözlenmez iken adventisyada çok az miktarda boyanma dikkati çekti (resim4b).

Raloksifen grubunun preparatlarında iNOS antikoru ile endotelde kontrol grubundan daha belirgin miktarda boyanma gözlenirken (++) tunika media içinde az sayıda hücrede hafif bir boyanma gözlemlendi. Tunika adventisya ise boyama belirgin idi (resim 4c).

Raloksifen ve Atorvastatinin birlikte verildiği çalışma grubunda ise endote Raloksifen grubundan daha az, atorvastatin grubu ile aynı oranda boyanma göstermiştir (+/-). Tunika mediada hafif boyanma gözlenirken tunika adventisyada az boyanma mevcut idi. (resim 4d)

eNOS

Kontrol grubundaki ratların aort preparatlarında endotel hücreleri eNOS antikoru ile belirgin immünreaktivite göstermiştir (++) . Tunika mediada antikor ile boyanan az sayıda hücre gözlenirken tunika adventisyada boyanma oldukça az bulundu. (resim 5a).

Atorvastatin verilmiş olan çalışma grubunda ise endoteldeki eNOS antikor immunreaktivitesinin kontrol grubuna göre daha az olduğu (+), tunika mediada az sayıda hücrede eNOS immünreaktivitesi olduğu tunika adventisyada ise belirgin immünreaksiyon olduğu görüldü (resim 5b).

Raloksifen grubunda endoteldeki eNOS immünreaktivitesi belirgin olarak izlendi (++) . Tunika mediada az sayıda hücrede immünreaksiyon gözlenirken adventisyada immünreaksiyon endotel hücrelerinde olduğu gibi belirgin idi (resim5c).

Raloksifen ve atorvastatin grubunda endoteldeki eNOS antikoruna ile boyanma raloksifen grubundan daha az idi (+). Tunika mediada az sayıda hücre görülürken tunika adventisyada boyama belirgin idi.

TNF- alfa

Inflamatuar bir marker olan TNF-alfa antikoruna ile immünohistokimyasal olarak incelenen kontrol grubu endotel hücrelerinde boyanma gözlemlendi (++) (resim6a). Tunika mediada az sayıda hücrede boyanma gözlenirken tunika adventisyada boyanma belirgin idi.

Atorvastatin (resim6b) grubunda endotelde TNF-alfa antikoruna ile immünreaktivite oldukça az bulundu (+). Tunika mediada bulunan hücrelerde boyanma çok az gözlenirken tunika adventisyada boyanma belirgin idi.

Raloksifen verilmiş olan rat aortalarının TNF-alfa antikoruna ile boyanmış endotel hücrelerinde hafif bir boyanma gözlemlendi (+) (resim6c). Tunika mediada boyanan hücre gözlenmezken, diğer gruplarda olduğu gibi tunika adventisyada boyanma belirgindi.

Raloksifen+atorvastatin grubunun TNF-alfa antikoruna ile boyanmış endotel incelenmesinde hafif bir immünreaksiyon gözlemlendi (+). Tunika media tabakasında boyanan hücre sayısı oldukça az olmakla birlikte tunika adventisyada boyanma yine belirgindi (resim6d).

Endotelin-1

Kontrol grubun endotel hücrelerinin ET-1 antikoruna ile indirekt immünohistokimyasal incelenmesinde belirgin immünreaktivite gözlenmiştir (+++) (resim7a).

Atorvastatin grubunda ET-1 antikoruna ile endotel boyanması kontrol grubuna göre belirgin olarak az idi (++) (Resim7b). Raloksifen grubunun endotel hücrelerindeki immünreaktivitenin atorvastatin grubu ile aynı yoğunlukta olduğu gözlemlendi (++) (resim7c).

Raloksifen +Atorvastatin grubunda ise endotelde ET-1 immünreaktivitesi hem kontrol grubundan hem de ilaçların tek tek verilmiş olduğu diğer iki çalışma grubundan belirgin olarak zayıf gözlemlendi(+)(resim7d).

Dört grubun tümünde ET-1 antikoru indirekt immünohistokimyasal olarak incelenen tunika media tabakasında immunreaksiyon gözlenmez iken, tunika adventisyada ise belirgin immunreaksiyon gözlemlendi (resim 7a-d).

MCP-1

Kontrol grubunda MCP-1antikoru ile endotel hücrelerinde belirgin boyanma gözlenirken (++) , tunika mediada az sayıda hücrede immunreaktivite gözlemlendi. Tunika adventisyada boyanma orta derecede idi (resim8a).

Atorvastatin verilip MCP-1 antikoru ile incelenen grubun endotel hücrelerindeki boyanma kontrol grubuna göre biraz azalmış olarak gözlemlendi (+)(resim8b). Tunika mediayı oluşturan hücrelerde boyanma gözlenirken tunika adventisyada hücrelerinde boyanma orta derecede idi.

Raloksifen grubunda ise endotelde MCP-1 immünreaktivitesinde kontrol grubu ile aynı miktarda belirgin boyanma mevcuttu (++)(resim 8c). Raloksifen grubunun tunika mediasında boyanan hücre sayısı oldukça belirgin iken tunika adventisyasında orta dereceli boyanma izlendi.

Raloksifen+Atorvastatin grubunda yine MCP-1 antikor immünreaktivitesi endotel hücrelerinde belirgin idi (++) (resim 8d).

	ER α	ER β	iNOS	eNOS	TNF	ET-1	MCP-1
Kontrol	-	+++	+	++	++	+++	++
Atorvastatin	+/-	+	+/-	+	+/-	++	+
Raloksifen	+/-	++	++	++	+	++	++
Raloksifen + Atorvastatin	+/-	+	+/-	+	+	+	++

Tablo 1: Ateroskleroz patogenezinde rol alan değişik markerların çalışmada incelenen dört gruba ait endotel hücrelerinde göstermiş oldukları immnreaktivitenin dağılım tablosu. (-);boyanma yok, (+/-); çok zayıf, (+); zayıf, (++); orta, (+++); kuvvetli olarak değerlendirildi.

5. TARTIŞMA

Menopoz doğal bir süreç olarak karşımıza çıkmakla birlikte ilerleyen yıllarında kadın vücudunda patolojik boyutlara ulaşabilen organ sistemi hasarlarına neden olmaktadır. Menopoz öncesi dönemde aterosklerotik kardiovasküler hastalıklara dirençli olan kadın vücudu menopoz sonrasında yaşıtı erkeklerle aynı riski taşıır hale gelmektedir (8,15). Bu durumun ortaya çıkması araştırmacıların dikkatini menopoz sonrası dönemde meydana gelen değişiklikleri araştırmaya yönlendirmiştir. Biz de postmenopozal dönemde sıklıkla tercih edilen ilaçlardan raloksifen ve statin grubu ilaçların aterosklerozun gelişim basamaklarına olan etkinliğini araştırmak amacı ile yaptığımız çalışmanın sonuçlarını literatür bulgularının ışığında tartışmak istedik.

Literatürde iNOS aktivitesi ve ateroskleroz arasındaki ilişki açısından değişik görüşler mevcuttur. Yapılan çalışmalarda overektomize ratlarda aortada iNOS seviyeleri artmış bulunmuştur ve östrodiol ya da östrodiol ve progesteronun birlikte kullanılması ile bu artış engellenmiş olarak tespit edilmiştir. (105). Oysa bir başka çalışmada da HT verilen ratlarda koroner arterlerde NOS aktivitesi artmış bulunmuştur (106). Koyuncu ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada overektomize ratlarda perivasküler alanda artmış olarak buldukları iNOS seviyelerinin östradiol ve neta tedavisi ile azaldığını bildirmişler, hormon tedavisinin koroner arterlerde iNOS ekspresyonunu azalttığını savunmuşlardır (107).

iNOS tarafından üretilen NO seviyelerinin aterosklerotik lezyonlarda artmış olduğu tespit edilmiştir (108). Tavşanlarda yapılmış bir çalışmada ateroskleroz gelişim aşamasında statin grubu ilaçların endotel disfonksiyonunda rolünün olup olmadığı araştırılmış. Günlük 10 mg/kg statin tedavisinin ardından tavşanların damar yataklarında iNOS, P-selectin, ICAM-1 gibi endotel disfonksiyonunu gösteren markerların azaldığı immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir(109).

eNOS'un normal ve aterosklerotik damarlarda endotel hücrelerinden salgılandığı kesinken iNOS ile ilgili çalışmalar azdır. Tavşanlarla yapılmış çalışmada kolesterolden zengin diyet sonrası incelenen aortalarda iNOS aktivitesinin ilerlemiş lezyonlarda plak içinde tespit edilip, endotelde ve düz kas hücrelerinde ve normal aortada tespit edilmemiş olması iNOS'un aterom plağı tarafından sitokinlerin

uyarılması sonucu meydana geldiği görüşünü destekler (110).

Raloksifen nitrik oksit sentezini genomik olmayan mekanizmalardan aktive etmekte (63) ve NO bağımlı bir yoldan hayvanlarda arterleri vazodilatasyona uğratmaktadır (64). Ooferektomi yapılmış ratlarda azalmış Ca^{+2} bağımlı NOS aktivitesi raloksifen tedavisi ile ooferektomi yapılmamış seviyelere dönmüştür (65). Oysaki Ca^{+2} bağımsız iNOS seviyelerinde ooferektomi ile ya da raloksifen ve östrojen eklenmesi ile bir değişiklik olmamıştır(66).

Bizim çalışmamızda kontrol grubundaki overiektomize ratlarda iNOS aktivitesi immünohistokimyasal olarak zayıf boyanmıştır. Raloksifen tedavisi ile bu zayıf boyanma artış göstermiş, Statin kullanımı ile ise azalmıştır. Raloksifen kullanımının iNOS seviyelerini arttırması, nitrik oksit sentezinin artması ve atreosklerozun gelişiminin engellenmesi yönünde rol oynamaktadır. Hem raloksifen hem de statin verilen grupta ise iNOS aktivitesi yalnız statin kullanılan gruptaki oranda azalma göstermiştir. Bu azalma statin etkinliğinin iNOS üzerinde raloksifenden daha baskın olup, kendi yönünde cevap alınmasını sağlamak gibi bir sonuç doğurduğunu düşündürebilir. Literatürde bu iki ilacın kıyaslandığı ilk çalışma bizim çalışmamız olmuştur. İki ilacın iNOS üzerine farklı etkilerinin gözlenmesi ve bunu literatürle uyumlu olması bu iki ilacın iNOS indüklenmesinde farklı mekanizmalar kullandığını akla getirmektedir. Pinna ve ark yapmış olduğu çalışmada iNOS'un raloksifen tarafından inhibe edilmesinin ER α 'nin upregülasyonu üzerinden olduğu tespit edilmiştir(111).

Endotel disfonksiyonu vazodilatör olan NO ve vazokonstriktör endotelin-1 arasındaki dengenin bozulması sonucu ortaya çıkar. Statin grubu ilaçlar bu bozulan dengeyi eNOS aktivitesini arttırıp NO üretiminin artışına yol açarak düzenlemektedirler (7). Bu NOS aktivitesinin arttırılması mevalonat yolağının inhibisyonunun yol açtığı GTPaz aktivitesinin inhibisyonu ile olmaktadır (99). Raloksifen de bazal NO salınımını arttırarak endotel disfonksiyonunu düzenler. Bu etkisinin eNOS proteininin üretiminden değil eNOS aktivitesinin stimülasyonundan kaynaklandığını bulunmuştur (93). Bu da eNOS proteininin raloksifen tarafından upregüle edilmediğini, fosforilasyon basamağının düzenlenmesi ile aktive olduğunu gösterir (93).

Overiektomi yapılmış ratlarda azalan Ca⁺2 bağımlı NOS aktivitesi raloksifen tedavisi ile overiektomi yapılmamış seviyelere döndürülmüştür (65).

Yapmış olduğumuz çalışmada overiektominin endotelde eNOS aktivitesinin artmasına neden olduğunu gördük. Bu sonucumuz Hiroya Okano ve arkadaşlarının domuzlarda yapılan in vivo çalışmalarındaki bulgularla örtüşmektedir. Östrojenik tedavilerin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında ovariektomi yaptıkları domuzların aorta endotel hücrelerini incelemişler, ovariektominin eNOS protein ve mRNA seviyelerini arttırdıklarını tespit etmişlerdir (58). Hatta raloksifen tedavisi ile eNOS protein seviyeleri azalmıştır (58). Ancak Pavo ve arkadaşları ise ratlarda yaptıkları çalışmalarında ovariektomi ile eNOS aktivitesinin azaldığını fakat raloksifen tedavisi ile bu düşüşün engellendiğini belirtmişlerdir (66). Kullanılan hayvan modelinin çalışma sonuçlarına etkisi bir kez daha ortaya çıkmıştır. Çalışmamızda raloksifen tedavisi beklenenin aksine eNOS üretiminde yeterince artış sağlamadı.

Raloksifenin ve diğer SERM grubu ilaçların damar yatağına direkt etkileri birçok çalışmada incelenmiştir. Değişik arter ve venleri birçok hayvan grubunda gevşettiği görülmüştür (93,112,113,114). Ancak etki mekanizmasının birçok yolağı vardır; eNOS üretimini arttırarak (112) veya L-tip voltaj-sensitif Ca⁺2 kanallarının inhibisyonuna yol açarak (112). Ayrıca damar tipi, deney hayvanının tipi, endotelin durumu da etkinliğinde önemli rol oynamaktadır (114). Ayrıca raloksifenin östrojenin damar yatağına olan etkilerinden genomik olan bazı etkilerini ve nongenomik etkilerini gösterbildiği bilinmektedir (111). Damar yatağını gevşetme etkisi NO üzerinden olurken, NO sentezini de nongenomik mekanizmadan yürütmektedir ve etkinliğini yürüttüğü östrojen reseptör tipindeki değişiklik etkinliğini de değiştirmektedir (111). Wong ve arkadaşlarının da belirttiği gibi yaşla birlikte vasküler cevap ve eNOS protein üretimi değişmektedir. Bu da endotelial nitrik oksidin etkinliği artmış ancak eNOS protein seviyesinin değişmemiş bulunmasına yol açar(93).

Hücre kültürleri ile yapılan çalışmalarda östrojenin ve raloksifenin endotel hücrelerinde ER α 'ya bağlanarak eNOS üretimini arttırdığı bulunmuştur.(58,66). Çalışma gruplarımızın hiçbirisinde yeterli düzeyde ER α tespit edememiş olmamız raloksifenin etkinliğinin ortaya çıkmasını maskeleyebileceğini düşündürmüştür.

Raloksifen ve atorvastatinin birlikte uygulanmasında eNOS immünreaktivitesi kontrol grubuna göre azalmış bulunmuştur.

Aterosklerozda lipidlerin köpük hücrelerine dönüşmesine yol açan önemli bir basamak makrofaj ve lenfositlerin arteriyal intimaya göçüdür (9). Kandaki monositlerin arteriyal duvardaki makrofajların kaynağı olduğu bilinmektedir ancak monositlerin ortama nasıl çağrıldıkları tam netlik kazanmamıştır. Yüksek kan basıncı, türbülant kan akımı, hiperlipidemi ve endotel hasarı sonucu ortaya çıkan kemoatraktan proteinler monositlerin dokuya çağrılmasında ve hasarlı enditele yapışmasında rol oynarlar. Yapılan insan ve hayvan deneylerinde makrofajların lezyonun olduğu bölgeye çağrılmasında monosit kemotaktik proteinin (MCP-1) rol oynadığı bulunmuştur.

Daha önce belirttiğimiz gibi östrojen farklı dokularda MCP-1'i azaltır, bu da aterosklerozdaki protektif etkilerinden birini oluşturur (69,71,72). Seli ve arkadaşlarının çalışmasında da Raloksifenin de insan koroner arter endotel hücrelerinde östrojen kadar etkin olmasa da MCP-1 mRNA ekspresyonunu azalttığı bulunmuştur (69).

Raloksifenin genomik olmayan ER α üzerinden MCP-1'in monositlerin göçüne yol açmasını engellediği, böylece ateroskleroza engel olabileceği bulunmuştur (74).

Statinler ise endotele monosit adezyonunu azaltır ve damar duvarından salınan MCP-1 ve TNF- α gibi pro-aterojenik sitokinlerin azaltılmasıyla oluşan antiinflamatuvar etkiler oluşturular (7).

Ovariectominin damar duvarında MCP-1 düzeyine olan etkisi ile ilgili çalışma literatürde tarafımızca bulunamamıştır. Yapmış olduğumuz deneyde ovariectomize rat aortasında MCP-1 düzeyinin orta kuvvette boyanma gösterdiğini, raloksifen kullanımı ile değişiklik göstermemesine rağmen statin kullanımı ile azalma olduğunu saptadık. Raloksifen kullanımının MCP-1 üzerine olan etkinliği literatürle uyumlu olmamasına karşın Statin kullanımının daha belirgin antiinflamatuvar etkinliğinin olabileceği ve monosit göçünü daha etkin azaltabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızdaki grupların hiçbirinde ER α boyanmasının yeterli düzeyde olmaması

Raloksifenin ER α üzerinden olabilecek etkisinin ortaya çıkmamış olabileceğini düşündürmüştür. Statin grubu ilaçların ise antiinflamatuvar etkilerini östrojen reseptörleri üzerinden gösteremedikleri sonucuna varılmıştır. Ancak statin grubu ilaçların HDL kolesterol üzerine olan etkilerinin ER α üzerinden cinse spesifik etkinliğinin olduğu bulunmuştur (115). Raloksifenin ve diğer östrojen benzeri preparatların monosit göçü üzerine etkileri ile ilgili daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Farklı dokularda farklı östrojen reseptörü bulunduğu bilinmektedir. Beyinde bazı bölgelerde ve kardiovasküler sistemde baskın olan reseptör ER β 'dir. Damar endotelinde ve düz kas hücrelerinde ER β bulunmaktadır (54). Koroner arterlerde ateroskleroza olan premenopozal kadınların koroner arterlerindeki düşük seviyedeki östrojen reseptörleri ile ateroskleroza olmayan damar duvarında bulunan östrojen reseptörleri arasındaki farklılıklar aterosklerozun gelişiminde östrojen reseptörünün ekspresyonunun etkili olabileceğini düşündürmüştür (26) .

Deney gruplarımızın hiçbirisinde yeterli düzeyde ER α boyanması saptanmamasına rağmen ER β saptanmıştır. Bu bulgu damar duvarında baskın olan östrojen reseptörünün beta olması bilgisi ile uyum sağlamaktadır. Ancak kontrol grubundaki aorta incelemelerinde ER α olmamasına rağmen ilaç uygulaması sonrası reseptörün hafif de olsa boyanmasını bu bulgularla açıklayabilmemiz mümkün görünmemektedir. Ayrıca kontrol grubundaki ER β (+++) iken atorvastatin grubunda (+), raloksifen grubunda (++) , raloksifen ve atorvastatin grubunda (+) bulunmuştur. Bunların tümü bizde, postmenopozal ateroskleroz gelişiminde östrojen reseptörleri ekspresyonundan bağımsız başka mekanizmaların daha fazla rolü olması gerektiği fikrini desteklemektedir.

TNF- alfa monositlerden salınan proinflamatuvar bir sitokindir ve intimal düz kas hücre proliferasyonuna yol açar. Ancak TNF reseptörlerinin aktivasyonu aynı zamanda apoptosis ile hücre ölümüne de yol açar. Aterom plaklarında yüksek miktarlarda bulunur, plakların yırtılmasında sorumlu tutulmuştur.

TNF reseptörlerinin endojen aktivasyonu ve hücrelerde apoptosise yol açması hasarlı duvarda düz kas hücre birikimini sınırlamaktadır. TNF-alfaya karşı antikör uygulaması

ile bu sitokin bağımlı apoptosis engellenmiştir(77). Apoptotik süreç matür plaklardaki hücre ölümünden sorumlu olabilir. İnflamatuar süreç aterosklerozun gelişiminde önemli rol oynar. Yapılan çalışmalarda bakteriyal lipopolisakkarit ile maruz bırakılan rat damar duvarı düz kas hücrelerinin interlekin-1, interlekin-6 ve TNF mRNA'sında artış bulunmuş (78) .

Bizim çalışmamızda da ovariektomi sonrası ratlarda endotelde TNF α immünohistokimyasal olarak tespit edilmiştir.

Hiperlipidemiye sekonder oluşan vasküler inflammatuar yanıtta da TNF rol alır. Yapılan bir çalışmada rat aortik düz kas hücre kültür ortamına düşük dansiteli lipoprotein eklenmesi ile TNF- alfa mRNA ve protein ekspresyonu artmıştır (80). Aynı etkinin in vivo oluşup oluşmadığı araştırıldığında LDL verilmesinden 24 saat sonra aorta ve diğer büyük damarlarda TNF- alfa immünreaktivitesi tespit edildi. Bu da bize lipidlerin TNF- alfayı uyararak inflammatuar süreç başlatıp ateroskleroza neden olduklarını gösterir (80).

Yapmış olduğumuz deneyde kontrol grubunda tespit ettiğimiz TNF α boyanmasını raloksifen ve atorvastatin kullanımı ile baskıladık. Özellikle atorvastatin kullanımının TNF α düzeylerini raloksifene göre daha iyi baskıladığını söyleyebiliriz. Her iki ilacın birlikte kullanımında additif bir etki görülmedi ama yine de TNF α düzeylerinde azalma tespit edildi. Statinlerin antiinflammatuar etkinliklerinin raloksifene kıyasla daha belirgin olduğunu belirtebiliriz. Bulgularımız literatürle desteklenmektedir. Östrojenin antioksidan özelliği TNF α üzerinden olabilir (81) ancak raloksifenin etki mekanizmasının karmaşıklığı etkinliğini anlamak konusunda daha çok çalışmanın yapılması gerekliliğini doğuruyor.

Statinlerin makrofajlarda biriken lipidlere ve makrofajlardan salınan sitokinelere direkt etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, lipid birikiminin engellenemediği ancak IL-1 beta, IL-8 ve TNF- alfa sekresyonunu azalttığı bulundu (82)

Fonksiyonel Fas ligand açısından defektif farelerde yapılan çalışmada Aprahamian T ve arkadaşları serum TNF-alfa ve interferon gamma seviyeleri azalmış, lenf nodlarında ise IL-4 ve IL-10 seviyeleri artmış bulunmuştur (83). Yazarlar statinlerin

antiinflamatuvar aktivitelerinin hem ateroskleroz hem de otoimmünitenin düzeltilmesinde kullanılabileceğini vurgulamışlardır (83). Bizim de vurguladığımız gibi statinler antiinflamatuvar etkinlikleri raloksifene göre daha yüksek olan ajanlardır.

Endotelin-1 (ET-1) NO gibi vasküler endotelden salınıp onu nötralize etme yönünde etki gösteren vazoaktif bir ajandır. Reseptörleri üzerinden vazokonstriksiyon yapar. Endotel disfonksiyonu aterosklerozun erken basamağını oluşturur. Aterosklerotik plağı olan hastalarda endotelin-1 seviyeleri, hücre hasarına karşı verilen cevaptan dolayı artmıştır.

Bu tez çalışmamızda ET-1 seviyeleri ovariektomi sonrasında yoğun immunreaktivite göstermiştir. Ovariektomize ratlarda östrodiolun ET-1 üzerine olan etkisini araştıran çalışmalarda plasma ET-1 seviyeleri ovariektomi sonrası artış gösterirken östradiol verilmesi sonrası düşüş göstermiştir (116). Bizim çalışmamızda da yoğun immünreaktivite göstermiş olan ET-1 seviyeleri raloksifen kullanımı ardından azalmıştır. Raloksifen de östrojen reseptör β üzerinden etki ederek endotel disfonksiyonunu düzeltme yönünde hareket etmektedir. Endotelin-1 seviyelerinin oral hormon tedavisinde ve raloksifen tedavisinde plasmada azaldığını destekleyen çalışmalar mevcuttur (68). Ancak yine de yapılan çalışmalarda raloksifenin ET-1 üzerine etkileri konusunda fikir birliği yoktur. Raloksifen tedavisinde plasmada azaldığını kaydeden çalışmalar kadar (68) 12 haftalık tedavi sonrası ET-1 seviyelerinin değişmediğini belirten çalışmalar da mevcuttur (68).

Statin verdiğimiz çalışma grubumuzda da ET-1 immünreaktivitesinde raloksifen benzeri bir azalma tespit ettik. Literatürde atorvastatinin cerivastatin gibi ET-1 mRNA'sında azalmaya neden olmadığını gösteren çalışma olmasına rağmen (117) literatürdeki diğer çalışmalar atorvastatinin de ET-1 sentezini azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (7). Her iki ilacı birlikte kullandığımızda ise ET-1 immünreaktivitesi tek tek kullanımdan daha az seviyelere inmiştir. Diğer markerlarda göremediğimiz bu additif etki farklı yollar üzerinden etki ettiğini düşündürmekte ve yeni çalışmaların yapılması gerektiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda eNOS, iNOS, ET-1, gibi aterosklerozun damar yatağındaki endotel disfonksiyonundan ve MCP-1, TNF- α gibi inflamatuvar cevabın rolünden etkilendiğini

gösteren markerlarda atorvastatin verilmiş grupta daha belirgin bir azalma tespit ettik. Raloksifen grubunda ise literatürde belirtilen östrojenin etkilerini netlikle izleyemedik. Kontrol grubunda eNOS immünoreaktivitesi iNOS aktivitesine oranla daha belirgin iken en yoğun aktiviteyi ET-1 göstermiştir. TNF- α ve MCP-1 orta kuvvette boyanmıştır. Atorvastatin verilmesi ile tüm markerlarda azalma saptanmıştır. Raloksifen grubunda ise bu belirgin azalma TNF- α ve ET-1 grubunda olmuştur. eNOS ve MCP-1 immünreaktivitesinde ise beklenen değişiklik oluşmamıştır.

Biz çalışmamızda ateroskleroza resistan olduğu belirtilmiş ratları kullandık. Ancak daha önce bir ekip tarafından önemine dikkat çekilen yaşlı ratları seçtik (93). Ateroskleroz gelişiminde hiperlipidemi dışında endotel disfonksiyonu gibi ilk basamakları ve menopozal durumun etkisini incelemek istediğimiz için böyle bir tercih yaptık. Elde ettiğimiz sonuçlar belki de aterosklerozun ilk basamaklarında endotel disfonksiyonu ve inflamatuvar cevabın varlığına rağmen hiperlipideminin de göz ardı edilemeyeceğini desteklemektedir. Ancak yine de menopozal durumun endotel disfonksiyonu oluşturduğunu ve ateroskleroza zemin hazırladığını belirtebiliriz.

Postmenopozal kadınlarda beraber kullanım bulan bu iki ilaç grubu genellikle menopozal durumun ilk yıllarında değil ilerleyen yaşlarda birlikte kullanılmaktadır. Oysaki ilerleyen yıllarda ortaya çıkacak aterosklerozun ilk adımları yıllar öncesinden atılmaktadır ve dolayısıyla engellenmesine yönelik adımlara da erken başlanmalıdır. İki ilacın birlikte kullanıldığı çalışma grubumuzda markerlarımızda genel olarak bir azalma tespit ettik. Bu bulgular sonucunda farklı yollar kullanan bu iki ilacın birlikte kullanımının daha etkin olabileceğini düşünebiliriz.

Tıp bilimi ilerledikçe bilgilerimiz değişmekte ve yenilenmektedir. Yapılan çalışmalar bu ilerlemelere ve değişime ışık tutmaktadır. Kadın sağlığının önemli bir bölümünü kapsayan menopozal dönemle ilgili olarak da her geçen gün yeni çalışmalar yapılmakta ve sonuçları ufukumuzu açmaktadır. Biz de yaptığımız bu tez çalışmasının bu dönemin ciddi bir sağlık problemi olan ateroskleroz ve buna bağlı kardiovasküler hastalıklardan korunma ve bu hastalıkların tedavisine ışık tutmasını ve soru işaretleri uyandırarak yeni çalışmalara yol açmasını umuyoruz.

6. SONUÇ

Postmenopozal dönem endotel disfonksiyonu oluşturup ateroskleroza zemin hazırlamaktadır.

Aterosklerozun ilk basamaklarında endotel disfonksiyonu ve inflamatuvar cevabın varlığına rağmen hiperlipideminin de göz ardı edilemeyeceğinaçıktır. Postmenopozal ateroskleroz gelişiminde östrojen reseptörleri ekspresyonundan bağımsız başka mekanizmaların daha fazla rolü olabilir.

Statin grubu ilaçların ise antiinflamatuvar etkilerini östrojen reseptörleri üzerinden gösteremedikleri sonucuna varılmıştır

Atorvastatin kullanımı ile inflamatuvar markerlarda belirgin azalma saptanmıştır, anti-inflamatuvar etkinliği raloksifenden daha belirgindir. Ateroskleroz gelişim basamaklarına daha etkin bir katılımı mevcuttur.

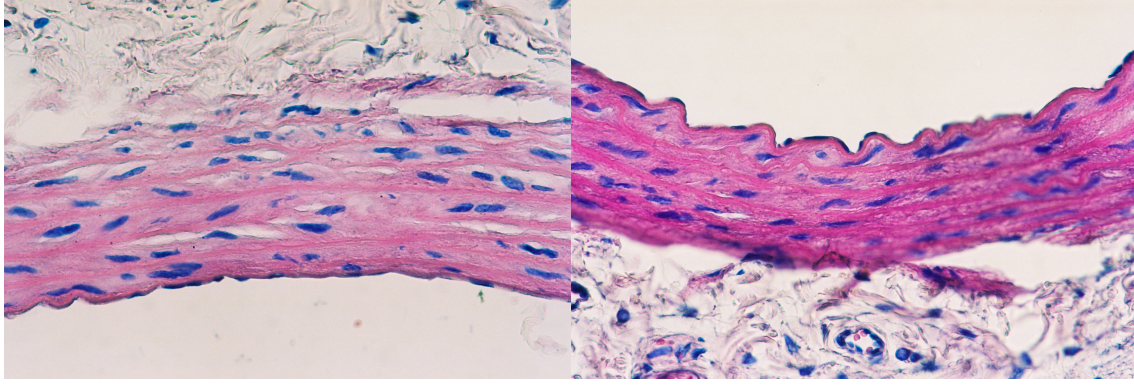
Raloksifen kullanımı ile oluşan damar yatağı değişiklikleri östrojenin kendisinin göstermekte olduğu koruyucu özelliği taşımamaktadır. Raloksifenin etki mekanizmasının netleştirilmesi için çalışmalara ihtiyaç vardır.

Raloksifenin ve diğer östrojen benzeri preparatların monosit göçü üzerine etkileri ile ilgili daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Östrojenin antioksidan özelliği TNF α üzerinden olabilir ancak raloksifenin etki mekanizmasının karmaşıklığı etkinliğini anlamak konusunda daha çok çalışmanın yapılması gerekliliğini doğuruyor.

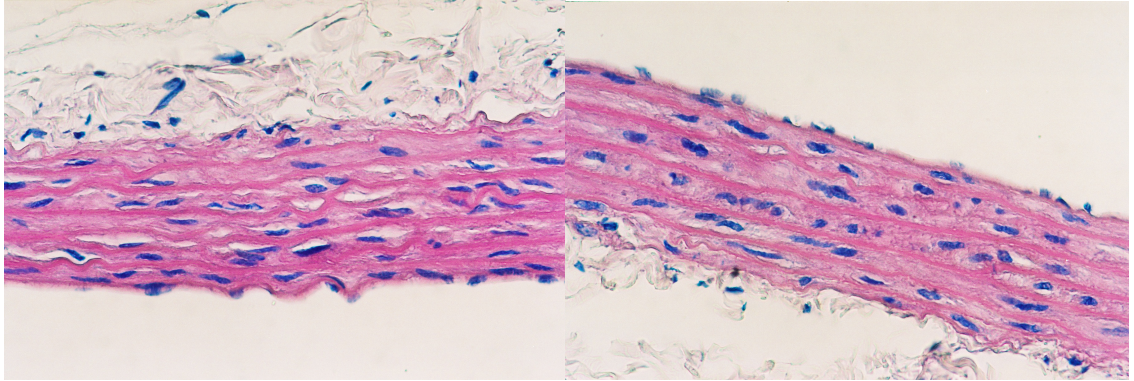
Bu bulgular sonucunda farklı yollar kullanan bu iki ilacın birlikte kullanımının daha etkin olabileceğini düşünebiliriz ancak yeni çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

7. RESİMLER:



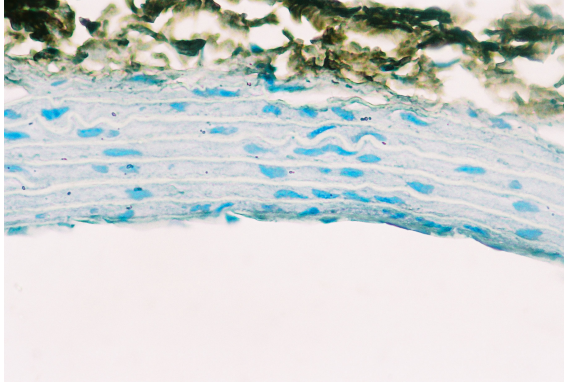
Resim1a: HE ile boyanmış kontrol grubu

Resim1b: HE ile boyanmış Atorvastatin grubu

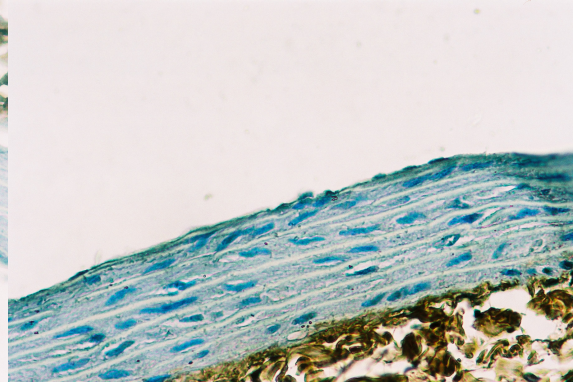


Resim1c: HE ile boyanmış Raloksifen grubu

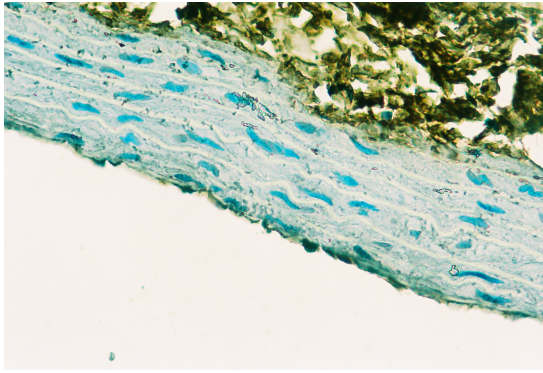
Resim1d: HE ile boyanmış Ralok-Atorv grubu



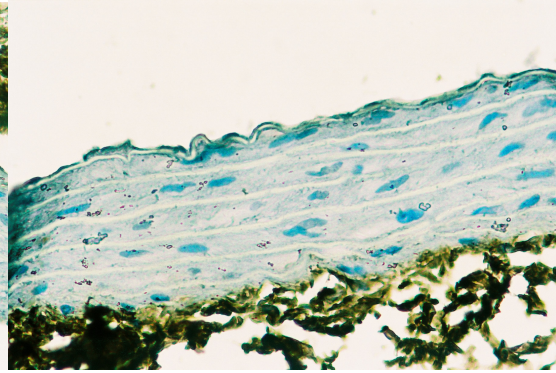
Resim2a: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış ER α kontrol grubu



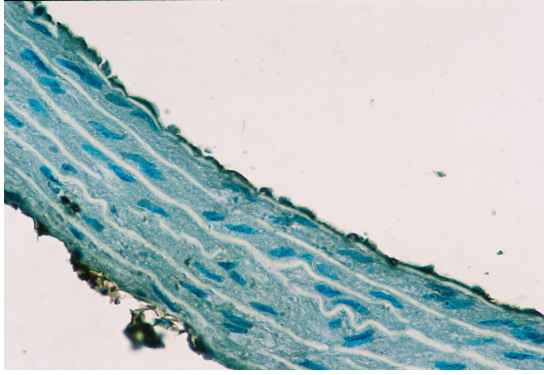
Resim2b: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış ER α Atorvastatin grubu



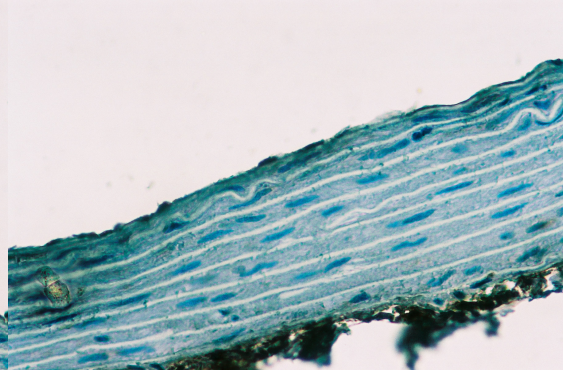
Resim2c: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış ER α Raloksifen grubu



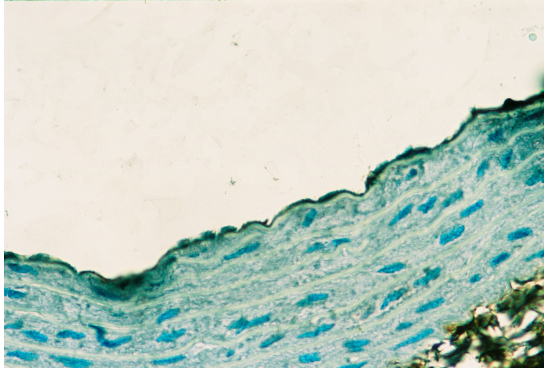
Resim2d: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış ER α Ralok-Atorv grubu



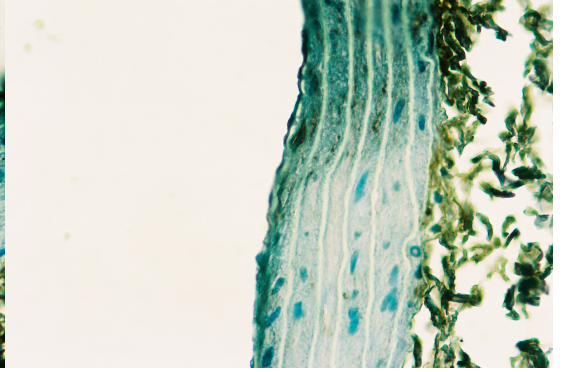
Resim3a: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış ER β kontrol grubu



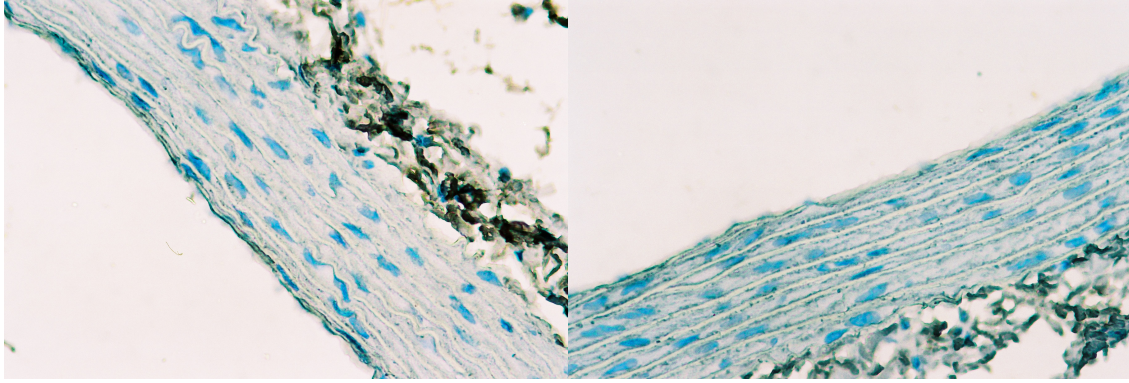
Resim3b: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış ER β Atorvastatin grubu



Resim3c: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış ER β Raloksifen grubu

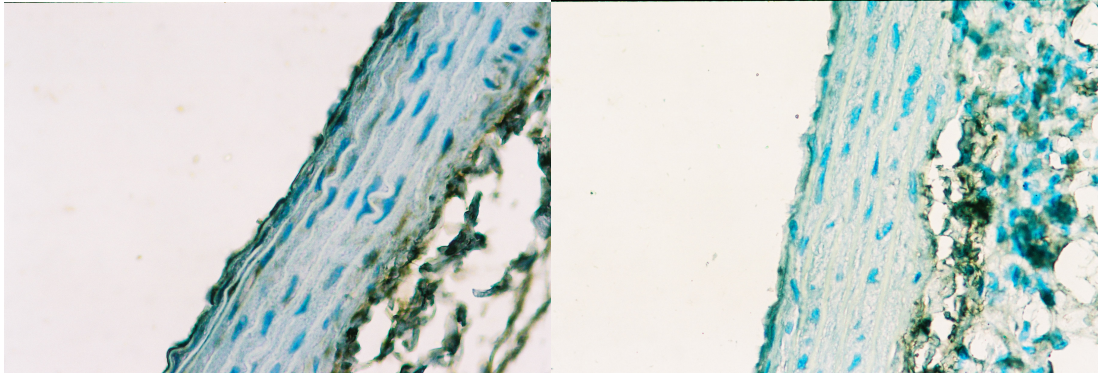


Resim3d: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış ER β Ralok-Atorv grubu



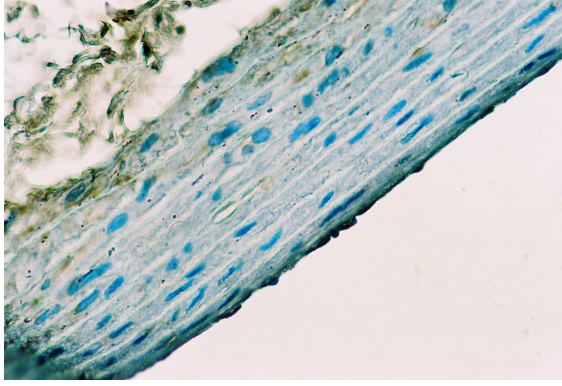
Resim4a: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış iNOS kontrol grubu

Resim4b: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış iNOS Atorvastatin grubu

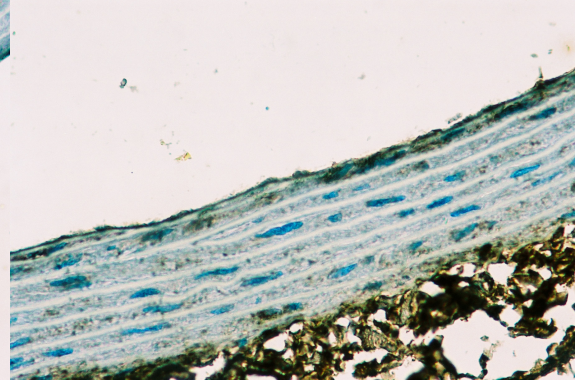


Resim4c: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış iNOS Raloksifen grubu

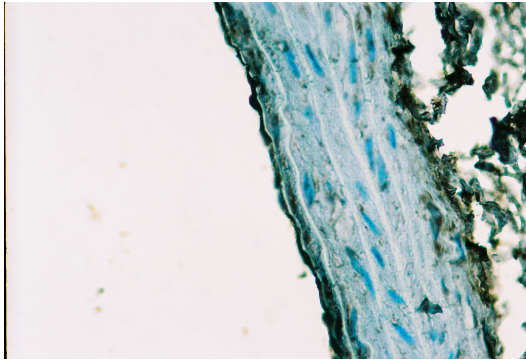
Resim4d: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış iNOS Ralok-Atorv grubu



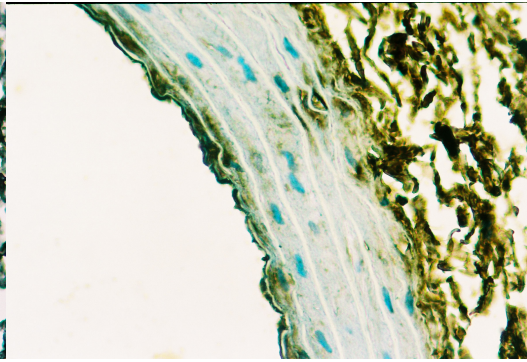
Resim5a: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış eNOS kontrol grubu



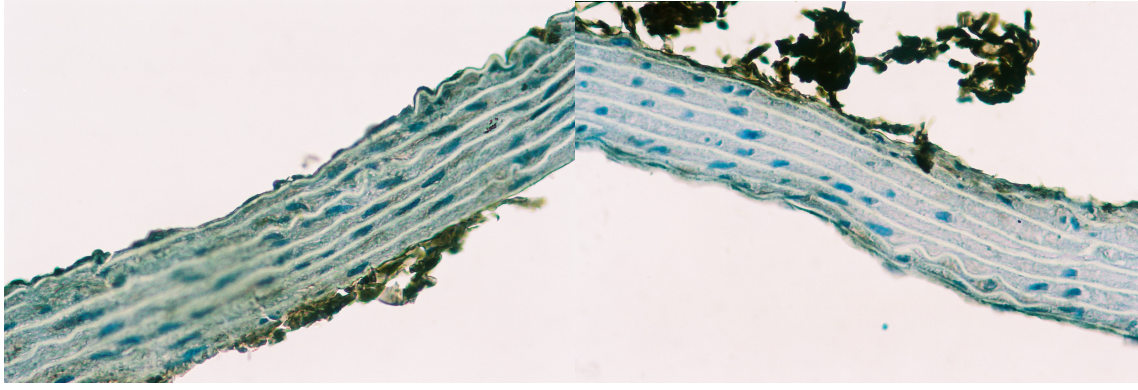
Resim5b: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış eNOS Atorvastatin grubu



Resim5c: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış eNOS Raloksifen grubu

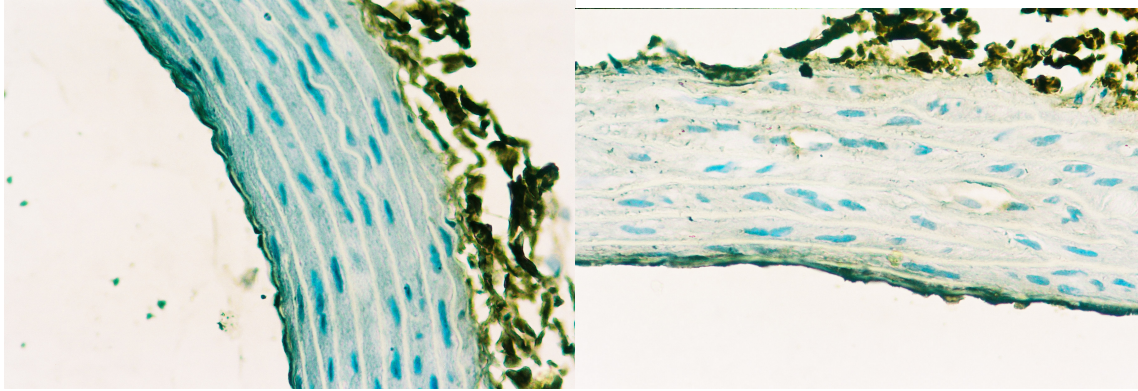


Resim5d: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış eNOS Ralok-Atorv grubu



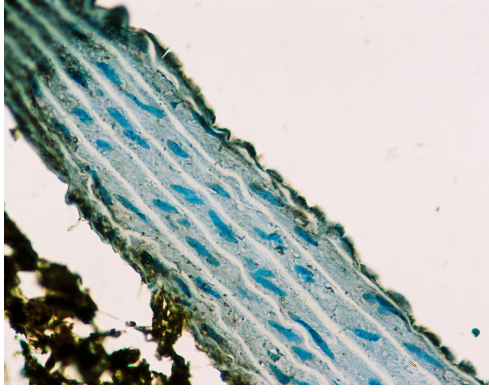
Resim6a: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış TNF α kontrol grubu

Resim6b: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış TNF α Atorvastatin grubu

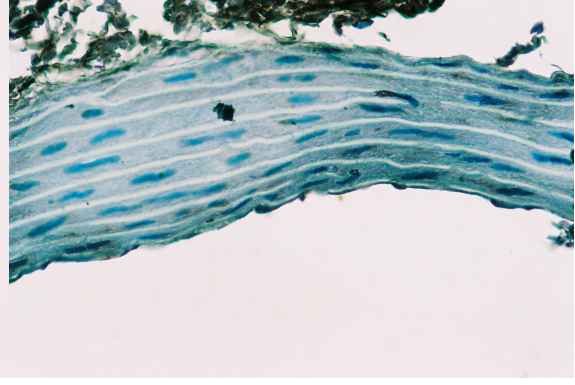


Resim6c: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış TNF α Raloksifen grubu

Resim6d: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış TNF α Ralok-Atorv grubu



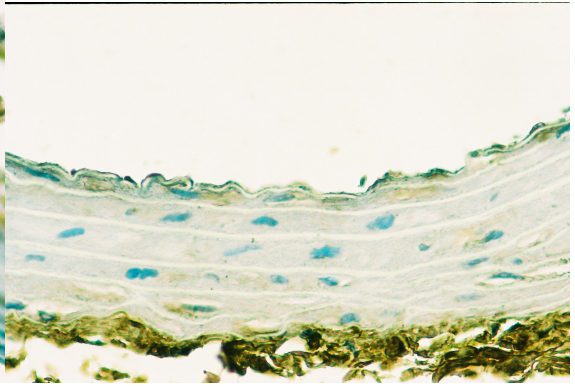
Resim7a: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış ET-1 kontrol grubu



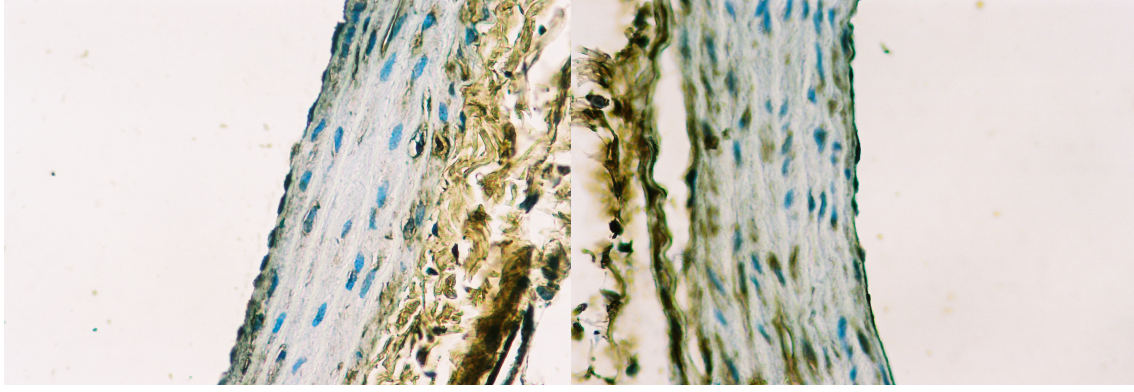
Resim7b: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış ET-1 Atorvastatin grubu



Resim7c: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış ET-1 Raloksifen grubu

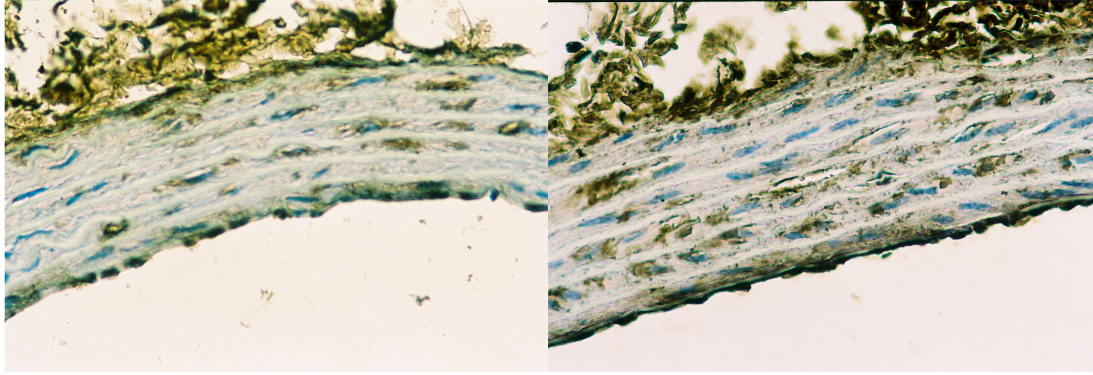


Resim7d: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış ET-1 Ralok-Atorv grubu



Resim8a: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış MCP-1 kontrol grubu

Resim8b: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış MCP-1 Atorvastatin grubu



Resim8c: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış MCP-1 Raloksifen grubu

Resim8d: İmmünohistokimyasal olarak boyanmış MCP-1 Ralok-Atorv grubu

8. KAYNAKLAR:

- 1) Sitruk-Ware, Ibara de Palacios: Oestrogen replacement therapy and cardiovascular disease in postmenopausal women: A review. *Maturitas* 1989; 11: 259-274.
- 2) Aksu M.F: Menopoz Versus Andropoz(in) Cerrahpaşa Kadın Doğum Kliniği Beş Yıllık Bilimsel Etkinlikler Kitabı (ed)M.F. Aksu, İstanbul universitesi Basimevi İstanbul 1999;63-64.
- 3) Lemer DJ, Kannel WB. Patterns of coronary disease morbidity and mortality: 26 year follow-up of the Framingham population. *Am Heart J* 1986; 111: 383.
- 4) Herrington DM, Vittinghoff E, Lin F, Fong J, Harris F, Hunninghake D, Bittner V, Schrott HG, Blumenthal RS, Levy R, HERS Study Group. Statin Therapy, Cardiovascular Events, and Total Mortality in the Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS). *Circulation* 2002;105: 2962-2967.
- 5) Writing Group for The Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. *JAMA* 2002; 288:321-333
- 6) Elizabeth Barrett-Connor; Deborah Grady; Andreas Sashegyi; Pamela W. Anderson Raloxifene and Cardiovascular Events in Osteoporotic Postmenopausal Women: Four-Year Results From the MORE (Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation) Randomized Trial *JAMA*, Feb 2002; 287: 847 - 857
- 7) Almuti K, Rimawi R, Spevack D, et al. Effects of Statin beyond lipid lowering: Potential for clinical benefits. *International Journal of Cardiology* 2006; 109 : 7-15
- 8) Speroff L, Glass R.H, Kase N.G: *Clinical Gynecologic Endocrinology And Infertility*. Sixth Edition. 1999;p672.
- 9) Wilson P.W.F. *Atlas Of Atherosclerosis Risk Factors And Treatment*. Second Edition. 2000.
- 10) Rohde LE, Lee RT, Rivero J, et al. Circulating cell adhesion molecules are correlated with ultrasound-based assesment of carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18: 1765- 1770.
- 11) World Health Organization. *Research the Menopause in the 1990s*. Report of a WHO Scientific Group. Geneva. WHO, 1996.
- 12) Brambrilla DJ, McKinlay SM. A Prospective study of factors affecting age at menopause. *J Clin epidemiol* 1987;47: 94- 100.
- 13) Siddle N, Sarrel P, Whitehead M. The effect of hysterectomy on the age at ovarian failure: identification of a subgroup of women with premature loss of ovarian function and literature review. *Fertil Steril* 1987;47- 94.
- 14) Ekmekçi S, Görkmen O, Ergin Ö ve ark. Menopozdaki Türk kadını popülasyonunda bir istatistiki çalışma. *Jin Obs Yeni Geliş* 1994;5,200.
- 15) Ertüngealp E, Seyisoğlu H. *Menopoz ve Osteoporoz*. 2000.
- 16) Eaker ED, Chesebro JH, Sacks FM: Cardiovascular disease in women. *Circulation* 1993; 88:1999-2009.
- 17) American Heart Association: *1997 Heart and Stroke Facts: Statistical Update*. Dallas, Texas, American Heart Association, 1996.
- 18) Junquera LC, Carneiro J, Kelley RO: *Basic Histology*. Eighth Edition, 1995 by Appleton and Lange.p202.
- 19) Hubbard RW, Ono Y, Sanchez H, Atherogenic effect of oxidized products of cholesterol. *Prog Food Nutr Sci* 1989;13: 17-44.

- 20) Stenbes We. The lipid hypothesis and the role hemodynamics in atherogenesis. *Prog cardiovasc Dib* 1990;33: 36-119.
- 21) Chung HK, Lee IK, Kang H, Suh JM, Kim H, Park KC, Kilm DW, Kim YK, Ro HK, Shong M. Statin inhibits interferon-gamma-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Experimental and Molecular Medicine* 2002; 34: 451-461.
- 22) Antus B, Yao Y, Song E, Liu S, Lutz J, Heemann U, 2002. Opposite effects of testosterone and estrogens on chronic allograft nephropathy. *Transplant Int* 15:494-501.
- 23) Koh KK, Cardillo C, Bui MN, et al. Vascular effects of estrogen and cholesterol lowering therapies in hypercholesterolemic postmenopausal women. *Circulation* 1999; 99: 354-360
- 24) Barret-Connor E, Bush TL, 1991. Estrogen and coronary heart disease in women. *Journal of the American Medical Association* 265(14): 1861-1867.
- 25) Samaan SA, Crawford MH, 1995. Estrogen and cardiovascular function after menopause. *Journal of the American College of Cardiology* 26(6):1403-1410.
- 26) Speroff L, Glass R.H, Kase N.G: *Clinical Gynecologic Endocrinology And Infertility*. Sixth Edition.1999: 56- 57
- 27) Hiroi H, Inoue S, Watanabe T, et al. Differential immunolocalization of estrogen receptor alpha and beta in rat ovary and uterus. *Journal of Molecular Endocrinology* 1999;22: 37-44
- 28) Karas RH, Patterson BL, Mendelsohn ME 1994. Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. *Circulation* 89:1943-1950.
- 29) Losordo DW, Kearney M, Kim EA, Jekanowski J, Isner JM, 1994. Variable expression of the estrogen receptors in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women. *Circulation* 89:1501-1510.
- 30) Ralevic V, Lincoln J, Burnstock G, Ryan US, Rubanyi GM(eds) 1992. *Endothelial regulation of vascular tone*. Marcel Dekker, Inc, New York, ch 18,pp 297-328.
- 31) Morales DE, McGowan KA, Grant DS, Maheshwari S, Bhartiya D, Cid MC, Kleinman HK, Schnaper HW, 1995. Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model. *Circulation* 91:755-763.
- 32) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yuzaki Y, Goto K, Masaki T, A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 411-415.
- 33) Dubin D, Pratt RE, Cooke JP, Dzau VJ, 1989. Endothelin, a potent vasoconstrictor, is a vascular smooth muscle mitogen. *Journal of Vascular Medicine and Biology* 1:150-154.
- 34) Bell DR, Rensberger HJ, Koritnik DR, Koshy A. Estrogen pretreatment directly potentiates endothelium dependent vasorelaxation of porcine coronary arteries. *American Journal of Physiology* 1995; 268: H377-H383.
- 35) Reis SE, Gloth ST, Blumenthal RS, Resar JR, Zacur HA, Gerstenblith G, Brinker JA, 1994. Ethinyl estradiol acutely attenuates abnormal coronary vasomotor responses to acetylcholine in postmenopausal women. *Circulation* 89:52-60.
- 36) Fraser IS, Jansen RPS, Lobo RA, Whitehead MI. Estrogens and Progesterons in *Clinical Practice* 1998; Chapter 19: 215- 223
- 37) Yagi K, Komura S. Inhibitory effect of female hormones on lipid peroxidation. *Biochem int* 1986; 13:1051-1055.

- 38) Anggard E. Nitric Oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* 1994; 343:1199-1206.
- 39) Harder DR, Coulsan PB. Estrogen receptors and effects of estrogen on membrane electrical properties of coronary vascular smooth muscle. *J Cell Physiol* 1979; 100:375-382.
- 40) Chang W-C, Nakao J, Orimi H, Murota SL. Stimulation of prostoglandin cyclooxygenase and prostocyclin synthetase activities by estradiol in rat aortic smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1980; 620: 472-482.
- 41) Gilligan DM, Quyyumi AA, Cannon III RO. Effects of physiological levels of estrogen on coronary vasomotor function in postmenopausal women. *Circulation* 1994;89:2545,
- 42) Roquel M, Heras M, Roig E, Masotti M, Rigol M, Betriu A, Balasch J, Sanz G. Short term effects of transdermal estrogen replacement therapy on coronary vascular reactivity in postmenopausal women with angina pectoris and normal results on coronary angiograms. *Jam Coll Cardiol* 31:139,1998.
- 43) Guetta V, Quyyumi AA, Prasad A, Panza JA, Waclawiw M, Cannon III RO. The role of nitric oxide in coronary vascular effects of estrogen in postmenopausal women. *Circulation* 96:2795,1997.
- 44) Iafrafi MD, Karas RH, Aronovitz M, Kim S, Sullivan Jr TR, Lubahn DB, O'Donnell Jr TF, Korach KS, Mendelsohn ME. Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor alpha-deficient mice. *Nat Med* 1997;3:545
- 45) Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson J-A. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:4258
- 46) Espeland MA, Applegate W, Furberg CD, Lefkowitz D, Rice L, Hunninghake D, the ACAPS Investigators. Estrogen replacement therapy and progression of intimal-medial thickness in the carotid arteries of postmenopausal women. *Am J Epidemiol* 1995;142:1011
- 47) Krasinski K, Spyridopoulos I, Asahara T, van der Zee R, Isner JM, Losordo DW. Estradiol accelerates functional endothelial recovery after arterial injury. *Circulation* 1997;95:1768
- 48) Spyridopoulos I, Sullivan AB, Kearney M, et al. Estrogen receptor mediated inhibition of human endothelial cell apoptosis. Estradiol as a survived factor. *Circulation*, 1997; 95:1505
- 49) Collins P, Rosano GM, Jiang C, Lindsay D, Sarrel PM, Poole-Wilson PA. Cardiovascular protection by estrogen – a calcium antagonism effect? *Lancet* 1993;341:264,
- 50) Gilligan DM, Badar DM, Panza JM, Quyyumi AA, Cannon III RO. Acute vascular effects of estrogen in postmenopausal women. *Circulation* 1994; 90: 786.
- 51) Sack MN, Rader DJ, Cannon III RO. Oestrogen and inhibition of oxidation of low- density lipoproteins in postmenopausal women. *Lancet* ,1994;343:269
- 52) Bredt DS, Synder SH. Nitric oxide : a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 1994; 63:175-195.
- 53) Feldman PL, Griffith OW, Stuehr DJ. The suprising life of nitric oxide. *Chem Eng News* 1993; 71: 26-38.
- 54) Lancaster JR, Parkinson JF. Nitric oxide, cytochromes P450 and sexual steroid hormones. *Ernst Schering Research Foundation Workshop* 1997;21:2-

- 55) Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S, Michel T. 1992, Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Letters* 307:287-293
- 56) Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 1774-1777.
- 57) Simoncini T, Varone G, Fornari L, Mannella P, Luisi M, Labrie F, Genazzani AR. 2002, Genomic and nongenomic mechanisms of nitric oxide synthesis induction in human endothelial cells by a fourth-generation selective estrogen receptor modulator. *Endocrinology* 143,2052-2061
- 58) Okano H, Jayachandran M, Yoshikawa A, Miller M.V. Differential Effects of Chronic Treatment with Estrogen Receptor Ligands on Regulation of Nitric Oxide Synthase in Porcine Aortic Endothelial Cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 47: 621-628.
- 59) Ogita H, Node K, Asanuma H, Sanada S, Liao Y, Takashima S, Asakura M, Mori H, Shinozaki Y, Hori M, Kitakaze M. 2002, Amelioration of ischemia-and reperfusion –induced myocardial injury by the selective estrogen receptor modulator, raloxifene, in the canine heart. *J Am Coll Cardiol* 40,998-1005.
- 60) Wassmann S, Laufs U, Stamenkovic D, et al. Raloxifen Improves Endothelial Dysfunction in Hypertension by Reduced Oxidative Stress and Enhanced Nitric Oxide Production. *Circulation* 2002;105: 2083-2091
- 61) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376
- 62) Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biology activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.
- 63) Simoncini T, Genazzani AR, Liao JK. Nongenomic mechanisms of endothelial nitric oxide synthase activation by the selective estrogen receptor modulator raloxifen. *Circulation* 2002;105:1368-73
- 64) Figtree GA, Lu Y, Webb CM, et al. Raloxifen acutely relaxes rabbit coronary arteries in vitro by an estrogen receptor dependent and nitric oxide dependent mechanism. *Circulation* 1999;100:1095-101
- 65) Nemcsik J, Morschl E, Egresits J, et al. Raloxifen Lowers Ischemia Susceptibility by increasing nitric oxide generation in the heart of ovariectomized rats in vivo. *European Journal of Pharmacology* 2004;495:179-184
- 66) Pavo I, Laszlo F, Morschl E, et al. Raloxifen an estrogen receptor modulator prevents decreased constitutive nitric oxide and vasoconstriction in ovariectomized rats. *European Journal of Pharmacology* 2000;410:101-104
- 67) Mathew V, Hashadi D, Lerman A. The role of endothelin in coronary atherosclerosis. *Mayo Clin Proc*, 1996;71:769-777
- 68) Vovelgang TE, Mooren MJ, Mijatovic V, et al. Emerging Selective Estrogen Receptor Modulators. *Drugs* 2006; 66(2):191-221
- 69) Seli E, Selam B, Mor G et al. Estradiol regulates monocyte chemoattractant protein-1 in human coronary artery smooth muscle cells: a mechanism for its antiatherogenic effect. *Menopause* 2001;8(4): 296- 301
- 70) Yla-Hertuala SY, Lipton BA, Rosenfeld ME et al. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:1121-1127

- 71) Frazier- Jessen MR, Kovacs EJ. Estrogen modulation of JE/ monocyte chemoattractant protein-1 mRNA expression in murine macrophages. *J Immunol* 1995;154:1838-1845
- 72) Arıcı A, Senturk LM, Seli E et al. Regulation of monocyte chemotactic protein-1 expression in human endometrial stromal cells by estrogen and progesterone. *Biol Reproduction* 1999;62:85-90
- 73) Seli E, Pehlivan T, Garcia-velasco JA et al. estrogen inhibits monocyte chemotactic protein-1 production in human coronary artery endothelial cells: a mechanism for its antiatherogenic effect. *Proceedings of the 46th Annual Meeting of the Society of Gynecologic Investigation*. Atlanta, GA, 1999
- 74) Yada- Hashimoto N, Nishio Yukihiko, Ohmichi M et al. Estrogen and raloxifene inhibit the monocytic chemoattractant protein-1- induced migration of human monocytic cells via nongenomic estrogen receptor alpha. *Menopause* 2006;13(6):0-0
- 75) Mitchell MD, Trautman MS, Dudley DJ. Cytokine networking in the placenta. *1993;14: 249- 75,*
- 76) Abbas A, Lichtman A, Pober S. *Cellular and Molecular Immunology*. 3rd Edition, 4- 193, 353- 361, Saunders, Philadelphia 1997
- 77) Niemann-Jonsson A, Ares MP, Yan ZQ. Increased rate of apoptosis in intimal arterial smooth muscle cells through endogenous activation of TNF receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 Dec;21(12):1909- 14
- 78) Detmer K, Wang Z, Warejcka D et al. Endotoxin stimulated cytokine production in rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Aug;281(2):H661
- 79) Goetze S, Xi XP, Kawano Y, TNF-alpha-induced migration of vascular smooth muscle cells is MAPK dependent. *Hypertension*. 1999 Jan;33(1 Pt 2):183- 9.
- 80) Niemann-Jonsson A, Dimayuga P, Jovinge S et al. Accumulation of LDL in rat arteries is associated with activation of tumor necrosis factor-alpha expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Oct;20(10): 2205- 11.
- 81) Walsh BA, Mullick AE, Walzem RL, Rutledge JC. 17beta-estradiol reduces tumor necrosis factor-alpha-mediated LDL accumulation in the artery wall. *J Lipid Res*. 1999 Mar;40(3): 387- 96.
- 82) Lindholm MW, Nilsson J. Simvastatin stimulates macrophage interleukin-1beta secretion through an isoprenylation-dependent mechanism. *Vascul Pharmacol*. 2007 Feb;46(2): 91- 6.
- 83) Aprahamian T, Bonegio R, Rizzo J et al. Simvastatin treatment ameliorates autoimmune disease associated with accelerated atherosclerosis in a murine lupus model. *J Immunol*. 2006;177(5): 3028- 34.
- 84) Lewis JS, Jordan VC. Selective estrogen receptor modulators (SERMs): Mechanisms of anticarcinogenesis and drug resistance. *Mutation Research*. 2005; 591: 247- 263.
- 85) Early Breast Cancer Trialists` Collaborative Group (EBTCG), Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials, *Lancet* 1998;351:1451- 1467.
- 86) Gluck O, Maricic M. Raloxifen: İskelet ve iskelet-dışı etkilerine ilişkin son bilgiler. *Current opinion in Rheumatology* 2002, 14: 429- 432.
- 87) Pettersson K, Delaunay F, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta act as a dominant regulator estrogen signaling, *Oncogene* 2000; 19: 4878- 4970.
- 88) Tee MK, Rogatsky I, Tzagarakis-Foster C, Cvoro A, An J, Christy RJ, Yamamoto KR, Leitman DC. Estradiol and Selective Estrogen Receptor

- Modulators Differentially Regulate Target Genes with Estrogen Receptors α and β . *Molecular Biology of the Cell*. 2004; 15: 1262-1272.
- 89) Lonard DM, Smith CL. Molecular perspectives on selective estrogen receptor modulators (SERMs): progress in understanding their tissue-specific agonist and antagonist actions. *Steroids* 2002;67: 15-24.
 - 90) Sato M, Rippey MK, Bryant HU. Raloxifene, tamoxifene, nafoxidine, or estrogen effects on reproductive and nonreproductive tissues in ovariectomized rats. *FASEB J*. 1996; 10: 905-912.
 - 91) Clarkson TB. Progression and regression of nonhuman primate coronary artery atherosclerosis: considerations of experimental design. In : Malinow MR, Blanton VH, eds. *Regression of atherosclerotic lesions*. New York: Plenum Press. 1984: 43- 60.
 - 92) Saitta A, Altavilla D, Cucinitta D, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled study on effects of raloxifene and hormone replacement therapy on plasma NO concentrations, endothelin-1 levels, and endothelium-dependent vasodilation in postmenopausal women. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1512- 9.
 - 93) Wong CM, Yao X, Au CL, Tsang SY, Fung KP, Laher I, Vanhoutte Pm, Huang Y. Raloxifene prevents endothelial dysfunction in aging ovariectomized female rats. *Vascular Pharmacology* 2006; 44: 290-298.
 - 94) Barrett- Connor E, Mosca L, Collins Peter. Effects of Raloxifene on Cardiovascular Events and Breast Cancer in Postmenopausal Women (RUTH). *N Engl J Med* 2006;355:125-137
 - 95) Kayaalp SO. *Tıbbi Farmakoloji, altıncı baskı* 1993:563-573.
 - 96) Kleemann R, Princen HMG, Emeis JJ, et al. Rosuvastatin reduces atherosclerosis development beyond and independent of its plasma cholesterol-lowering effect in APOE*3-Leiden transgenic mice: evidence for antiinflammatory effects of rosuvastatin . *Circulation* 2003; 108: 1368-74.
 - 97) Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks F, Braunwald E. Long term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. *Circulation* 1999; 100: 230-5.
 - 98) Ridker PM, Cannon CP, Morrow D, et al. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Eng J Med* 2005; 352:20-8.
 - 99) Endres M, Laufs U. Effects of statins on endothelium and signaling mechanisms. *Stroke* 2004; 35(1): 2708-11.
 - 100) O Driscoll G, Green D, Taylor RR. Simvastatin , an HMG-coA reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month. *Circulation* 1997; 95: 1126-31
 - 101) Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Eng J Med* 1999; 340: 115-26.
 - 102) Williams JK, Sukhova GK, Herrington DM et al. Pravastatin has cholesterol-lowering independent effects on the artery wall of atherosclerotic monkeys. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 684-91
 - 103) Moghadasian MH. Experimental atherosclerosis, A historical overview. *Life Sciences* 2002; 70: 855-865.
 - 104) Sharouni E, Flevari P, Kroupis C, Kyriakides ZS, Koniavitou K, Kremastinos DT. The effects of Raloxifene and Simvastatin on Plasma Lipids and Endothelium. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 2003; 17: 319-323.

- 105) Tamura K, Yamaguchi K, and Kogo H. 17- β -Oestradiol inhibits ovariectomy-induced expression of inducible nitric oxide synthase in rat aorta in vivo. *Life Sci.* 2000; 66: 259-264.
- 106) Wu S, Ruan Y, Zhu X, and Lai W. Estrogen receptors and the activity of nitric oxide synthase in the artery of female rats receiving hormone replacement therapy. *Horm Res* 2000; 53: 144-147.
- 107) Koyuncu FM, Özbilgin K, Kuşçu NK, Inan S, Vatansever S, Ceylan E. The effect of oestradiol and neta on immunohistochemical staining of iNOS and eNOS in coronary arteries of ovariectomized rats. *Histol Histopathol* 2006; 21: 367-371.
- 108) Behr-Roussel D, Rupin A, Sansilvestri-Moerl P, Fabiani JN, and Verbeuren TJ. Histochemical evidence for inducible nitric oxide synthase in advanced but non-ruptured atherosclerotic carotid arteries. *Histochem. J.* 32, 41-51.
- 109) Nachtigal P, Kopecky M, Solichova D, Zdansky P, Semecky V. *J Pharm Pharmacol.* 2005 Feb;57(2): 197- 203.
- 110) Esaki T, Hayashi T, Asai Y. Expression of inducible nitric oxide synthase in T lymphocytes and macrophages in vessels with advanced atherosclerosis. *Heart Vessels.* 1997;Suppl 12: 89- 92.
- 111) Pinna C, Bolego C, Sanvito P, Pelosi V, Baetta R, Corsini A, Gaion RM, Cignarella A. Raloxifene Elicits Combined Rapid Vasorelaxation and Long-Term Anti-Inflammatory Actions In Rat Aorta. *JPET* 2006; 106062.
- 112) Tsang SY, Yao X, Essin K, Wong CM, Chan FL, Gollash M, and Huang Y. Raloxifene relaxes rat cerebral arteries in vitro and inhibits L-type voltage-sensitive Ca channels. *Stroke* 2004; 35: 1709-1714.
- 113) Gonzalez- Perez J, Crespo MJ. Chronic effects of Toremifene on the vasculature of menopause- induced rats. *Vascular pharmacology* 2004; 40: 261-268
- 114) Chan YC, Leung FP, Yao X, Lau CW, Vanhoutte PM, Huang Y. Raloxifene Relaxes Rat Pulmonary Arteries and Veins: Roles of Gender, Endothelium, and Antagonism of Ca Influx. *JPET* 2005; 312: 1266-1271.
- 115) Kajinami K, Brousseau ME, Lamon-Fava S, Ordovas JM, Schaefer EJ. Gender-specific effects of estrogen receptor α gene haplotype on high-density lipoprotein cholesterol response to atorvastatin: interaction with apolipoprotein AI gene polymorphism. *Atherosclerosis* 2005; 178: 331-338.
- 116) Akishita M, Ouchi Y, Miyoshi H, Estrogen inhibits endothelin-1 production and c-fos gene expression in rat aorta. *Atherosclerosis.* 1996;125(1): 27-38
- 117) Ohkita M, Sugii M, Ka Y, Kitamura A, Mori T, Hayashi T, Takaoka M, Matsumura Y. Differential effects of different statins on endothelin-1 gene expression and endothelial NOS phosphorylation in porcine aortic endothelial cells. *Exp Biol Med (Maywood).* 2006; 231(6): 772-6.