

Tavşan karotis arteri yaka modelinde vWF ekspresyonu değişimlerinin incelenmesi

Investigation of changes in vWF expression in rabbit carotid artery collar model

Mehmet Zuhuri ARUN¹, Gülnur SEVİN², Günay YETİK ANACAK², Ceren GÖNEN KORKMAZ¹, Levent ÜSTÜNES¹

¹Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Klinik Eczacılık Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

²Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

ÖZ

Amaç: Tavşan karotis arteri çevresine yaka yerleştirilmesi ateroskleroz gelişiminin en önemli basamaklarından biri olan intimal kalınlaşmaya neden olur. Bu çalışmada, yaka modelinde vWF ekspresyon düzeylerinin yedinci ve on dördüncü günde incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: İnert, yumuşak silikon yaka sol karotis arter çevresine yedi veya on dört gün süre ile yerleştirilmiştir. vWF ekspresyonu RT-PCR yöntemi ile incelenmiştir. Her bir arterin intima/medya (indeks) oranları ölçülmüştür.

Bulgular: Yedinci gün ile on dördüncü gün kıyaslandığında indeks değerinin on dördüncü günde daha da arttığı görülmüştür. Yaka vWF ekspresyon düzeyinde artışa neden olmuştur. Yakanın neden olduğu vWF düzeylerindeki artış incelenen her iki günde de aynı düzeyde bulunmuştur.

Sonuç: Elde ettiğimiz bulgular yaka modeli ile oluşan intimal kalınlaşmada vWF'ün önemini vurgulamaktadır.

Anahtar kelimeler: vWF, yaka, intimal kalınlaşma, ateroskleroz

ABSTRACT

Objective: Placement of a soft silicone collar around the carotid arteries of rabbits induces intimal thickening which is considered as one of the crucial steps in the development of atherosclerosis. In this study we aimed to investigate vWF expression levels on days 7 and 14 after collar placement.

Methods: A soft inert silicon collar was placed around the left carotid artery for 7 and 14 days. vWF expression was investigated by quantitative RT-PCR. In each artery (collar or sham) cross-sectional areas of intima, media were measured and intima/media ratio was calculated.

Results: Intimal thickening was more pronounced on day 14 compared to day 7. However the collar caused increase in vWF expression which was found to be at the same level on days 7 and 14.

Conclusion: Our findings emphasize the importance of vWF in collar-induced intimal thickening.

Keywords: vWF, collar, intimal thickening, atherosclerosis

Alındığı tarih: 05.02.2018

Kabul tarihi: 08.02.2018

Yazışma adresi: Dr. Mehmet Zuhuri Arun, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Klinik Eczacılık Anabilim Dalı, 35040 - İzmir - Türkiye
e-mail: mehmet.arun@ege.edu.tr

GİRİŞ

Ateroskleroz süreci dinamik bir süreçtir ve bireylerin yaşamı boyunca oluşan aterosklerotik lezyonlar belli bir sürenin sonunda ciddi mortalite ve morbiditeye neden olabilir ⁽¹⁾. Ross ve ark.'nın "hasara karşı yanıt" hipotezinden günümüze kadar yapılan pek çok deneysel ve klinik çalışma aterosklerozun damar duvarında meydana gelen kronik inflamatuvar bir

hastalık olduğunu göstermektedir ^(2,3).

Aterosklerotik lezyonlarda intimal kalınlaşmanın varlığı uzun yıllardır bilinmektedir ve intimal kalınlaşma ateroskleroz gelişiminin ilk aşamasını işaret eder ^(4,5). İntimal kalınlaşma başta kontrolsüz vasküler düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonu olmak üzere farklı hücre tiplerinin rol oynadığı karmaşık bir süreçtir ⁽⁵⁾.

Ateroskleroz sürecinin farklı aşamalarını, farklı

nedenlerini araştırmak üzere pek çok sayıda deneysel ateroskleroz modelleri geliştirilmiştir⁽⁶⁾. Çalışmamızda kullandığımız tavşan karotid arteri yaka modeli ilk kez 1989 yılında Booth ve ark.⁽⁷⁾ tarafından bildirilmiştir. Yaka modeli çok kısa süre içinde çalışmaya olanak tanır; intimal kalınlaşma yedi gün içinde görülür ve on dört içinde maksimuma ulaşır⁽⁸⁾. Bununla birlikte, yaka uygulamasına bağlı vasküler yanıt dahil pek çok değişiklik çok daha kısa süre içinde görülmeye başlar⁽⁸⁻¹¹⁾. Yaka modelinde meydana gelen süreçlerde inflamasyon önemli bir rol oynamaktadır^(10,11). Bu modelde daha önce yapılan bir çalışmada, deksametazon verilmesinin intimal kalınlaşmayı önemli ölçüde inhibe ettiğinin gösterilmiş olması da bu yöndeki bulguları desteklemektedir⁽¹²⁾.

Yaka modelinin başka avantajı da balon anjiyoplasti gibi diğer invazif deneysel ateroskleroz modellerinden farklı olarak endotel tabakasının bütünlüğünü korumasıdır⁽¹³⁾. von Willebrand Faktör (vWF) kan plazmasında, subendotelyal matrikste ve trombositlerdeki granüller (α -granüller) ve endotel hücreleri (Weibel-Palade cisimleri) içinde bulunan multimerik bir glikoproteindir⁽¹⁴⁾. von Willebrand faktör üzerine yapılan çalışmalar bu proteinin tromboz dışında inme, ateroskleroz gibi pek çok farklı süreçte de rol aldığını göstermektedir^(15,16). İnflamasyon ve vWF faktör arasındaki ilişki uzun yıllardır bilinmektedir ve farklı inflamasyon süreçlerinde pek çok direkt ve indirek rolleri vardır⁽¹⁷⁾. vWF vasküler hasarda önemli bir rol oynar^(15,17). vWF'nin polimorfonükleer lökositler ile etkileştiği ve vWF aracılı lökosit adezyonunun P-selektin için ligand görevi gördüğü gösterilmiştir⁽¹⁸⁾. Tavşan karotid arteri yaka modelinde yakanın on dördüncü günde endotelyumda vWF immunreaktivitesinde artışa neden olduğu bildirilmiştir⁽¹³⁾. Araştırmacılar hiperkolesterolemi uygulanmış tavşanlarda da ondört gün süreyle yaka uygulamasını takiben ekspresyon artışı olduğunu göstermişlerdir⁽⁴⁾.

Yukarıda verdiğimiz bu bilgiler ışığında çalışmamızın amacı, tavşan karotid arteri yaka modelinde intimal kalınlaşmanın ilk görüldüğü yedinci ve maksimuma ulaştığı ondördüncü günlerdeki vWF ekspresyonlarını incelemek ve bu süreçteki değişimleri değerlendirmektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Deney Hayvanları ve Tavşan Karotid Arteri Yaka Modeli

Araştırma protokolü Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanı Etik Komitesi tarafından onaylanmıştır. Çalışmamızda 2.0-3.0 kg ağırlığında Yeni Zellanda türünde erkek tavşanlar kullanıldı. Hayvanlar deney öncesinde ve deney protokolü boyunca standart diyetle beslendi ve serbestçe su içmelerine izin verildi.

Anestezi (sodyum pentobarbital, 30 mg/kg i.v.) edilen hayvan uygun şekilde sabitlendi. Her iki karotid arter ayrı ayrı açığa çıkarıldı ve çevre dokularından temizlendi. Sol karotid arter çevresine inert tıbbi silikondan hazırlanan 2.2 cm uzunluğunda, oklüzif olmayan, esnek silikon bir yaka yerleştirildi. Sağ kontralateral karotid arter benzer şekilde manipüle edilerek yalancı cerrahi operasyon uygulandı. Protokole göre 7 veya 14 günün sonunda deneye alınan hayvanlar yüksek doz anestezi ile ötanazi edildikten sonra öldürüldü ve her iki karotid arter ve torasik aortalar izole edilerek çıkarıldı. Yaka uygulanmış sol karotid arterde yakanın kapsadığı alandan ve kontralateral karotid arterde buna karşı gelen bölgeden alınan damar örnekleri bir kısmı %10'luk formalin çözeltilisi içinde bir kısmı da sıvı azot ile dondurularak -86°C'de saklandı.

mRNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Dondurulan damar örnekleri havanda sıvı azot ile toz edildikten sonra ticari kit (RNAEasy, Quiagen, A.B.D.) kullanılarak önerilen protokol ile RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları nanovet spektrofotometrede (DU 730-Beckman Coulter) ölçüldü. Her bir reaksiyonda 100 ng RNA içerecek şekilde cDNA sentez kiti ile üreticinin önerdiği protokole uygun olarak cDNA sentezi yapıldı (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit - Roche Life Sciences, ABD).

cDNA örnekleri LC-480 SYBR®-Green-PCR-Master Mix (Roche Life Sciences, A.B.D.) ve Tablo 1'de verilen forward ve reverse primerlerin eklenmesi

ile amplifiye edildi (LightCycler-480, Roche, Almanya). Bağlı ekspresyon 2- $\Delta\Delta$ CT metodu ile belirlendi. İç kontrol olarak GAPDH, ekspresyonları ile elde edilen Cp değerlerinden yararlanıldı. Elde edilen ürünler yine %2 agaroz jelde yürütülerek doğrulandı. Ekspresyonları incelenen genler için forward ve reverse primerlerin detayı Tablo 1’de verilmektedir.

İntimal Kalınlaşmanın Ölçülmesi ve Değerlendirilmesi

Formalin ile daha önceden bir gün süre ile fikse edilen dokular daha sonra parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan poli-L-lizin kaplı lamlara, 5 μ m kalınlığında kesitler alındı. Her bir damar segmentindeki alanlar Nikon Eclipse 200 (Nikon, A.B.D) mikroskopisi sistemi kullanılarak 4x büyütmede bilgisayar ortamına aktarıldı. Aktarılan görüntülerde lümen, intima ve medya alanları ImageJ v.1.37 (National Institute of Health, A.B.D) yazılımı kullanılarak piksel kare cinsinden ölçüldü ve Thoma lamı referans alınarak mm²’ye dönüştürüldü. Tüm istatistiksel değerlendirmeler mm² üzerinden gerçekleştirildi.

İntimal kalınlaşmanın belirlenmesinde intima/medya oranı (indeks) kullanıldı (7).

İstatistiksel Analizler

Veriler ortalama ve ortalamasının standart hatası olarak sunulmuştur. İstatistiksel analizlerde güne bağlı olan değişimin gerekse yakanın etkilerini incelemek amacı ile iki yönlü ANOVA testinden yararlanıldı. Bağımsız faktörler arasında etkileşme meydana geldiğinde eşleştirilmiş ve eşleştirilmemiş Student t-testinden yararlanıldı. İstatistiksel analizlerde GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Inc., A.B.D.) yazılımı kullanıldı.

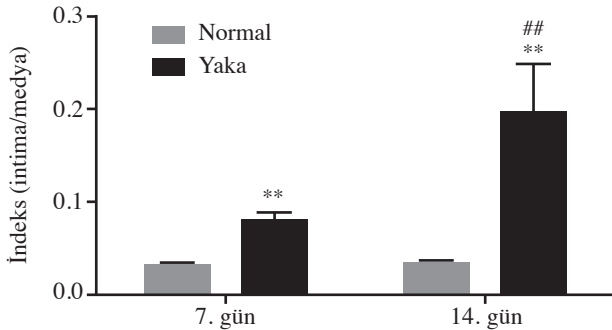
BULGULAR

Yakanın İntimal Kalınlaşma Üzerine Etkisi

Yaka uygulaması hem yedinci hem de on dördüncü günde indeks değerinde anlamlı artışa neden oldu. Yakanın neden olduğu intimal kalınlaşmanın on dördüncü günde daha da arttığı görüldü. İki yönlü

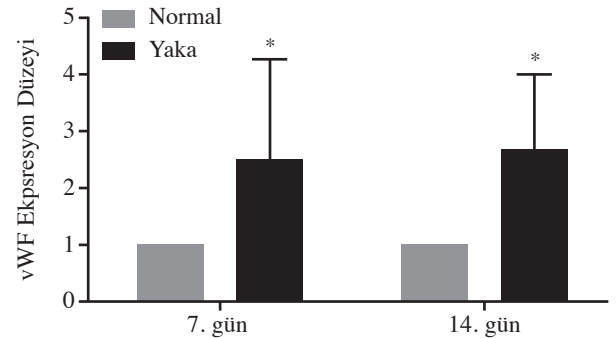
Tablo 1. Çalışmamızda kullanılan primer dizileri.

Gen Adı	Forward Primer	Reverse Primer
vWF	GTGGTGAGCGTGATGGAG	GCCCGCATATTCACCTG
GAPDH	GTCAGTGGTGGACCTGACCT	TCGCTGTTGAAGTCAGAGGA



Şekil 1. Yaka uygulamasının indeks değeri üzerine yedinci ve on dördüncü günlerdeki etkisi.

Veriler ortalama \pm ortalamasının standart hatası olarak verilmiştir. ** $P \leq 0,01$ yaka ile normal; eşleştirilmiş Student t-testi, ## $P \leq 0,01$ yedinci gün ile on dördüncü gün; eşleştirilmemiş Student t-testi ($n=5$).



Şekil 2. Yaka uygulamasının vWF ekspresyonu üzerine yedinci ve on dördüncü günlerdeki etkisi.

Veriler ortalama \pm ortalamasının standart hatası olarak verilmiştir. * $P \leq 0,05$ yaka ile normal; iki yönlü ANOVA ($n=4$).

ANOVA analizi ile incelendiğinde etkileşme görüldü. Bu nedenle eşleştirilmiş ve eşleştirilmemiş Student t-testinden yararlandı (Şekil 1, Tablo 2).

Yakanın vWF Ekspresyonları Üzerine Etkisi

Yaka yedinci günde vWF ekspresyonunda anlamlı bir artışa neden oldu. Yakanın neden olduğu vWF ekspresyonu artışı on dördüncü günde de devam etti (Şekil 2, Tablo 2).

Tablo 2. Yaka uygulamasının indeks değeri ve vWF ekspresyonları üzerindeki etkisi.

	İndeks (n=5)		vWF Ekspresyonu (n=4)	
	7. gün	14. gün	7. gün	14. gün
Normal	0,028±0,002	0,032±0,001	0,9921±0,001	1,002±0,001
Yaka	0,08±0,009	0,1960±0,051	2,49±0,89	2,66±0,67
<i>Varyans analizindeki faktörlerin istatistiksel anlamlılık düzeyleri</i>				
Yaka	0,0011		0,0152	
Gün	0,0412		0,8812	
Etkileşim	0,0477		0,8812	
Yaka ile gün arasında				

Veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. İki yönlü ANOVA

TARTIŞMA

Çalışmamızda yaka ile meydana gelen intimal kalınlaşma yedinci günde istatistiksel olarak anlamlı olmakla birlikte, on dördüncü günde maksimuma ulaşmıştır. Bu bulgu aynı modelde yapılan diğer çalışmalarda elde edilen bulgular ile uyumludur (7,9,19).

Tavşan karotid arteri yaka modelinde meydana gelen intimal kalınlaşmanın nedenlerine yönelik aydınlatıcı pek çok çalışma yapılmıştır. Yakanın geometrik şekli/yapısı da intimal kalınlaşmanın derecesinin ve vasküler yeniden modellenmenin nasıl olacağını belirlemede rol oynar (8,20). Yakanın neden olduğu intimal kalınlaşma yedinci günde görülmeye başlanmasına rağmen, yakanın neden olduğu pek çok değişiklik yakanın uygulanmasını takip eden saatler içinde bile görülmeye başlar. Yakaya bağlı intimal kalınlaşma süreci 3 fazda gerçekleşir (10). Yakanın

yerleştirilmesini takip eden saatler içinde polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu 24 saat içinde yaka uygulanan bölgede maksimuma ulaşır (21). İntimal kalınlaşma sürecinde monosit kemoatraktant protein-1, vasküler adezyon molekül-1, intraselüler adezyon molekül-1 gibi inflamatuvar sitokinlerde rol oynar (22). Ayrıca yaka uygulamasını takip eden ilk aşamadan itibaren jelatinazların (MMP-2 ve MMP-9) ekspresyon ve aktivitelerinde meydana gelen artışta yakaya bağlı intimal kalınlaşma sürecinde inflamasyonun büyük katkısının olduğuna işaret etmektedir (9,23,24).

vWF'de vasküler inflamasyonun göstergelerinden biridir (3,17) ve giriş bölümünde değindiğimiz gibi yaka modelinde vWF varlığı ve ekspresyon düzeylerinde artış daha önce yapılan çalışmalarda da bildirilmiştir (4,13). Çalışmamızda da elde ettiğimiz bulgular bunu desteklemektedir. Bununla birlikte, vWF ekspresyonundaki artışın intimal kalınlaşmanın henüz gözlemlenebildiği yedinci günde başladığı ve ekspresyon düzeyindeki bu artışın on dördüncü günde de devam ettiği ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. Ayrıca endotelyum altında on dördüncü günde görülen birikmenin daha ilk günlerden başladığı düşünülebilir. Yaka modelinde vWF ekspresyonu değişikliklerini incelediğimiz çalışmamızda elde ettiğimiz bulgularla intimal kalınlaşma sürecinde inflamasyonun ve vWF'ün önemini yine vurgulamaktadır.

Yaka modelinin en karakteristik özelliklerinden biri de vasküler kasılma ve endotelyuma bağlı gevşeme yanıtlarında meydana gelen değişikliklerdir (9,25). Modelde endotelyum fiziksel bütünlüğünü korumasına rağmen erken aşamada belirgin endotelial disfonksiyon mevcuttur (9,26,27). vWF'ün üretimi ve damar endotelyumundan salınması vasküler hasarda artar ve endotelial disfonksiyonun ve derecesinin bir göstergesidir (14-16,28,29). Çalışmamızda gösterdiğimiz yedinci günde ortaya çıkan vWF ekspresyon düzeyindeki artışa endotelial disfonksiyon neden olmuş olabilir.

Sonuç olarak, çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular gerek intimal kalınlaşma gerekse yaka modelinde vWF'ün ilk aşamadan itibaren önemli olabileceğini vurgulamaktadır. vWF, intimal kalınlaşma ve etkin tedavi stratejilerinin belirlenmesinde, tedavinin etkin-

liğinin izlenmesinde değerli bir biyomarker olduğunu düşündürmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (05/ECZ/018 ve 06/ECZ/014) tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Chistiakov DA, Myasoedova VA, Melnichenko AA, Grechko AV, Orekhov AN. Calcifying Matrix Vesicles and Atherosclerosis. *BioMed Research International*. 2017;2017:7463590. <https://doi.org/10.1155/2017/7463590>
2. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The New England Journal of Medicine*. 2005;352(16):1685-95. <https://doi.org/10.1056/NEJMra043430>
3. Lv JX, Kong Q, Ma X. Current advances in circulating inflammatory biomarkers in atherosclerosis and related cerebrovascular diseases. *Chronic Diseases and Translational Medicine*. 2017;3(4):207-12. <https://doi.org/10.1016/j.cdtm.2017.09.002>
4. De Meyer GR, Hoylaerts MF, Kockx MM, Yamamoto H, Herman AG, Bult H. Intimal deposition of functional von Willebrand factor in atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1999;19(10):2524-34. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.19.10.2524>
5. Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiological Reviews*. 2005;85(1):1-31. <https://doi.org/10.1152/physrev.00048.2003>
6. Getz GS, Reardon CA. Animal models of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2012;32(5):1104-15. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.237693>
7. Booth RF, Martin JF, Honey AC, Hassall DG, Beesley JE, Moncada S. Rapid development of atherosclerotic lesions in the rabbit carotid artery induced by perivascular manipulation. *Atherosclerosis*. 1989;76(2-3):257-68. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(89\)90109-3](https://doi.org/10.1016/0021-9150(89)90109-3)
8. De Meyer GR, Van Put DJ, Kockx MM, Van Schil P, Bosmans R, Bult H, et al. Possible mechanisms of collar-induced intimal thickening. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1997;17(10):1924-30. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.17.10.1924>
9. Arun MZ, Ustunes L, Sevin G, Ozer E. Effects of vitamin C treatment on collar-induced intimal thickening. *Drug Design, Development and Therapy*. 2015;9:6461-73. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S97020>
10. Kockx MM, De Meyer GR, Jacob WA, Bult H, Herman AG. Triphasic sequence of neointimal formation in the cuffed carotid artery of the rabbit. *Arteriosclerosis and Thrombosis: a Journal of Vascular Biology*. 1992;12(12):1447-57. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.12.12.1447>
11. Van Put DJ, Van Osselaer N, De Meyer GR, Andries LJ, Kockx MM, De Clerck LS, et al. Role of polymorphonuclear leukocytes in collar-induced intimal thickening in the rabbit carotid artery. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1998;18(6):915-21. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.18.6.915>
12. Van Put DJ, Van Hove CE, De Meyer GR, Wuyts F, Herman AG, Bult H. Dexamethasone influences intimal thickening and vascular reactivity in the rabbit cuffed carotid artery. *European Journal of Pharmacology*. 1995;294(2-3):753-61. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(95\)00635-4](https://doi.org/10.1016/0014-2999(95)00635-4)
13. Kockx MM, De Meyer GR, Andries LJ, Bult H, Jacob WA, Herman AG. The endothelium during cuff-induced neointima formation in the rabbit carotid artery. *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology*. 1993;13(12):1874-84. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.13.12.1874>
14. Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood*. 2015;125(13):2019-28. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-06-528406>
15. Lenting PJ, Casari C, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor: the old, the new and the unknown. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. 2012;10(12):2428-37. <https://doi.org/10.1111/jth.12008>
16. Lip GY, Blann AD. von Willebrand factor and its relevance to cardiovascular disorders. *British Heart Journal*. 1995;74(6):580-3. <https://doi.org/10.1136/hrt.74.6.580>
17. Kawecki C, Lenting PJ, Denis CV. von Willebrand factor and inflammation. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. 2017;15(7):1285-94. <https://doi.org/10.1111/jth.13696>
18. Pendu R, Terraube V, Christophe OD, Gahmberg CG, de Groot PG, Lenting PJ, et al. P-selectin glycoprotein ligand 1 and β 2-integrins cooperate in the adhesion of leukocytes to von Willebrand factor. *Blood*. 2006;108(12):3746-52. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-010322>
19. Yong AC, Townley G, Boyd GW. Haemodynamic changes in the Moncada model of atherosclerosis. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*. 1992;19(5):339-42. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1992.tb00467.x>
20. Kivela A, Hartikainen J, Yla-Herttuala S. Dotted collar placed around carotid artery induces asymmetric neointimal lesion formation in rabbits without intravascular manipulations. *BMC Cardiovascular Disorders*. 2012;12:91. <https://doi.org/10.1186/1471-2261-12-91>
21. Donetti E, Baetta R, Comparato C, Altana C, Sartore S, Paoletti R, et al. Polymorphonuclear leukocyte-myocyte interaction: an early event in collar-induced rabbit carotid intimal thickening. *Experimental Cell Research*. 2002;274(2):197-206. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5459>
22. Nicholls SJ, Dusting GJ, Cutri B, Bao S, Drummond GR, Rye KA, et al. Reconstituted high-density lipoproteins inhibit the acute pro-oxidant and proinflammatory vascular changes induced by a periarterial collar in normocholesterolemic rabbits. *Circulation*. 2005;111(12):1543-50. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000159351.95399.50>
23. Reel B, Oktay G, Ozkal S, Islekel H, Ozer E, Ozsarlak-Sozer G, et al. MMP-2 and MMP-9 alteration in response to collaring in rabbits: the effects of endothelin receptor antagonism. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 2009;14(4):292-301. <https://doi.org/10.1177/1074248409343690>

24. Bellosta S, Baetta R, Canavesi M, Comparato C, Granata A, Monetti M, et al. Raloxifene inhibits matrix metalloproteinases expression and activity in macrophages and smooth muscle cells. *Pharmacological Research*. 2007;56(2):160-7. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.05.004>
25. De Meyer GR, Bult H, Ustunes L, Kockx M, Jordaens FH, Zonnekeyn LL, et al. Vasoconstrictor responses after neointima formation and endothelial removal in the rabbit carotid artery. *British Journal of Pharmacology*. 1994;112(2):471-6. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1994.tb13097.x>
26. Arthur JF, Dusting GJ, Woodman OL. Impaired vasodilator function of nitric oxide associated with developing neointima in conscious rabbits. *Journal of Vascular Research*. 1994;31(4):187-94. <https://doi.org/10.1159/000159043>
27. Arthur JF, Dusting GJ. Selective endothelial dysfunction in early atheroma-like lesions in the rabbit. *Coronary Artery Disease*. 1992;3(7):623-30. <https://doi.org/10.1097/00019501-199207000-00013>
28. Bosmans JM, Kockx MM, Vrints CJ, Bult H, De Meyer GR, Herman AG. Fibrin(ogen) and von Willebrand factor deposition are associated with intimal thickening after balloon angioplasty of the rabbit carotid artery. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1997;17(4):634-45. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.17.4.634>
29. Vischer UM. von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. 2006;4(6):1186-93. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01949.x>