

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ
ANABİLİM DALI

HİPERKOLESTEROLEMİK TAVŞAN DÜZ KASI ÜZERİNE RESVERATROLÜN ETKİSİ

BURAK CEM SONER

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2007

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ
ANABİLİM DALI

HİPERKOLESTEROLEMİK TAVŞAN DÜZ KASI ÜZERİNE RESVERATROLÜN ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Sedef Gidener

BURAK CEM SONER

**Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından
2005 KB SAG 61 sayılı proje ile desteklenmiştir.**

Tüm uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimlerini aktardığı ve sabırlı davranışlarından dolayı Yrd.Doç.Dr.Nergis Murat'a; iş yoğunluğuna rağmen her zaman çalışma hayatı ve bilimsel düşünce adına yetişmemde katkıda bulunan Prof.Dr.Sedef Gidener'e ve Prof.Dr.Hülya Güven'e, tezin oluşturulması ve bilimsel açıdan verdiği katkılardan dolayı Prof.Dr.Ahmet Adil Esen'e sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

Farmakoloji AD başkanı Prof.Dr.Yeşim Tunçok ve hocalarıma, asistanlığım süresince beraber çalıştığım arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ.....	1
ŞEKİL LİSTESİ.....	1
RESİM LİSTESİ.....	2
KISALTMALAR.....	3
ÖZET.....	5
SUMMARY.....	7
1 GENEL BİLGİLER.....	9
1.1 <u>Ateroskleroz</u>.....	9
1.1.1 <u>Tanım ve Genel Bilgiler</u>.....	9
1.1.2 <u>Ateroskleroz Etiyolojisi</u>.....	9
1.1.3 <u>Ateroskleroz Patogenezi</u>.....	10
1.1.3.1 Enflamasyon Ve Trombozisin Endotelyum Tarafından Düzenlenmesi	
1.1.3.2 Enflamasyon ve Tromboziste Kontrol Kaybı	
1.1.3.3 Endotelyal Disfonksiyonda Oksidatif Stresin Rolü	
1.1.3.4 Endotelyal Disfonksiyonda Enflamasyonun Rolü	
1.1.3.5 Ateroskleroz ve Endotelyal Disfonksiyon İlişkisi	

1.1.3.5.1 Vasküler Tonusun Endotelyum Tarafından Düzenlenmesi

1.1.3.5.1.1 Vazodilatasyon Oluşturan Faktörler

1.1.3.5.1.2 Vazokonstriksiyon Oluşturan Faktörler

1.1.3.5.2 Endotelyal Disfonksiyona Bağlı Vasküler Tonus Azalması

1.2 Eretil Disfonksiyon.....21

1.2.1 Ereksiyon Fizyolojisi.....21

1.2.2 Eretil Disfonksiyon Etiyolojisi24

1.2.3 Eretil Disfonksiyon Patogenezi.....25

1.3 Resveratrol.....26

1.3.1 Resveratrol Hakkında Genel Bilgiler.....26

1.3.2 Resveratrolun Kimyasal Yapısı.....27

1.3.3 Resveratrolun Etkileri.....27

1.3.3.1 Antioksidan Etkisi

1.3.3.2 Vasküler Düz kas ve Endotel üzerine Etkileri

1.3.3.3 İskemi Reperfüzyon Hasardan Koruyucu Etkisi

1.3.3.4 Antiagregan Etkisi

1.3.3.5 Antienflamatuar Etkisi

2	GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	30
2.1	<u>Etik Kurul Onayı, Tavşanların Beslenmesi, Gruplandırılması</u>	30
2.2	<u>Plazma Kolesterol Düzeylerinin Ölçümü</u>.....	32
2.3	<u>İzole Organ Banyosu Deney Protokolü</u>	33
2.4	<u>Kullanılan Aygıtlar</u>	36
2.4.1	<u>İzole organ banyosu</u>	
2.4.2	<u>pH metre</u>	
2.5	<u>Kullanılan Kimyasallar</u>	38
2.6	<u>Verilerin Analizi</u>	38
3	BULGULAR	38
3.1	<u>Plazma Parametrelerinin Sonuçları</u>.....	38
3.2	<u>Hayvan Kilolarının Karşılaştırılması</u>.....	39
3.3	<u>İzole Organ Banyosu Sonuçları</u>.....	39
3.3.1	<u>Renal Arter Yanıtları</u>.....	39
3.3.1.1	KCl ile Kasılma Yanıtları	
3.3.1.2	Fenilefrin ile Kasılma Yanıtları	
3.3.1.3	Asetilkolin ile Gevşeme Yanıtları	
3.3.1.4	SNP Gevşeme Yanıtları	

3.3.2 <u>Mezenterik Arter Yanıtları</u>	42
3.3.2.1 KCl ile Kasılma Yanıtları	
3.3.2.2 Fenilefrin ile Kasılma Yanıtları	
3.3.2.3 Asetilkolin ile Gevşeme Yanıtları	
3.3.2.4 SNP Gevşeme Yanıtları	
3.3.3 <u>Torakal Aorta Yanıtları</u>	47
3.3.3.1 KCl ile Kasılma Yanıtları	
3.3.3.2 Fenilefrin ile Kasılma Yanıtları	
3.3.3.3 Asetilkolin ile Gevşeme Yanıtları	
3.3.3.4 SNP Gevşeme Yanıtları	
3.3.4 <u>Kavernöz Doku Yanıtları</u>	51
3.3.4.1 KCl ile Kasılma Yanıtları.....	
3.3.4.2 Fenilefrin ile Kasılma Yanıtları.....	
3.3.4.3 Asetilkolin ile Gevşeme Yanıtları.....	
3.3.4.4 SNP Gevşeme Yanıtları.....	
3.3.5 <u>Hiperkolesterolemik grupta tüm doku yanıtlarının değerlendirilmesi</u>	55
3.3.6 <u>Resveratrol uygulanan grupta tüm doku yanıtlarının değerlendirilmesi</u>	56

4	TARTIŞMA.....	58
4.1	<u>Vücut Ağırlığı</u>	58
4.2	<u>Plazma Kolesterol Düzeyleri</u>	58
4.3	<u>Damar Yanıtları</u>	59
4.3.1	<u>KCl kasılması</u>	60
4.3.2	<u>Fenilefrin yanıtları</u>	60
4.3.3	<u>ACh yanıtları</u>	61
4.3.3.1	Renal arter	
4.3.3.2	Mezenterik arter	
4.3.3.3	Torakal Aorta	
4.3.3.4	Korpus kavernozum	
4.3.4	<u>SNP Yanıtları</u>	63
5	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	65
6	KAYNAKLAR	69

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Plazma kolesterol düzeyleri.....	39
Tablo 2: Deney hayvanlarının deney başlangıcı ve sonundaki ağırlıkları.....	39
Tablo 3: ACh uygulanmış olan dokuların PD ₂ değerleri.....	57
Tablo 4: SNP uygulanmış olan dokuların PD ₂ değerleri.....	57

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Nitrik oksidin antiaterojenik etkileri.....	11
Şekil 2: Ox-DYL'ye bağlı oluşan endotelial disfonksiyon ve ateroskleroz mekanizmaları.....	14
Şekil 3: Endoteldeki enflamatuvar aktivite sonucu lezyon oluşumu.....	17
Şekil 4: NO-cGMP yolağı aracılı korpus kavernozum düz kas gevşemesi	19
Şekil 5: Korpus kavernozum endotelinden salınan vazodilatatör maddeler.....	21
Şekil 6: NO-cGMP yolağı aracılı korpus kavernozum düz kas gevşemesi	24
Şekil 7: Resveratrolün kimyasal yapısı.....	27
Şekil 8: Çalışma grupları.....	31
Şekil 9: Organ banyosunun şematik çizimi.....	35
Şekil 10: Renal arterde 80 mM KCl uygulaması sonucu oluşan kasılma yanıtları.....	40
Şekil 11: Renal arterde birinci ve ikinci fenilefrin uygulamasının karşılaştırmalı sonuçları.....	41
Şekil 12: Renal arterde kümülatif dozlarda ACh uygulanması sonucu oluşan gevşeme yanıtları	42
Şekil 13: Renal arterde kümülatif dozlarda SNP uygulanması sonucu oluşan gevşeme yanıtları.....	43
Şekil 14: Mezenterik arterde 80 mM KCl uygulaması sonucu oluşan kasılma yanıtları.....	44
Şekil 15: Mezenterik arterde birinci ve ikinci fenilefrin uygulamasının karşılaştırmalı sonuçları.....	45
Şekil 16: Mezenterik arterde; kontrol grubu, hiperkolesterolemik grup ve resveratrol grubunda ACh'e bağlı oluşan gevşeme yanıtları.....	46

Şekil 17: Mezenterik arterde; kontrol grubu, hiperkolesterolemik grup ve resveratrol grubunda SNP'e bağlı oluşan gevşeme yanıtları.....	47
Şekil 18: Torakal aortada 80Mm KCl ile oluşan kasılma yanıtları.....	48
Şekil 19: Torakal aortada birinci ve ikinci fenilefrin uygulamasının karşılaştırmalı sonuçları.....	49
Şekil 20: Torakal aortada; kontrol grubu, hiperkolesterolemik grup ve resveratrol grubunda ACh'e bağlı oluşan gevşeme yanıtları.....	50
Şekil 21: Torakal aortada; kontrol grubu, hiperkolesterolemik grup ve resveratrol grubunda SNP'e bağlı oluşan gevşeme yanıtları.....	51
Şekil 22: Kavernöz dokuda 80Mm KCl ile oluşan kasılma yanıtları.....	51
Şekil 23: Kavernöz dokuda birinci ve ikinci fenilefrin uygulamasının karşılaştırmalı sonuçları.....	53
Şekil 24: Kavernöz dokuda; kontrol grubu, hiperkolesterolemik grup ve resveratrol grubunda ACh'e bağlı oluşan gevşeme yanıtları.....	54
Şekil 25: Kavernöz dokuda; kontrol grubu, hiperkolesterolemik grup ve resveratrol grubunda SNP'e bağlı oluşan gevşeme yanıtları.....	55
Şekil 26: Hiperkolesterolemik diyet uygulanan grupta tüm dokuların ACh'e bağlı gevşeme yanıtlarının karşılaştırılması.....	56
Şekil 27: Resveratrol tedavisi uygulanan grupta tüm dokuların ACh'e bağlı gevşeme yanıtlarının karşılaştırılması.....	57

RESİM LİSTESİ

Resim 1: Tavşanların barınma koşulları.....	32
Resim 2: Eksize edilmiş damar segmenti.....	33
Resim 3: Çevre dokulardan temizlenmiş damar segmenti.....	34
Resim 4: Halka şeklinde hazırlanmış damar preparatları.....	34
Resim 5: Organ banyosu sistemi.....	36

KISALTMALAR

Asetilkolin (ACh)
Anjiotensin II (Anj-II)
Araşidonik asit (AA)
Asimetrik dimetilarjinin (ADMA)
Doku plazminojen aktivatörleri (tPA)
Düşük yoğunluklu lipoproteinler (DYL)
Endotel Bağımlı Gevşeme Yanıtları (EBGY)
Endotel bağımlı hiperpolarizan faktör (EDHF)
Endotelin-1 (ET-1)
Endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS)
Erektile disfonksiyon (ED)
Fibroblast büyüme faktörü (FGF)
İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS)
İnterferon-γ (IFN- γ)
İnterlökin (IL)
İntersellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1)
Kardiyovasküler hastalıklar (KVH)
Korpus kavernozum (KK)
Lipoksigenaz (LOX)
Matriks metalloproteinazları (MMP)
Mezenterik arter (MA)
Mitojen aktive protein kinaz (MAPK)
Monosit Kemotaktik Protein -1 (MCP-1)
Nitrik oksit (NO)
Nitrik oksit sentaz (NOS)
Nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS)
Nükleer Faktör-Kappa B (NFkB)
Okside DYL (Ox-DYL)
Reaktif oksijen türleri (ROS)
Renal arter (RA)

Siklik adenosin monofosfat (cAMP)
Siklik guanidin monofosfat (cGMP)
Siklooksigenaz (COX)
Soluble guanilat siklaz (sGC)
Sodyumnitroprussit (SNP)
Torakal Aorta (TA)
Transforme–edici gelişim faktörü beta (TGF-b)
Trombosit Aktive edici Faktör–1 (PAF–1)
Trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF)
Tümör nekroz faktör- α (TNF- α)
Vasküler düz kas hücreleri (VDKH)
Vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM)
Vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1)
Yakalayıcı reseptörler (SR)

ÖZET

HİPERKOLESTEROLEMİK TAVŞAN DÜZ KASI ÜZERİNE RESVERATROLÜN ETKİSİ

Dr. Burak Cem Soner. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji AD.
35340 Balçova-İzmir. cem.soner@deu.edu.tr

AMAÇ VE HİPOTEZ

Eretil disfonksiyon (ED) risk faktörleri ile kardiyovasküler hastalıklar (KVH) için belirlenen risk faktörleri oldukça benzerdir. Çalışmamızda amaçlanan hiperkolesterolemik ortamda oral resveratrolün korpus kavernozum (KK) dokusunda, torakal aorta (TA), mezenterik arter (MA) ve renal arter (RA)'de endotel disfonksiyonu önleyici etkisini karşılaştırmalı olarak araştırmaktır.

YÖNTEM

Gruplar 6 hafta süre ile normal yem, %2 a/a'lık kolesterol diyeti ve %2 a/a kolesterol diyeti+4mg/kg/gün resveratrol ile beslenmiştir. Bu süre sonunda plazma kolesterol düzeyleri değerlendirilmiştir. RA, TA, MA ve KK dokuları alınarak izole organ banyosunda kümülatif dozlarda asetilkolin (ACh) ve sodyum nitroprussit (SNP) ile sırası ile endotel bağımlı ve endotel bağımsız yanıtları değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Plazma total kolesterol düzeyleri hiperkolesterolemik grup ve resveratrol grubu arasında anlamlı farklılık göstermezken; her 2 grup da kontrol grubu ile anlamlı farklılık göstermiştir. Resveratrol+kolesterol grubunda ACh'e bağlı gevşeme yanıtları hiperkolesterolemik grup ve kontrol grubu ile anlamlı farklılık göstermiştir. Gruplar arasında endotel bağımsız gevşeme yanıtlarında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. %2 a/a 6 hafta süre ile hiperkolesterolemik diyet sonucu oluşan endotel bağımlı gevşeme yanıtları en fazla sırası ile MA>KK>TA>RA'de bozulma göstermektedir. Tavşanların 6 hafta süre ile %2 kolesterol ile beraber 4mg/kg/gün

resveratrol ile beslenmeleri ACh yanıtlarında düzelmeye neden olmuştur. Bu düzelme değerlendirildiğinde ise sırası ile en fazla MA>RA>KK>TA' da olmaktadır.

SONUÇ

4mg/kg/gün resveratrol ile beraber %2 kolesterol diyeti RA, TA, MA ve KK dokularını hiperkolesteroleminin endotel disfonksiyon oluşturucu etkilerinden korumuştur. Hiperkolesterolemik ve resveratrol gruplarının plazma kolesterol düzeyleri arasında herhangi bir anlamlı farklılık oluşmaması resveratrolün bu koruyucu etkisini plazma kolesterol düzeyinde bağımsız bir mekanizma ile yaptığını göstermektedir. İleriki çalışmalarımız ile bu etki mekanizmasını değerlendirmeyi planlamaktayız.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

Resveratrol, endotelyal disfonksiyon, hiperkolesterolemi, korpus kavernozum

SUMMARY

EFFECTS OF RESVERATROL ON HYPERCHOLESTEROLEMIC RABBIT SMOOTH MUSCLE

Dr. Burak Cem Soner. Dokuz Eylül University Faculty of medicine, Department of pharmacology. 35340 Balçova-Izmir. cem.soner@deu.edu.tr

OBJECTIVE

The risk factors for cardiovascular diseases (CVD) and erectile dysfunction (ED) are similar. In our study; we aimed to study and compare the protective effects of resveratrol in hypercholesterolemia on thoracic aorta (TA), mesenteric artery (MA), renal artery (RA) and corpus cavernosum (CC).

MATERIAL AND METHODS

Animals fed a %2 a/a cholesterol diet and %2 a/a high cholesterol diet+resveratrol (4 mg/kg/day) for 6 week duration. Total cholesterol levels in the plasma were measured after the cholesterol challenge. Vascular and endothelial functions in RA, TA, MA and CC were assessed by isolated tissue bath with cumulative doses of acetylcholine and sodium nitroprusside.

RESULTS

Even there have been no significant changes on plasma total cholesterol levels between cholesterol and cholesterol+resveratrol treated groups; both groups showed significant changes when compared with control group. Vasorelaxation responses to ACh in resveratrol treated group showed significant changes when compared with hypercholesterolemia and control group. No statistically significant differences were seen between endothelium independent vasorelaxation responses between three groups. %2 a/a cholesterol diet for 6 weeks has diminished endothelium dependent vasorelaxation responses mostly on MA>CC>TA>RA respectively. Resveratrol has proved endothelial responses when given with %2 a/a cholesterol for 6 weeks. The protective effect of resveratrol was seen most on MA>RA>KK>TA respectively.

CONCLUSION

The results also provide support that 4mg/kg/day resveratrol can suppress endothelial dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. Resveratrol is showing this protective effect without changing plasma total cholesterol levels. Further studies will show the mechanism of this protective effect on endothelial dysfunction.

KEY WORDS

Resveratrol, endothelial dysfunction, hypercholesterolemia, corpus cavernosum

1 GENEL BİLGİLER

1.1 ATEROSKLEROZ

1.1.1 Tanım ve Genel Bilgiler

Ateroskleroz büyük ve orta boy elastik ve muskular arter duvarlarında kalınlaşma ve lipit birikimleri sonucu arter lümeninin daralması ve arterin kanlandırdığı bölgeye yeterli miktarda oksijenlenmiş kan taşınamamasına bağlı olarak iskemiye neden olan bir hastalıktır. Aterosklerotik lezyonlar koroner arterler, karotid arterler, basiller ve vertebral arterler gibi muskular arterlerde bulunabilmekle beraber aynı zamanda aorta, iliyak arterler ve femoral arterler gibi elastik arterlerde de bulunabilmektedir. Aterosklerotik lezyonlar birçok patogenetik oluşumun sonucudur. Bunların içerisinde makrofajlarda köpük hücre oluşumu ve ölümü, ekstrasellüler lipit birikimi, hücre içerisindeki yapısal matriks ve düz kas hücrelerinin azalması ve yer değiştirmesi, mineral depozit oluşumlarının meydana gelmesi, kronik enflamasyon, yeniden damar yapılanmasının oluşması, lezyon yüzeyinde bozulmaların oluşması ve hematoma ve/veya trombüsün fibromuskular dokuya dönüşümü sayılabilir. Lezyonun oluşumu veya ilerlemesi esnasında bu oluşumlardan bir veya birkaçı aynı anda bulunabilir. Hastalığın seyri esnasında bu oluşumların bazıları devamlı olarak bulunurken bazıları ise belirli evrelerde görülebilir (1). Ateroskleroz oluşum gösterdiği yere göre; koroner arterlerde miyokart enfarktüsüne, beyine giden damarlarda olması durumunda felç, penil arterde olması durumunda ED, iliyofemoral arterlerde olması durumunda intermittant kladikasyon, RA'de olması durumunda ise böbrek yetmezliği gibi çok çeşitli klinik hastalıklara neden olabilmektedir.

1.1.2 Ateroskleroz Etiyolojisi

Epidemiyolojik çalışmalar aterosklerozun görülme sıklığı ve klinik seyrini etkileyen birçok risk faktörü olduğunu bildirmiştir. Bu risk faktörleri önlenemeyen ve önlenemeyen risk faktörleri olarak iki sınıfta incelenmektedir. Önlenemeyen veya değiştirilemeyen risk faktörleri; yaş, cinsiyet ve genetik faktörlerdir (ailesel yatkınlık)

(2). Aterosklerotik lezyonlar özellikle yaşın artması ile beraber daha sık gör÷lmektedir. Kardiyovask÷ler hastalıklar gibi ateroskleroza baēlı olarak gör÷len hastalıkların insidansları erkeklerde kadınlara göre daha fazla olarak gör÷lmektedir. 60 yaş altı erkeklerde kardiyovask÷ler hastalık insidansı kadınlara göre 2 kat daha fazla gör÷lmektedir (3). Diyabet, hipertansiyon gibi ateroskleroz oluşumunu kolaylaştırıcı faktörlerde de ailesel yatkınlık gör÷lebilmektedir. Lipit metabolizmasının herhangi bir basamaēında oluşabilecek olan genetik bir bozukluk da ateroskleroza ailesel yatkınlık oluşturabilmektedir (4).

Deēiřtirilebilen ya da önlenilebilen risk faktörleri ise hiperlipidemi, sigara kullanımı, şişmanlık, stres, fiziksel aktivite azlıēı olarak sıralanabilir. Bunlar içerisinde en fazla hiperlipidemi üzerinde durulmaktadır. Bunların dışında hiperhomosisteinemi ise baēımsız risk faktörü olarak sınıflanmıştır.

1996 yılında ÷lkemizde yapılmış olan bir çalışma ile

- ✓ 6 Milyon kişide 200–239 mg/dl arası plazma kolesterol düzeyleri
- ✓ 2 Milyon kişide 240 mg/dl üzerinde plazma kolesterol düzeyleri
- ✓ Halk genelinde Yüksek Yoēunluklu Lipoprotein (YYL) düzeylerinin düşük olduēu
- ✓ Fiziksel aktivite alışkanlıklarının yetersiz olduēu
- ✓ Erkeklerde aşırı sigara tüketimi olduēu
- ✓ Kadınlarda 40 yaş üzeri şişmanlama ve diyabet gör÷lme sıklıēında artış olduēu
- ✓ Hipertansiyonun sık gör÷len bir hastalık olduēu belirlenmiştir (5).

Gelişmiş olan ÷lkelerde ölümlerin yaklaşık olarak %35'i aterosklerotik kalp hastalıklarına baēlanmakta iken, bu oran ÷lkemizde %50 olarak belirlenmiştir (6-8).

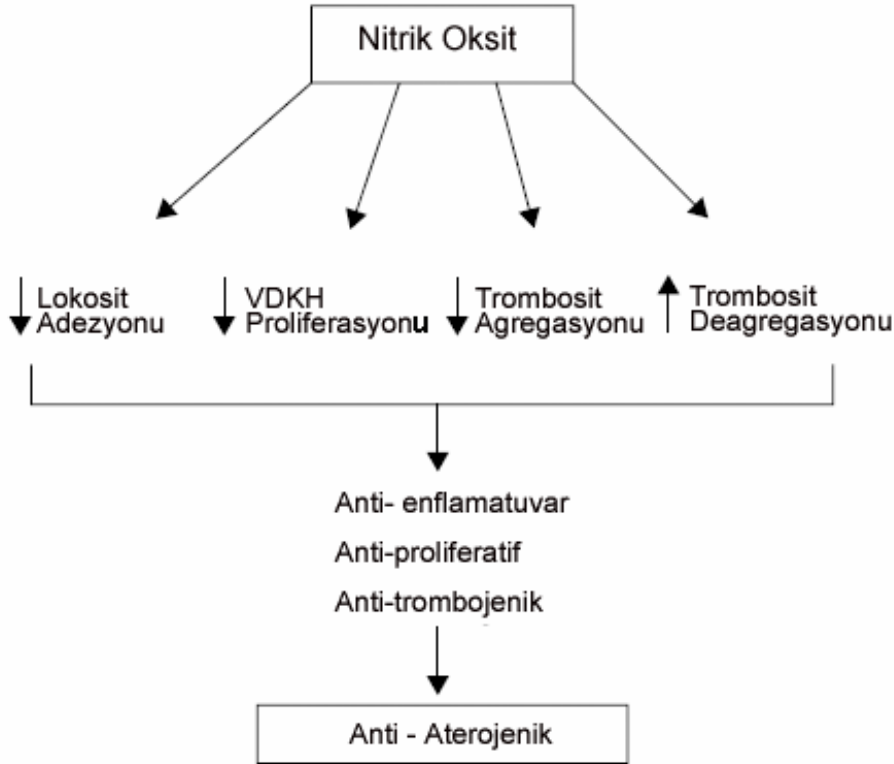
1.1.3 Ateroskleroz Patogenezi

Ateroskleroz patogenezinde nitrik oksit (NO) ok önemli bir yere sahiptir. Dış uyarılara yanıt olarak oluşan endotelyumun NO üretiminde azalma aterosklerozun başlangıcı olarak deēerlendirilmektedir (9). Bu nedenle aterosklerozun önlenmesi için

asıl önlenmesi gereken basamağın endotelial disfonksiyon basamağı olduğu ileri sürülmektedir.

1.1.3.1 Enflamasyon ve Trombozisin Endotelium Tarafından Düzenlenmesi

Vasküler tonusun devamlılığının sağlanması dışında, normal endotelium anti-proliferatif ve anti-enflamatuvar özelliklere de sahiptir. Endotelium bağımlı vazodilatör olan NO; lökositlerin endotelium duvarına adezyonunu (10,11), vasküler düz kas hücrelerinin (VDKH) migrasyon ve proliferasyonunu inhibe eder (12,13) ve endotelium hücrelerinin proliferasyonunu stimule eder (14). Bunun yanında NO trombosit agregasyonunun inhibisyonu ve trombosit deagregasyonunun stimülasyonunu sağlar (15) (Şekil1).



Sekil 1: Nitrik Oksitin Anti-aterojenik etkileri

Prostasiklinler; bir diğer endotelium bağımlı gevşetici ajanlardır. Bu ajanlar, NO ile sinerjistik olarak etkileşir veya NO'e sinerjistik olarak etki ederler, trombosit

agregasyon ve adezyonunu inhibe ederler (16). Bunun yanında sağlıklı endotelyum hücrelerinin yüzeyleri negatif yüklü olarak heparanlar ile sarılmıştır ve kontakt inhibisyon sağlarlar (17). Endotelyum hücreleri doku plasminojen aktivatörleri (tPA), trombin inaktivatörleri ve trombomodülin gibi antikoagülan faktörler sentezlerler (18). Sonuç olarak lökositler vasküler yüzeye tutunamaz ve hücre proliferasyonunu sıkıca kontrol ederler (19). Bunlar endotelyal disfonksiyon ve ateroskleroz karşısında görev alan savunma sistemleridir.

1.1.3.2 Enflamasyon ve Tromboziste Kontrol Kaybı

Endotelyal fonksiyonun kaybı normal antikoagülan savunma mekanizmasında bozukluk ile sonuçlanır. NO azalması, anormal heparanlar, lokal trombin aktivasyonu, doku Trombosit Aktive edici Faktör-1 (PAF-1) rölatif azalması ve trombomodülin lokal koagülasyona katkıda bulunurlar (20). Benzer olarak artmış tPA inhibisyonu ve doku PAF-1'inin azalması pıhtı lizisinde azalmaya neden olur (21,22). Trombin aktivasyonu, membrana bağlı trombosit adezyon molekülleri, kollajen maruziyeti, doku faktörlerinin üretiminde artış ve NO azalması trombosit adezyon ve agregasyonuna neden olur (23,24).

Endotelyal disfonksiyon gelişmesine aracılık eden birçok risk faktörü ve patolojik uyarılar aynı zamanda damar duvarının anormal çalışmasına neden olur. Bu olay ise sinyal kaskatı sonucu adezyon ve enflamasyonun tetiklenmesini sağlar ve damar duvarındaki VDKH'lerinin, fibroblastların ve matriksin anormal büyümesi ile sonuçlanır. Bu süreç ise intimal kalınlaşma ve plak formasyonuna ilerler (25).

1.1.3.3 Endotelyal Disfonksiyonda Oksidatif Stresin Rolü

Endotelyal disfonksiyon gelişimi bazı fizyolojik belirleyicilerin azalması ile ilişkilidir. Oksidatif stres veya reaktif oksijen türleri (ROS) endotelyal disfonksiyon gelişimindeki ana unsurlardan biridir. Hücre içi ROS oluşumundaki mekanizma NAD(P)H oksidaz, ksantin oksidaz, lipoksigenaz (LOX), sitokrom p450, monooksijenaz ve siklooksijenaz (COX) gibi çoklu enzim sistemlerini içerir (26,27). Damar yapısında ROS oluşması NO azalmasına ve peroksinitrit oluşumuna neden olur (28). Böylece nitrik oksit sentazın (NOS); normalde NO üreten oksijenaz kısmı yerine ROS üreten redüktaz aktivitesi görmesine yol açar. Bu olay ise pozitif geri-bildirim yolu ile daha yüksek miktarda ROS üretimi ile sonuçlanır (29). Peroksinitrit

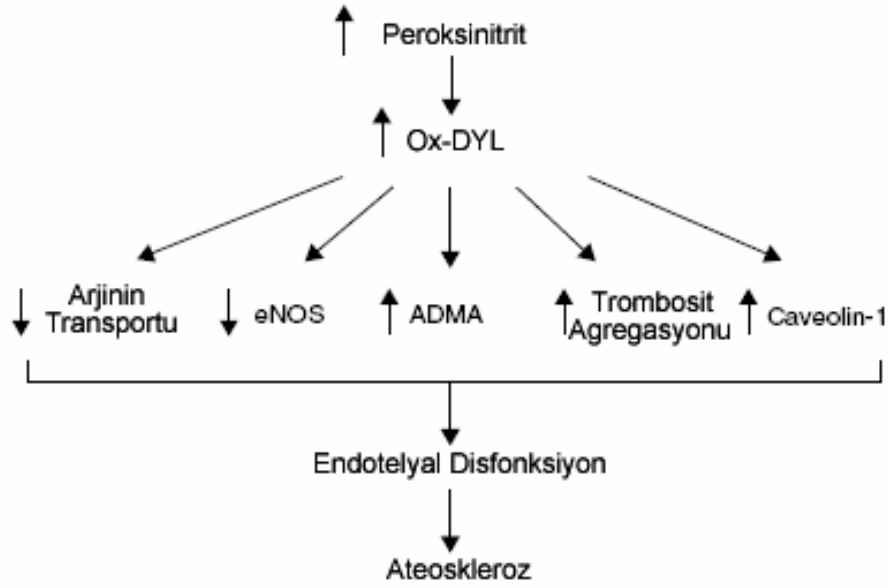
düşük yoğunluklu lipoprotein (DYL) moleküllerinin oksidasyonunda önemli bir mediyatördür (30). Okside DYL (Ox-DYL) oluşumundan sonra endotelial disfonksiyonu arttırabilir ve ateroskleroz patogenezinde katkıda bulunabilir. Yapılmış olan çalışmalar DYL partiküllerinin yoğunluğunun, Ox-DYL düzeyinin, bireylerde DYL'nin oksidasyona olan eğilimin ve Ox-DYL' ye karşı oluşan otoantikörlerin miktarının endotelial disfonksiyon ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (31). Ox-DYL, NO üretimini birçok farklı mekanizma ile etkileyebilir.

a. Ox-DYL, endotelial hücre agonistleri hücrelerine agonistler tarafından stimule edilmiş olan arjinin transportunu inhibe edebilir.

b. Ox-DYL, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ekspresyonunu hem mRNA hem de protein düzeylerinde inhibe ederek NO üretimini direkt olarak inhibe edebilir (32).

c. Ox-DYL, asimetrik dimetil arjinin (ADMA) miktarlarını arttırabilir. ADMA NOS'ın kompetitif inhibitörüdür ve L-arjinin ile substrat düzeyinde yarışarak NO üretimini azaltabilir (33,34).

d. Ox-DYL, caveolin-1 sentezini arttırır. Caveolin-1, caveola olarak adlandırılan membran invaginasyonlarının devamlılığını koruyan 21-24 kDa'luk membran proteinidir ve eNOS'ı bağlayıp inaktif bir biçimde tutarak NO miktarının azalmasına neden olur (35) (Şekil 2).



Sekil 2: Ox-DYL'ye bağılı oluşan endotelial disfonksiyon ve ateroskleroz mekanizmaları

NO üretiminin azalmasına bağılı olarak Ox-DYL trombin oluşumuna ve trombosit agregasyonunun artışına neden olur (36). Ek olarak Ox-DYL prostasiklinler ve endotelin-1 (ET-1) gibi diğler endotelial ürünler arasındaki dengenin bozulmasına neden olarak trombosit agregasyonuna neden olur (26,37). Bunun sonucunda Ox-DYL'nin oluşması moleküler mekanizmalar aracılığı ile endotelial disfonksiyona neden olur .

Ox-DYL'nin ateroskleroz gelişimi üzerine etkisi olan günümüzde etraflıca araştırılmıştır. Ox-DYL endotelial hücreleri, makrofajlar ve VDKH'leri gibi damarsal içeriğı aktive eder. Aynı zamanda monositler için kemotaktik uyarıları aktive ederek onları makrofajlar haline çevirir. Bu makrofajlar Ox-DYL' yi yakalayıcı reseptörleri (SR) (CD-36, SR-A, SR-PSOX) aracılığı ile alırlar ve "köpük hücreleri" ne dönüşürler. Bu hücreler ise ateroskleroz için anahtar özelliğindedirler (38).

ROS ve onun modifiye hedef biyomolekülleri (ör: Ox-DYL) gerçek ikincil mesajcı moleküller olarak adlandırılırlar. Bunlar nükleer transkripsiyon faktörlerinin artışı, kalsiyum sinyali, protein kinaz ve protein fosfataz yollarının modülasyonu gibi birçok önemli sinyal transdüksiyon kaskatının düzenlenmesinde rol alırlar

(39,40). Mitojen aktive protein kinaz (MAPK), nükleer faktör-kappa B (NFκB) ve aktivatör protein-1 gibi redoks duyarlı nükleer transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyonel aktivitelerini artırır ve fosforile eder (26). Bu nükleer faktörlerin aktivasyonu ise adezyon ve makrofaj ve lökositlerin endotele yapışmasını kontrol eden proteinleri kodlayan genlerde upregülasyona neden olur.

Monosit Kemotaktik Protein -1 (MCP-1)'in artmış olan üretimi mononükleer fagositlerin toplanmasına, intersellüler adezyon molekül-1 (ICAM-1)'in ekspresyonunda artışa ve E-selektin ile de bu hücrelerin damar duvarına yapışmasında artışa neden olur. Bu artış hem Ox-DYL tarafından hem de endotelyum hücrelerinin redoks durumundaki değişikliğine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (41-43). Azalmış NO ve artmış oksidatif stres aynı zamanda özellikle aktive matriks metalloproteinazları (MMP)-2 ve MMP-9'yi aktive eder ve ateroskleroz ilerleyişinde hızlanmaya neden olur (44,45). Sonuç olarak NO biyolaranımının azalması, artmış oksidatif stres ve adezyon moleküllerinin ekspresyonu ve sitokinler ile birlikte oluşan endotelial disfonksiyon sadece başlangıç aşamasında değil aynı zamanda aterosklerotik hastalığın progresyonu ile de ilişkilidir (46).

Vazokonstriktör ajan olan anjiotensin II (Anj II) NADPH oksidazı aktive ederek ROS oluşumuna ve süperoksit radikallerini arttırarak NO miktarında azalmaya ve buna bağlı vasküler fonksiyonlarında bozulmaya neden olur (47). Anj II sadece vazokonstriktör olarak görev almaz; aynı zamanda ET-1 üretimini de stimule eder (48). ET-1 ve Anj II VDKH'nin proliferasyonunu arttırarak ateroskleroz gelişimine katkıda bulunurlar (49,50).

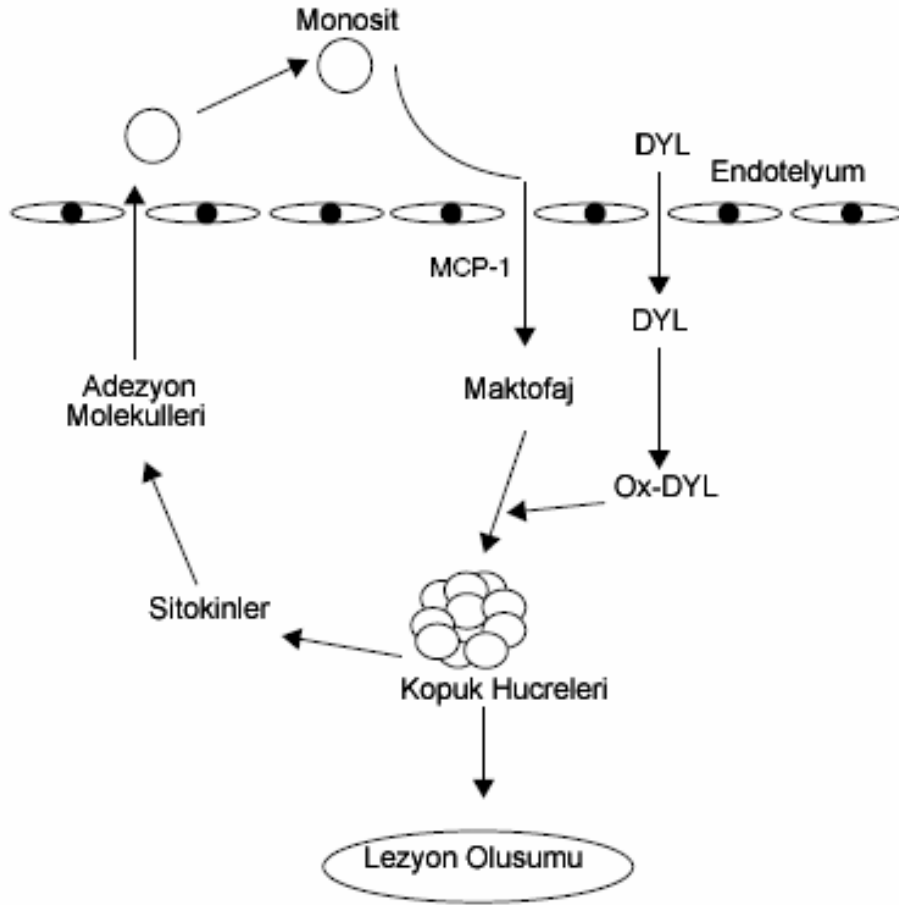
1.1.3.4 Endotelial Disfonksiyonda Enflamasyonun Rolü

Oksidatif stres endotelyumun proenflamatuvar durumu ile yakın ilişkili bulunmuştur. Vasküler hücre adezyon molekül-1 (VCAM-1), ICAM-1, integrinler ve E-Selektin'in oksidatif strese yanıt olarak ekspresyonu enflamatuvar olayın başlangıcında önemli bir rol oynar (30). Aslında VCAM-1, ICAM-1 ve E-Selektin'in plazmadaki çözünebilir formları endotelial disfonksiyonun başlangıç göstergeleri olarak düşünülmüştür (52-55). Normal fizyolojik durumlarda endotelyum, yüzeyine dolaşan immün efektör hücrelerin yapışmasına izin vermez. Fakat endotel disfonksiyonu endotelyumun non-adheran özelliğinin ortadan kalkmasına neden olur.

Disfonksiyonel endotelyum VCAM-1, ICAM-1 gibi çeşitli adezyon moleküllerini eksprese eder ve bu da monosit, makrofaj, T-lenfositler ve trombositlerin endotelyuma toplanmasına aracılık eder. Bu olay da endotelyum tarafından interferon- γ (IFN- γ), tümör nekroz faktör- α (TNF- α), interlökinler (IL-1, 2, 6, 8) ve MCP-1, MCP-4, COX ve MMP gibi proenflamatuvar sitokinlerin üretimine neden olur (56). Böylece bir proenflamatuvar geri bildirim halkası oluşur çünkü :

- a. Bu mediyatörler endotelyuma ek olarak lokal sitokin salınışına neden olacak immün hücreler getirirler.
- b. Endotelyumun DYL reseptör ekspresyonunu arttırmak ve böylece Ox-DYL partiküllerinin endotelyum yüzeyinde hasar verici etkilerine sebep olurlar.
- c. Sistemik enflamasyon kaskatını stimule ederler (57).

Endotelyumun proenflamatuvar durumu membran geçirgenliğini etkiler. Yapışmış olan Ox-DYL'nin subendotelyal aralığa geçmesine neden olur. Dolaşan makrofajlar bu immünolojik DYL'yi tanırlar ve bu lipit antijenlerini fagosite ve sekestre etmek için subendotelyal alana göçerler (58). Bu yönlendirilmiş göç MCP-1'in reseptörleri ile etkileşimine bağlı olarak oluşmaktadır. İntimaya yerleştikten sonra makrofajlar içeri alınmış olan Ox-DYL partiküllerini yakalamak için SR'lerini eksprese ederler ve bu da arteriyel lezyonlarda "köpük hücre" oluşumu ile sonlanır (59). Bu köpük hücreleri proenflamatuvar sitokinleri salgılamaya devam ederler ve bu da yüksek miktarda immün hücrelerin ortamda toplanmasına neden olur (60). Bu olaylar sonucunda daha sonra klasik ve alternatif kompleman sistemleri aktive edilerek VDKH'lerinin proliferasyonu stimule edilir (61,62). Böylece hücre duvarında enflamatuvar aktivitenin kötü sonuçlar doğuracak olan bir döngüsü oluşur ve bu olaya bağlı endotelyal disfonksiyon ve lezyon gelişimi şiddetlenir (Şekil 3).



Sekil 3: Endoteldeki enflamatuvar aktivite sonucu lezyon oluşumu

Disfonksiyonel endotelyum yüksek miktarda proliferatif özellikler gösterir. Birçok yönden endokrin bir doku gibi davranır. Trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), Fibroblast büyüme faktörü (FGF), Transforme edici gelişim faktörü beta (TGF- β), IL-1 ve TNF- α gibi birçok büyüme faktörlerinin üretimi sonucu VDKH proliferasyonu ve migrasyonuna ve aynı zamanda endotelyumun da kendi kendine proliferasyonuna yol açar. Bunun yanında NO azalması, artmış trombosit tutunması, vazoaktif ajanların (tromboksanlar, ET-1, Anj II) salınışı ve MMP ekspresyonunun artması gibi faktörler endotelyumda lokal vazokonstriksiyona, fibroblast ilişkili kollajen sentezine ve matriks depolanmasına neden olacaktır (63-67). Özellikle, endotelyum tarafından salınan MMP ve diğer immün hücreler ekstraselüler matriksin bozulmasında önemli bir rol oynarlar ve plağın fibröz sağlamlılığına katkıda bulunurlar. MMP ile ilişkili olarak aterosklerotik plaklarda sonradan gelişen fissür veya ülserasyon alanları trombositlere bağlı damarsal hemoraji, rüptür, trombozis, embolizasyon ve oklüzyona

karşı hassastır (68). Bu nedenle enflamatuvar moleküller ateroskleroz gelişimi ve ilerlemesi üzerine önemli bir role sahiptirler.

1.1.3.5 Ateroskleroz ve Endotelyal Disfonksiyon İlişkisi

Damar endoteli kan damarlarının iç yüzeyini kaplayan bir yapıdır. Yıllarca; kan ve intersitium arasında geçirgenliği sağlayan yarı geçirgen bir yapı olarak düşünülmüştür. Bugün ise sekretuar, düzenleyici ve immünolojik özellikleri olan dinamik heterojen bir organ olarak değerlendirilmektedir (69). Endotelyum besinlerin, birçok biyolojik aktif moleküllerin ve kan hücrelerinin tüm insan vücudunda dolaşmasını düzenler. Proteinler (büyüme faktörleri, koagülasyon proteinleri ve antikoagülan proteinler), lipid taşıyıcı partiküller, metabolitler (NO, serotonin) ve hormonlar (ET-1) gibi birçok molekülleri içeren hücre membran reseptörleri için seçici geçirgen olarak görev alır. Sağlıklı endotelyum aynı zamanda vasküler tonus düzenlenmesinde rol alarak enflamasyonu, hemostazı ve tamir basamaklarında oluşabilecek olan trombotik olayları kontrol eder (70).

Travma ve birçok patolojik faktörlere bağlı olarak oluşan endotelyum aktivasyonu, kendi düzenleyici fonksiyonlarında değişiklikler oluşmasına neden olur. Endotelyum vasküler hemostazın sağlanmasında yetersiz hale gelir. Bu olay ise gevşetici ve kasıcı ajanlar, prokoagülan ve antikoagülan mediyatörler, hücre büyümesi uyarıcıları ve inhibe edicileri arasında sırası ile oluşan dengesizliğe neden olarak endotelyal disfonksiyon olarak tanımlanan olaya neden olur (19).

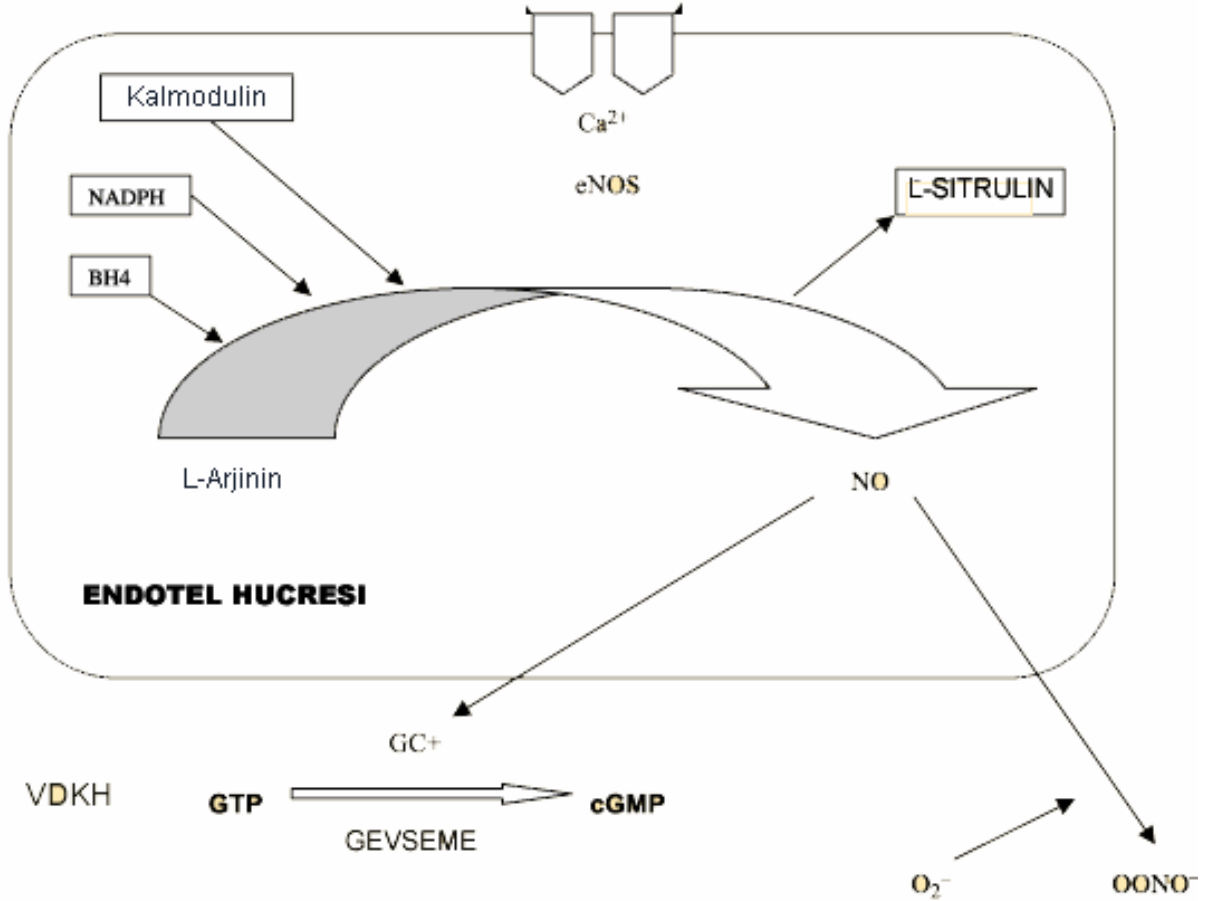
1.1.3.5.1 Vasküler Tonusun Endotelyum Tarafından Düzenlenmesi

Vasküler tonusun düzenlenmesi, endotelin en önemli görevi olarak bilinmektedir. Bu görevi birçok kasıcı ve gevşetici ajan salımı ile sürdürür. Bu faktörler arasındaki denge endotelin fonksiyonel veya disfonksiyonel durumunu belirler.

1.1.3.5.1.1 Vazodilatasyon Oluşturan Faktörler

Endotel hücreleri tarafından salınan ana gevşetici faktör NO'dur. NO, L-arjinin'in, L-sitruilin'e oksidasyonu sırasında NOS enzimi tarafından oluşturulan serbest radikaldir (70). Bu enzimin, nöronal NOS (nNOS), indüklenebilir NOS (iNOS) ve endotelyal NOS (eNOS) olmak üzere 3 alt tipi vardır. Endotelyum hücreleri esas

olarak eNOS eksprese ederler ve buna bağlı olarak devamlı bir biçimde sistemik ve pulmoner dolaşıma düşük miktarlarda NO salıverirler (72). Endotelyum hücrelerinde NO bir defa salındıktan sonra düz kas hücrelerinde bulunan hem'in prostetik grubu ile etkileşir. Bu ise guanilat siklaz aktivasyonuna ve siklik guanidin monofosfat (cGMP) üretiminde artışa neden olur. Artmış cGMP hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda azalmaya ve buna bağlı olarak ise VDKH'de gevşemeye neden olur (73) (Şekil 4).



Sekil 4: NO-c GMP yolağı aracılı korpus kavernozum düz kas gevşemesi

Prostasiklin ve endotel bağımlı hiperpolarizan faktör (EDHF), endotelyum tarafından salgılanan ve damar tonusunun düzenlenmesi üzerine etkili diğer vazodilatör ajanlardır. Prostasiklinler endotelyum tarafından hüneral ve hemodinamik yanıt olarak üretilirler (75). Araşidonik asidi (AA) substrat olarak kullanılarak COX enzimi aracılığı ile sentezlenirler. Prostasiklinler gevşetici etkilerini adenilat siklaz stimülasyonuna bağılı olarak VDKH'de hücre içi siklik adenozin monofosfat (cAMP) konsantrasyonunu arttırarak gösterirler (16,75). Endotel kaynaklı gevşetici faktör

(EDRF) ise gevşetici etkisini hücre membranında potasyum geçirgenliğini arttırarak gösterir (76).

1.1.3.5.1.2 Vazokonstriksiyon Oluşturan Faktörler

Normal vasküler tonusun devamlılığı için endotelyum hücreleri endotelinler, tromboksan A₂ ve prostaglandin H gibi birçok kasıcı mediyatör salgılar. Bunların içerisinde ET-1 endotelyum hücreleri tarafından salınan en güçlü kasıcı ajandır (77). Trombin, adrenalin, Anj II, hipoksi ve artmış gerilim stresi gibi uyaranlara yanıt olarak üretilir (78). VDKH' de spesifik reseptörlerine bağlanarak hücre içerisindeki kalsiyum konsantrasyonunun artmasına sebep olur ve NO'in etkisini antagonize eder. İlginç olarak sağlam endotelyumda ET-1, NO ve prostasiklin üretimini stimule ederek ve vazokonstriktör etkiyi ayarlayarak kendi sentezini azaltır (79).

Endotel hücreleri tarafından sentezlenen tromboksan A₂ ve prostaglandin H₂ VDKH'lerindeki ve trombositlerdeki tromboksan reseptörlerini aktive ederler. Bu faktörler de NO'in ve prostasiklinin etkilerine ters bir etki oluşturarak VDKH'de kasılmaya neden olurlar. Bununla beraber bu maddelerin koroner arter üzerine olan etkileri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. PAF-1'de endotelyum hücrelerinden hümoral ve hemodinamik uyarılar sonucunda sentezlenen ve salınan vazomotor tonus ayarlayıcı başka bir kasıcı ajandır. Son olarak endotelyum anjiotensin dönüştürücü enzim (ADE) eksprese eder ve bu da anjiotensin I'den Anj II dönüşümüne neden olarak direkt ET-1 salınışına neden olur.

Sonuç olarak vazokonstriktif ve vazodilatör ajanların arasındaki bu ilişki sağlıklı endotelin vasküler tonus üzerine olan etkisini belirler. Bu denge üzerinde herhangi bir değişiklik endotelial disfonksiyon gelişimine neden olur.

1.1.3.5.2 *Endotelial Disfonksiyona Bağlı Vasküler Tonus Azalması*

Vasküler tonus kaybı endotelial disfonksiyon oluşumunda ilk ortaya çıkan olaydır. Kasıcı ajanların artması ve gevşetici ajanların azalması ile karakterize bir olaydır. Birçok çalışma NO'in kullanılabilir miktarında azalma ve endotelial disfonksiyon arasında güçlü bir ilişki olduğunu bildirmiştir (80-85). Bu olay eNOS'ın aktivitesinde azalmaya veya NO'in indirgenmesinde artışa bağlı olabilir. NO kan damarlarındaki endotelyum bağımlı gevşemeden temel olarak sorumlu olduğu için,

ateroskleroz sırasında bu gevşetici etkinin bozulması koroner ve periferik arterlerde gevşeme yanıtlarında ciddi azalmaların oluşmasına neden olmaktadır (86,87).

Vazodilatör NO'in kaybına ek olarak, ET-1 gibi vazokonstriktör faktörlerin üretiminde artış da endotelyum hasarı ile ilişkilidir (88-90). Bu olay ise NO kaybında daha fazla artışa neden olmakta ve damar yapısının kontrolsüz kasılması ile sonuçlanmaktadır. İlerleyen dönemlerde ise hipertansiyona ve koroner kalp hastalıkları, ED, periferik arter hastalıkları gibi hastalıklara neden olmaktadır.

1.2 EREKTİL DİSFONKSİYON

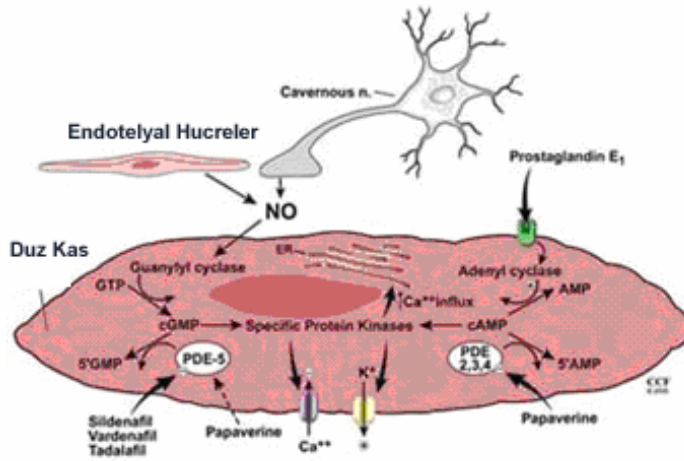
1.2.1 Ereksiyon Fizyolojisi

Ereksiyon, seksüel bir uyarı sonrası KK'daki düz kas elemanlarının ve arterlerin gevşemesine bağlı olarak gelişen hemodinamik bir durumdur. Penil ereksiyon için gerekli uyarılar parasempatik sinir lifleri ile taşınır. KK'daki düz kas elemanlarının relaksasyonunu takiben, sinüzoitlere kan dolmaya başlar. Genişleyen sinüzoitler ile tunika albuginea arasında küçük venüllerin kompresyonu, venöz akışın kısıtlanmasına, dolayısıyla da kanın KK içinde tutulması sonucunda da ereksiyona neden olur.

Penis düz kasının (arteriyel ve trabeküler) kasılma aktivitesi; yeterli seviyede agonist (nörotransmitter, hormonlar ve endotelyum ilişkili maddeler), reseptörlerin yeterli ekspresyonu, transdüksiyon mekanizmalarının bütünlüğü, kalsiyum hemostazı, kasıcı proteinler arasındaki ilişki ve düz kas hücrelerinin hücre arası ilişkileri (gap-junctionlar) gibi birçok faktörle ayarlanmaktadır. Kasıcı ve gevşetici faktörler arasındaki denge ve etkileşim penis düz kas tonusunda belirleyicidir. Düz kas kasılması intrasellüler kalsiyumun, rölatif olarak ve kasıcı mekanizmanın kalsiyuma olan sensitivitesinin artmasına bağlıdır. Düz kasın tonusunu ise kalsiyum sensitizasyon mekanizmasının kasıcı ve gevşetici faktörlere olan net cevabı belirler.

Vasküler fizyolojinin anahtar düzenleyicisi olan endotelyumun ereksiyon oluşumunda temel bir rolü vardır. Diyabet, hipertansiyon, hiperkolesterolemi gibi endotelial disfonksiyonun geliştiği hastalıklar artmış ED prevalansı ile ilişkilidir. Düz kas kasılmasını etkileyen birçok madde endotelde üretilir. Bunlar düz kasta kasılmayı (endotelin, TXA₂) ve gevşemeyi (NO, PGI₂) sağlayan maddeleri kapsamaktadır. Bununla birlikte endotelial fonksiyonun korunması genellikle yeterli vasküler düz kas

gevşemesinin devamlılığı ile ve kontraktıl cevapların modülasyonu ile ilişkilidir. Humoral ve parakrin stimulusa cevap olarak endotel düz kas gevşemesi sağlayan maddeler salgılar. Endotel – bağımlı vazodilatörler (ACh, bradikinin) endotelyal hücrede intrasellüler kalsiyum artışı sağlayan endotelyal reseptörleri etkileyerek vasküler düz kas gevşemesini oluşturmaktadır (Şekil 5). Kalsiyum artışı düz kasta gevşeme oluşturan lokal mediyatörlerin sentezinden sorumlu endotelyal enzim aktivitesini tetiklemektedir. Hayvan modellerinde gösterildiği gibi ACh'in intrakavernozal enjeksiyonu ereksiyon sağlamaktadır.



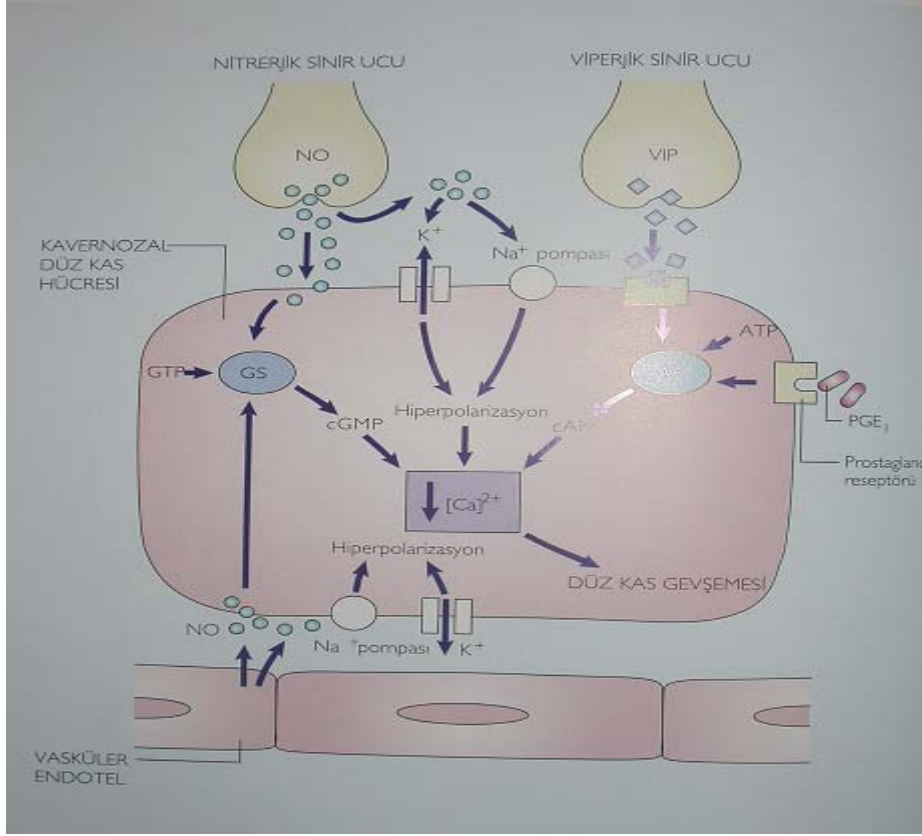
Şekil 5: Korpus kavernozum endotelinden salınan vazodilatatör maddeler

İnsan KK' unda endotel bağımlı gevşemeden sorumlu tek mediyatör NO yüksek oranda reaktif olan, kimyasal olarak stabil olmayan bir serbest radikaldir. NOS, L–arjinin ve moleküler oksijeni kullanarak NO ve L–sitrulin üretmektedir. Tetrahydrobiopterin ve NADPH bu reaksiyon için gereklidir (91,92). nNOS ve eNOS sırasıyla penisin kolinerjik sinirlerinde ve endotelde eksprese olmaktadır (93-98). Postganglionik parasempatik sinirler olan nitrejik sinirler yapılarında nNOS içerirler ve NO salınımına aracılık ederler (95-100). Kavernoza sinir uyarımı peniste gevşemeye neden olan NO salınımını sağlayan sinir terminallerindeki nitrejik sinir liflerini aktive eder (101,102). Birçok hayvan modelinde spinal kord veya kavernoza sinir stimülasyonu ile sağlanan ereksiyon NOS inhibitörlerince inhibe edilebilir (93,103-105). Penis kan damarlarındaki endotelde ve KK' un endotelyumunda

bulunan eNOS, NO'in diğeri bir kaynağıdır. Erektile fonksiyonu eNOS'in sağladığına dair 3 teori ileri sürülmektedir. Birincisi, postganglionik kolinerjik liflerden salgılanan ACh'in endotelden NO salınımını sağlıyor olabilmesi. Gerçekten izole KK veya penil arterlerde ACh'in dışardan uygulanması endotele bağımlı gevşeme oluşturmaktadır . eNOS ile ilgili ikinci olasılık, gerilim stresi ile eNOS'in aktive olmasına bağılı olabilir (106). Ereksiyon süresince vasküler ve sinüzoidal lümenin genişlemesi gerilim stresine neden olabilir; bu da protein kinaz (aynı zamanda PKB olarak da bilinen) aktivasyonu sonrasında eNOS'in fosforilasyonuna ve aktivasyonuna neden olarak endotelden NO salınımını kolaylaştırır (107). Üçüncü olarak, bradikinin ve oksijen gibi plazmadaki maddeler, oksijenlenmiş kanın KK'a girişi üzerine endotelde NO üretimini tetikleyebilir. Nitrerjik sinirlerdeki nNOS'dan oluşan NO düz kas gevşemesinin çoğunlukla başlangıcından sorumlu iken, eNOS'dan oluşan NO'in ereksiyonun devamlılığını sağladığı konusunda fikir birliği vardır.

ACh, norepinefrin gibi klasik nörotransmitterlerden farklı olarak NO'in hücre membranında spesifik bir reseptörü yoktur. NO sitoplazmadaki soluble guanilat siklaz (sGC) enzimi için hücre membranını geçememektedir. NO'in cGMP'ye bağlanması, proteinde konformasyonel değişikliklere neden olmakta ve aktivitesini arttırmaktadır (108). Aktive olmuş sGC GTP'nin cGMP'ye dönüşümünü katalizlemektedir. Ökaryotik hücrelerde cGMP sinyalleri 3 farklı yol aracılığıyla olur; iyon kanalları, fosfodiesterazlar ve protein kinazlar bu etkileşimler aracılığı ile intrasellüler cGMP konsantrasyonundaki artış kontraktile yanıtta azalmayı indükleyen intrasellüler olay kaskatını başlatmaktadır. Bunlar hiperpolarizasyon, voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının kapanması, intrasellüler organeller ile kalsiyumun sekestrasyonu, intrasellüler kalsiyumdaki artışın korunması ve kontraktile organların desensitizasyonunu içermektedir.

Nitrerjik sinir stimülasyonu veya ekzojen NO verilmesi penil KK'da intrasellüler cGMP konsantrasyonlarında artışa neden olur (Şekil 6) (109,110). sGC'nin selektif inhibitörlerinin penil düz kasta nitrerjik relaksasyon cevabını inhibe ettiği gösterilmiştir (111-113). Bütün bu bulgular penil düz kastaki nitrerjik nörotransmisyonun sGC stimülasyonu ve cGMP konsantrasyonlarında artış yoluyla olduğunu göstermektedir.



Şekil 6: NO-cGMP yolağı aracılı korpus kavernozum düz kas gevşemesi

1.2.2 Eretil disfonksiyon etiolojisi

ED, bir erkeğin en az 6 ay süre ile seksüel ilişki için yeterli penis ereksiyonunu sağlama ve/veya sürdürmede yetersizlik olarak tanımlanmıştır. ED prevalansına ilişkin en kapsamlı veriler ABD’de yapılan çalışmalara dayanmaktadır. NIH’in 1993’deki verisine göre ABD’de ED prevalansı 10-20 milyon erkeği kapsamaktadır. Genel popülasyondaki insidans %10 olarak ele alınırsa, dünyada 650 milyon erkeğin ED hastası olduğu tahmin edilmektedir. Dünyanın çeşitli ülkelerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, ED prevalansına ilişkin tahminler ileri sürülmüştür. Yaşlanma ile ED riski artmaktadır. Fizyolojik fonksiyondaki ilerleyici azalma, artmış kronik hastalık prevalansı, psikolojik durumlar yaşlanmada ED riskini arttıran sorumlu faktörlerdir.

ED, yaşam kalitesi ve genel sağlığı etkileyebilir ve sıklıkla multifaktöriyel bir etiyojije sahiptir. Organik ve/veya psikojenik kökenli olabilir. 1960’lı yıllarda olguların çoğu psikojenik kökenli olduğu düşünülmekteyken günümüzde ise organik ve/veya psikolojik sorunların karmaşık bir etkileşimi sonucunda oluştuğu kabul

edilmektedir. Genç erkeklerde psikojenik nedenler fazla iken, yaşlılarda organik nedenler daha ön plandadır. Geniş bir sistemik hastalık spektrumu ED'a neden olmaktadır. ED nedenleri arasında; hormonal nedenler, psikolojik nedenler, nörolojik nedenler, iatrojenik nedenler, vasküler nedenler sayılabilir.

Kardiyovasküler hastalıklar ile ED birlikteliği son dönemde yapılan çalışmalarla net olarak ortaya konmuştur. Hipertansiyon, serebrovasküler olaylar, miyokart enfarktüsü, ateroskleroz ve periferik vasküler hastalıklar gibi kardiyovasküler risk faktörlerini içeren hastalıkların ereksiyon hemodinamiğini bozarak ED'a neden oldukları bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar, 50 yaş üstü erkeklerde arteriyojenik ED varlığında kalp ve periferik damar hastalıklarının araştırılması gerektiğini vurgulamışlardır .

1.2.3 Erektile disfonksiyon patogenezi

KK'daki düz kas elemanlarının ve arterlerin gevşemesine bağlı olarak gelişen hemodinamik durumun herhangi bir yerindeki bozukluk ED ile sonuçlanır ve etiyoloji sıklıkla multifaktoriyeldir. Pek çok hastalıklar; nörojenik, vasküler ve hormonal sistemi etkileyerek, KK düz kaslarında mikroskobik yapısal değişikliklere neden olarak ya da kişinin psikolojik durumunu bozarak ED'a yol açar. ED etiyolojisinde genellikle organik ve psikojenik faktörler birbiri içine girmiştir. Ancak, penisin özelleşmiş bir vasküler yatak olduğu göz önüne alındığında; ED etiyolojisinde vasküler nedenler sıklıkla yer almaktadır. Vasküler ED'u olan hastaların büyük bir çoğunluğunda bozulmuş penil perfüzyon yaygın aterosklerotik hastalığın bir komponentidir. Aterosklerozisin yanı sıra arteriyel yetmezliğe yol açan en sık risk faktörleri; hipertansiyon, hiperlipidemi, sigara, diabetes mellitus sayılabilir. Aterosklerozisde damarlarda endotel hasarı, hücrel migrasyon ve damar düz kas hücre proliferasyonu şeklinde morfolojik değişiklikler meydana gelir. Artan yaş aterosklerozis için güçlü bir risk faktörüdür ve NO salınımindaki değişikliklerle ilişkilidir. Yapılan çalışmalar, ED insidansı ve koroner arter hastalığının başlama yaşı arasında bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Hiperlipidemi, kavernoöz düz kaslarda ve endotelde disfonksiyona yol açmaktadır. Tavşan modellerinde ateroskleroz ve hiperkolesteroleminin azalmış NOS aktivitesi, artmış kontraktile tromboksan A₂ ve prostaglandin üretimi ile birlikte olduğu ve elektrik stimülasyonuna

yanıt olarak, düz kas gevşemesinde bozukluk olduğu gösterilmiştir. Hiperkolesterolemideki bu bozulmuş NO bağımlı düz kas gevşemesi ayrıca DYL'in kontraktıl etkilerine, serbest oksijen radikallerinin salınımına ve NOS inhibitörlerinin artışına bağlanmaktadır. Yapılan ultrastrüktürel çalışmalar, kolesterol ağırlıklı beslenmiş tavşanlarda KK'da erken dönemde aterosklerotik değişikliklerin başladığını göstermektedir. Bu değişiklikler ED'un primer sebebi olmakla birlikte, aterosklerotik lezyonların ilerlemesine ve daha kompleks hale gelmesine de neden olmaktadır.

1.3 RESVERATROL

1.3.1 Resveratrol Hakkında Genel Bilgiler

Bundan 4500 yıl önce Hintliler "Ayurveda" isimli eski bir tıp kitabında kırmızı üzüm suyunu "darakchasava" olarak tanımlayıp kardiyotonik olarak kullanmışlardır (114). 1940 yılında resveratrol greyfurdun ilaç bileşigi olarak tanımlanmış ve Polygonum cuspidatum (Japonya'da Ko-jo-kon olarak bilinen) köklerinden ekstrakte edilmiş ve hiperlipidemik hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (115). Resveratrolün en zengin kaynağı Japonya ve Çin'de yetiştirilen Polygonum cuspidatum (Ko-jo-kon) bitkisinin kökleridir (116).

1970'li yıllarda ise gözlemsel çalışmalar sonucunda orta düzeyde alkol tüketen kadın ve erkeklerin KVH'lara bağılı ölüm risklerinin içmeyenlerden daha az olduğu ileri sürülmüştür (117). Yapılan epidemiyolojik çalışmalar ise Güney Fransa bölgesinde yağlı diyet ve sigara tüketiminin yüksek olmasına karşın şarap tüketiminin fazla olması nedeni ile kardiyak hastalıkların az görülmesine dikkat çekerek bu tabloyu "Fransız Paradoksu" olarak isimlendirmişlerdir (118-120). Bu konu ile ilgili yapılmış olan çalışmalar bu paradoksun etkeni olarak resveratrolu göstermektedir (8,120,121).

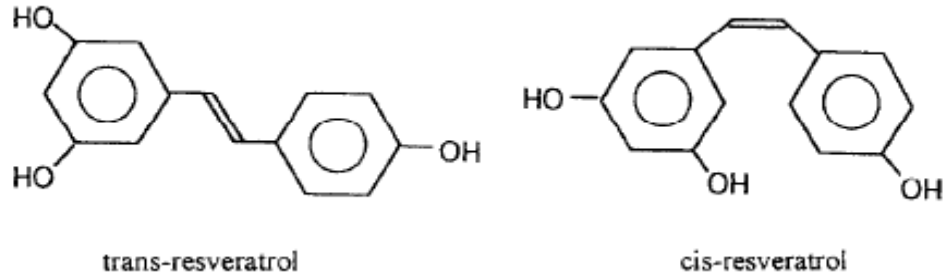
Üzüm kabuklarında yaklaşık olarak 50–100 µg/g resveratrol bulunmaktadır. Üzümün etli kısmından çok kabuk kısmında bulunur ve kırmızı üzüm ile karşılaştırıldığında diğer üzümlerde çok az miktarda bulunur. Kırmızı şarabın kalp üzerine olan koruyucu etkisinde ise içerdiği 0.2–7 mg/L resveratrolun sorumlu olduğu düşünülmektedir. Üzümlerin dışında resveratrol dut, yaban mersini, keklik üzümü, böğürtlen, çay üzümü, yer fıstığı gibi birçok besin maddesinde de bulunmaktadır. Amerika'da 15 mg, 50 mg, 200 mg'lık kapsülleri ve 10 mg'lık tabletleri mevcuttur.

1.3.2 Resveratrolun Kimyasal Yapısı

Resveratrol (3,4',5-Trihydroxystilbene), bitkilerin büyüme ve gelişme aşamalarının herhangi bir döneminde stres olarak tanımlanan bazı etkiler ile karşılaştıklarında, dayanıklılık mekanizmasının oluşturulması amacıyla üretilen ve genel olarak fitoaleksinin olarak adlandırılan, ikincil bitki metabolitidir. Susuzluk, ultraviyole maruziyeti, fungal enfeksiyonlar, ozon maruziyeti gibi çevresel strese yanıt olarak sentezlenmektedir. Bu nedenle meyvelerdeki resveratrol üretimi savunma mekanizmasının bir parçası olarak da kabul edilebilir.

Resveratrol cis ve trans izomeri halinde bulunur fakat cis-izomeri üzüm ekstrelerinde gösterilememiştir. Koruyucu etkisinden de trans formunun sorumlu olduğu gösterilmiştir.

Işıktan korunduğu sürece aylar boyunca bozulmadan kalabilmektedir.



Şekil 7: Resveratrolün kimyasal yapısı

1.3.3 Resveratrolun Etkileri

1.3.3.1 Antioksidan Etkisi

İskemi reperfüzyona uğratılan kalp, böbrek, beyin gibi dokularda NO miktarını artırarak oksidatif stres oluşumunu azalttığı gösterilmiştir. Eşleşmemiş bir elektronu olmasından dolayı NO in vivo olarak potent bir antioksidan olarak görev görebilmektedir. NO'nun O₂'e olan affinitesi SOD'un affinitesinden daha fazladır. NO, SOD ile O₂ için yarışarak SOD'u diğer süpürücü görevleri için boşa çıkarabilir.

Resveratrolun birçok hücrede tümör nekroz faktör tarafından oluşturulan reaktif oksijenleri ve lipit peroksidasyonunun inhibe ettiği gözlenmiştir (122). Resveratrol aynı zamanda post iskemik perfüze kalpte de peroksil ve hidroksil radikallerini de

yakalayarak lipit peroksidasyonunun olası belirteci olan malonaldehit oluşumunu azaltır (123,124). Resveratrol hücre içi antioksidan miktarını arttırabilir. Benzer olarak, insan lenfositlerinde resveratrol glutatyon peroksidaz, glutatyon-S transferaz ve glutatyon redüktaz gibi birçok antioksidan enzimde de artışa neden olmaktadır (125).

1.3.3.2 Vasküler Düz kas ve Endotel üzerine Etkileri

Üzüm, üzüm kabuğu, şarap ekstrelerindeki NO'ya bağlı kardiyoprotektif etki ilk olarak fenilefrin ile kasılmış izole aortalarda gevşeme oluşturmaları fakat endoteli alınmış olan aortlarda herhangi bir etki göstermemeleri ile fark edilmiştir (126). Bu etkilerinin NO'in kompetitif inhibitörleri olan NG-monomethyl-L-arginine veya NG - nitro-L-arginine ile inhibe edilebilmeleri, etkilerini NO ve cGMP yolağı ile gösterdiklerini doğrulamaktadır. Pulmoner arter endotel hücre kültürlerinde resveratrol tedavisi sonrası eNOS ekspresyonunu arttırarak direkt olarak NO üzerine etki oluşturdıkları gösterilmiştir (127).

İnsan umbilikal kordon endotel hücre kültürlerinde "patch clamp" tekniği kullanılarak yapılmış olan bir çalışma ile de resveratrolün kalsiyum ile aktive olan potasyum kanallarında potasyum akımlarını aktive ettiği gösterilmiştir. Potasyum kanal blokerleri olan iberitoksin, paksillin'in resveratrolün bu etkisini geri çevirdiği gösterilmiştir. Resveratrol zar potansiyelini de etkileyerek hiperpolarizasyona da neden olabilmektedir. Resveratrolün konsantrasyona bağımlı olarak potasyum kanallarının açık kalma sürelerini arttırdığı gösterilmiştir. Yapılmış olan başka bir çalışmada ise farklı hormonal sikluslarda olan kobaylarda resveratrolün uterus ve MA üzerine olan etkileri karşılaştırılmış ve östrojen ve progesteronun plazma düzeyleri ile resveratrolün etkisi arasında herhangi bir anlamlı ilişki kurulamamıştır (128). Başka bir çalışmada sıçan aorta halkalarında resveratrolün fenilefrin ve KCl ile olan kasımlara olan yanıtına bakılmış; endotel sağlam halkalarda gevşeme yanıtı alınırken endoteli çıkarılmış olan halkalarda bu yanıtın olmadığı gözlenmiştir. Endotelyumu sağlam olan halkalarda resveratrolün oluşturduğu bu etki NOS inhibitörü olan L-NOARG ile geri çevrilmiştir (129).

Kırmızı şarap ekstraktları 6 hafta boyunca spontan hipertansif sıçanların diyetlerine eklendiğinde, sistolik kan basıncının normal diyetle beslenen sıçanlara

göre belirgin olarak daha düşük olduğu saptanmıştır. Ayrıca aynı çalışmada kırmızı şaraptaki fenolik bileşiklerin spontan hipertansif sıçanların aorta halkalarında doz-bağımlı gevşeme cevapları oluşturduğu da gösterilmiştir (121).

Ateroskleroz patogeneğinde vasküler düz kas proliferasyonu da önemli bir rol oynamaktadır. Yapılmış olan çalışmalarda sıçan torasik aort düz kas hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği görülmüştür. Bu etkiyi Cyclidin A geni mRNA miktarını azaltarak gösterdiği bildirilmiştir (130).

1.3.3.3 İskemi Reperfüzyon Hasarından Koruyucu Etkisi

Modern tıpta kanser tedavisinde antiproliferatif ajan olarak kullanılmaktadır (131,132). Resveratrolün kalp üzerine olan koruyucu etkisinde antioksidan özellikleri ve NO üzerine olan etkilerinin sorumlu olduğu düşünülmektedir. İskemi ve reperfüzyon sonunda lipid peroksidasyonuna bağlı olarak peroksi radikaller oluşmaktadır. Kardiyoprotektif etkisi deneysel olarak ilk izole kalpleri iskemi reperfüzyon hasarlanmasından koruması ile gösterilmiştir (123). Sonradan resveratrolün böbrek, kalp ve beyin gibi birçok organda iskemi reperfüzyondan koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar ile koruyucu etkisi olarak antioksidan, antiinflamatuvar, NOS ekspresyonunu artırıcı özelliği ve anjiogenezisi artırıcı etkisi bildirilmektedir (133). Resveratrolün kalp üzerine olan koruyucu etkisini ise önkoşullandırma ile sağladığı gösterilmiştir. Önkoşullandırma ise kalbi koruma üzerine şimdilik bilinen en iyi metottur (134,135).

1.3.3.4 Antiagregan Etkisi

Resveratrol trombin ve ADP ile aktive edilmiş olan trombosit adezyonunu anlamlı olarak inhibe etmektedir. Etki mekanizması olarak ise agregasyon aşamasında artmış olan hücre içi kalsiyum miktarını azaltması gösterilmiştir. Buna benzer bir çalışmada ise kollajen, trombin ve ADP ile uyarılmış olan insan trombosit agregasyonunun resveratrol ile inhibe edildiği ve oluşan Tromboksan A₂ miktarının anlamlı olarak azaldığı bildirilmiştir (136).

1.3.3.5 Antienflamatuvar Etkisi

Enflamasyondan proteazlar, kompleman sistemleri, NO, bradikininler, prostaglandinler sorumlu tutulmuştur. Günümüzde ise antienflamatuvar etki için COX inhibisyonu ve NO üretim ve salınımındaki azalış üzerinde yoğunlaşmaktadır.

Çalışmalar resveratrolün enflamasyonda rol alan VCAM-1, ICAM-1 E-Selektin gibi adezyon moleküllerinin etkilerini azalttığını göstermiştir. Bu azalmanın L-NAME gibi NO inhibitörleri ile geriye dönmesi antienflamatuvar etkilerinde NO bağımlı bir mekanizmanın rol aldığını düşündürmektedir. Resveratrolün antienflamatuvar etkileri aynı zamanda aşırı miktarda doku faktörü (TF) ve sitokin ekspresyon eden vasküler hücrelerde de kanıtlanmıştır (137). IL-1, TNF ve lipopolisakkarat (LPS) gibi çeşitli agonistler ile stimule edilmiş olan endotel hücrelerinin TF ekspresyonunu azalttığı da gösterilmiştir.

Sonradan yapılmış olan birçok çalışma bu molekülün insan üzerine faydalı etkilerini göstermiştir (138). Resveratrol plazma lipoproteinlerini etkilemektedir in vitro olarak DYL oksidasyonunu önlediği (140,141), trombosit agregasyonunu (142) ve polimorfonükleer hücre aktivasyonunu ve ROS üretimini engellediği gösterilmiştir. İnsan endotel hücrelerinde vazorelaksasyonu arttırarak, adezyon moleküllerinin ekspresyonunu azaltarak trombojenik potansiyeli azalttıkları gözlenmiştir (143-145). Bu etki mekanizmaları açısından bakıldığında resveratrol ve eNOS benzer amaçlar için etki ediyorlarmış gibi görünmektedirler.

2 GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1 Etik Kurul Onayı, Tavşanların Beslenmesi, Gruplandırılması

Randomize kontrollü deneysel bir araştırma olan çalışmamız Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığınca değerlendirilerek 05/14/90 no'lu kararı ile onaylanmıştır. Deneyler Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

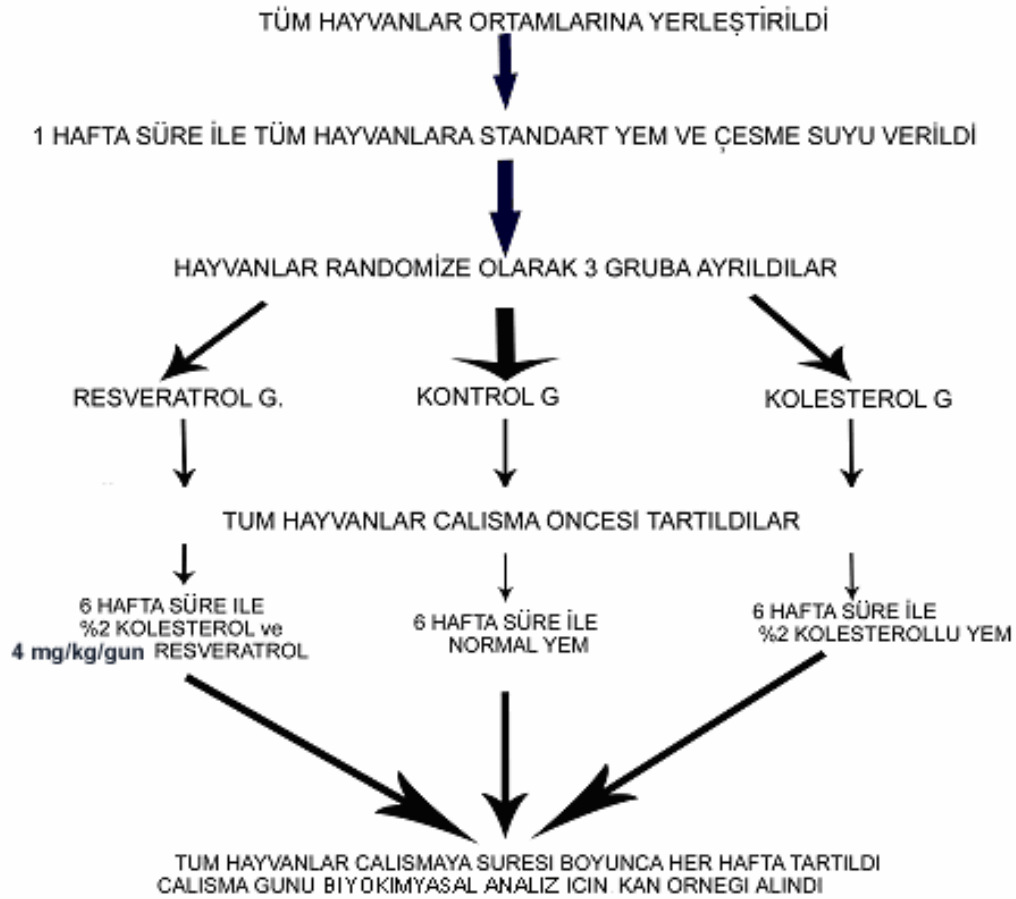
Deneysel hiperkolesterolemi modeli için 2600–3200 g (2896±32,9 g) ağırlığında Beyaz Yeni Zelanda tavşanları Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim

Dalından temin edilmiştir. Tavşanlar uygulanacak protokole göre 3 gruba ayrılmışlardır

1. Kontrol grubu: Tavşanlar sınırsız standart yem ve içme suyu ile beslenmişlerdir (n=8).

2. Kolesterol grubu: %2 a/a kolesterol içeren sınırsız yem ve içme suyu ile altı hafta süre ile beslenmişlerdir (n=6).

3. Kolesterol + Resveratrol grubu: %2 a/a kolesterol içeren sınırsız yem + 4 mg/kg/gün, oral resveratrol ile altı hafta süre ile beslenmişlerdir (n=6).



Sekil 8: Deney hayvanlara çalışmaya alınana kadar uygulanan protokol

Çalışmaya alınan tüm tavşanlar standardizasyon amacı ile 60x60x30 cm boyutlarındaki özel tavşan kafeslerine alındıktan sonra bir hafta süre ile standart yem (TARİŞ YEMTA) ve içme suyu ile beslenerek ortama uyumları sağlanmıştır.

Tavşanların beslenme süresi altı hafta olarak belirlenmiştir. Tüm deney süresi boyunca oda ısıları 24°C'de sabit tutulmuştur (Şekil 8).



Resim 1: Tavşanların barınma koşulları.

Kolesterol yemleri ve resveratrol içeren içme suları günlük olarak hazırlanmıştır. %2'lik a/a 1 kg kolesterol yemi: 900 g yem+80g Zeytinyağı+20g Kolesterol içeriğinden oluşmaktadır. Resveratrollü içme suları ise; özel olarak ışıktan muhafaza edecek şekilde hazırlanmış olan tavşan suluklarında günlük olarak verilmiştir. Ertesi gün çalışmaya alınacak olan hayvanların 12 saat öncesinden yemleri alınmış, sıvı alımlarına ise izin verilmiştir.

2.2 Plazma kolesterol düzeylerinin ölçümü

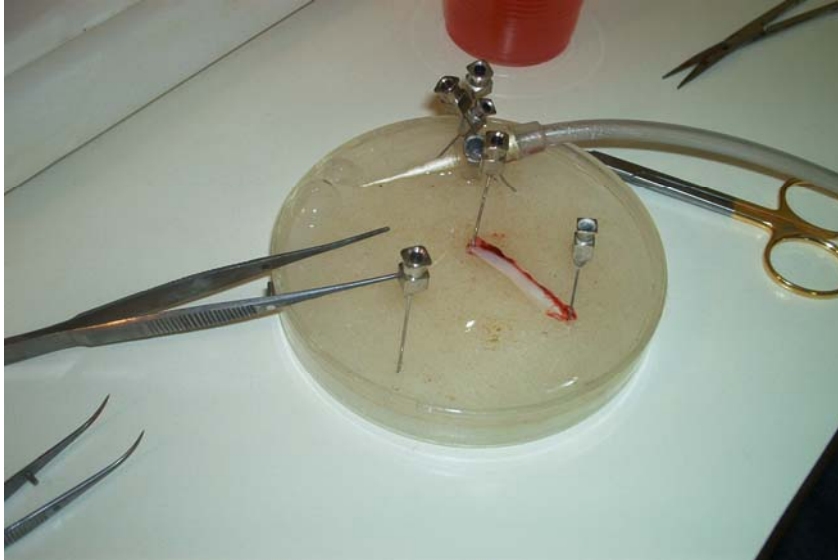
Deney sürelerinin sonunda tavşanların plazma total kolesterol düzeyleri marjinal kulak venlerinden alınan 2cc'lik kan örneklerinden ölçülmüştür. Plazmadan total kolesterol düzeyleri bakılmıştır. Total kolesterol düzeyleri homojen enzimatik

kalorimetrik yönteme dayalı kitler ile Roche COBAS Integra 800 cihazı kullanılarak llmtr.

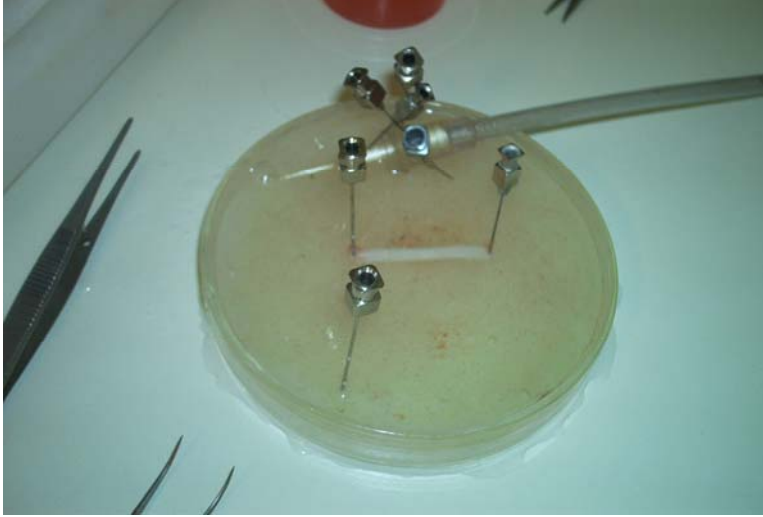
2.3 İzole Organ banyosu deneyleri ve protokol

Her 3 gruba ait tavşanlar kulak veninden 60mg/kg sodyum tiopental verilerek öldürülmüştür. Tavanların TA, MA, RA ve KK dokuları sırası ile ve derhal alındıktan sonra soğuk (+4°C) Krebs solüsyonu içerisine alınmışlardır (Resim 2). Tüm dokular endotel hasarına sebep olmayacak şekilde dikkatlice temizlenerek çevreleyen bağ ve yağ dokularından temizlenmilerdir (Resim 3). Damar dokuları 3–4 mm'lik halkalar halinde kesilmiş ve birbirine komşu olan damar segmentleri çalışmaya alınmıştır (Resim 4). Paslanmaz elikten hazırlanmış olan üçgen şeklinde klipsler ile bir ucu izometrik transdsıra diğer ucu ise sabit metale bağlanan tüm damar segmentleri %95 O₂ ve %5 CO₂ ile gazlandırılan ve sıcaklığı 37°C'de sabit tutulan Krebs solüsyonu içeren izole organ banyolarına alınmışlardır.

KK dokuları ise 3x3x4 mm³ lk boyutlarda şeritler halinde hazırlandıktan sonra her iki ucundan ipek iplikler ile bağlanarak aynı şekilde %95 O₂ ve %5 CO₂ ile gazlandırılan ve sıcaklığı 37°C'de sabit tutulan modifiye Krebs solüsyonu içeren izole organ banyolarına alınmışlardır.



Resim 2: Eksize edilmiş torakal aorta damar segmenti



Resim 3: Çevre dokulardan temizlenmiş olan torakal aorta damar segmenti

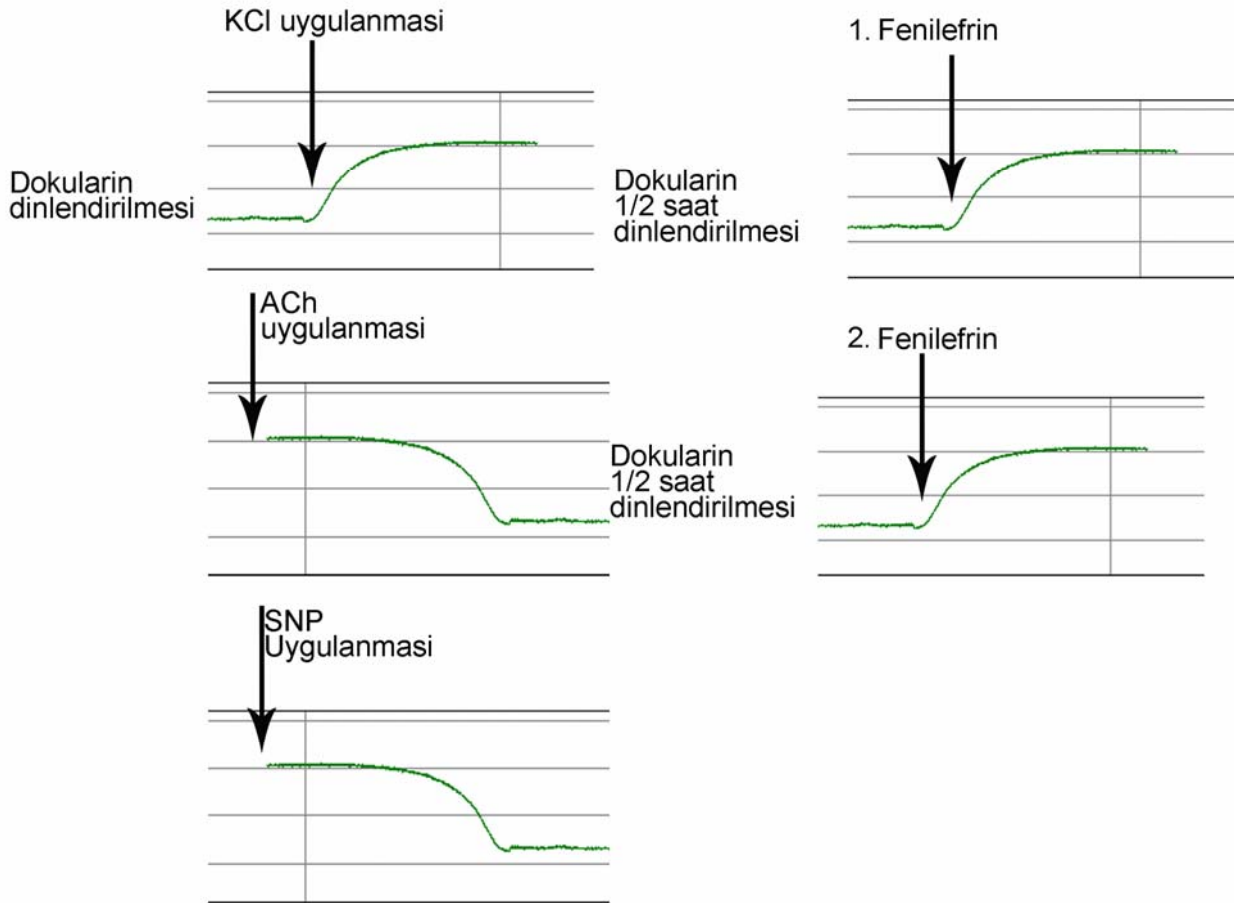


Resim 4: Halka şeklinde hazırlanmış damar preparatları

Damar segmentleri izole organ cihazına asılmalarını takiben 1 g lık gerilimden sonra 1 saat süre ile dinlendirilerek bazal tonusa gelmeleri sağlanmıştır. Dinlenme süresi boyunca her 15 dakikada bir Krebs solüsyonu değiştirilerek bekletilmişlerdir. Oluşan cevaplar izometrik transdüser yardımı ile bilgisayara aktarılmış ve kaydedilmişlerdir.

KK şeritleri ise 1.5 g'lık gerilimin ardından stabilizasyon için 1.5 saat süre ile her 15 dakikada bir Krebs solüsyonu değiştirilerek bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda cevaplar izometrik transdüser yardımı ile bilgisayara kaydedilmiştir.

Dinlenme süresi sonunda ilk olarak damar dokuları 80mM KCl ile KK dokusu ise 120 mM KCl ile kasılmışlardır. Kasılma sabit bir platoya ulaştıktan sonra Krebs çözeltisi ile yıkanarak yarım saat süre ile dinlendirilmiştir. RA, MA, TA ve KK endotel bağımlı gevşeme yanıtları (EBGY)'nın değerlendirilmesi için; hazırlanan preparatlar bu yarım saatlik dinlenme süresi sonucunda submaksimal dozda (3×10^{-6} M) fenilefrin ile kasılmıştır. Kasılma sabit bir platoya ulaştığında (yaklaşık olarak 10 dakika) kümülatif olarak ACh (10^{-8} M- 10^{-5} M) artan dozlarda uygulanarak endotel bağımlı yanıtlar değerlendirilmiştir. Bunun sonrasındaki yarım saat dinlenme süresi sonrasında dokular tekrar aynı doz fenilefrin ile kasılarak 2. fenilefrin kasılması yanıtları değerlendirilmiştir. Kasılma sabit bir platoya ulaştığında (yaklaşık olarak 10 dakika) kümülatif olarak sodyum SNP 10^{-9} M- 10^{-6} M olarak yarım log aralıklar ile artan dozlarda uygulanarak düz kas yanıtları değerlendirilmiştir (Şekil 9)



Şekil 9: Organ banyosu deney protokolünün şematik çizimi.

2.4 Kullanılan aygıtlar

2.4.1 İzole organ banyosu

İzole organ banyosu sistemi; veri toplanmasına uygun yüksek performanslı veri toplama ünitesi içermektedir. 4 Kanal İzole Organ Banyosu Seti, 4 adet force displacement transducer ve sirkülatörlü su banyosunu içeren bir sistemden oluşmaktadır. Doz Cevap eğrilerini; sinyallerin ayrı amplifikatörler gerektirmeden tümünü algılayabilen 4 kanal kayıt sistemi bulunmaktadır.

2.4.1.1 Force Displacement Transdüser

Organ ve dokulara uygulanan ilaç etkilerinin kasılma ve gevşeme yanıtlarını mg düzeyinde yansıtabilir, hassasiyete mili volt değerine dönüştürebilen bir cihazdır.

2.4.1.2 Su Banyosu Ve Sirkülator

İzole organ banyosu düzeneklerinde su sirkülasyonu yaparak, banyolardaki ısının ayarlanan değerde $\pm 0,1$ °C hassasiyette sabit kalmasını sağlayabilmektedirler.



Resim 5 : Organ banyosu sistemi

2.4.1.3 İzole Organ Banyosu Seti

Organ banyosunun bu kısmı doku tutucu ve elektrot tutucularını üzerinde bulunduran kombine bir sistemdir. 10ml çift cidarlı cam organ banyosunun içerisinde ısıtıcı su banyosu ve sirkulatör aracılığı ile ısıtılan su geçerek organ banyosunun ısınısını sabit tutmaktadır. Transdüser tutucusu, organ askısı ve tutucusu ise asılan dokuda oluşabilen gerilimleri ölçebilmektedir.

2.4.2 pH metre:

Inolab pH 720 markalı pH ölçme aleti kullanılmıştır.

2.5 Kullanılan kimyasallar

Kolesterol: Sigma Aldrich, (St. Louis, MO, A.B.D) (Ürün Numarası: C8503);

Asetilkolin HCl: Sigma Aldrich, (St. Louis, MO, A.B.D) (Ürün Numarası: A6625); distile suda çözülmüştür.

Fenilefrin HCl: Sigma Aldrich, (St. Louis, MO, A.B.D) (Ürün Numarası: P6126); distile suda çözülmüştür.

Resveratrol: Sigma Aldrich, (St. Louis, MO, A.B.D) (Ürün Numarası: R5010); %99 Etanolde çözülmüştür.

Etanol: Sigma Aldrich, (St. Louis, MO, A.B.D)

Damar krebs solüsyonu(mM): NaCl 118.3, KCl 4.69, KH₂PO₄ 1.18, CaCl₂ 1.25, MgSO₄ 1.17, NaHCO₃ 25.0, glikoz 11.1.; pH:7.4

Korpus kavernosum Krebs solüsyonu(mM): NaCl 136.9, KCl 2.7, KH₂PO₄ 0.5, CaCl₂ 1.8, MgSO₄ 0.6, NaHCO₃ 11.9, glikoz 11.5. ; pH:7.4

Damar 80 mM KCl solüsyonu(mM): NaCl 42.99, KCl 80.0, KH₂PO₄ 0.5, CaCl₂ 1.8, MgSO₄ 0.6, NaHCO₃ 11.9, glikoz 11.5. ; pH:7.4

Korpus kavernosum 120 mM KCl solüsyonu(mM): NaCl 19.6, KCl 120.0, KH₂PO₄ 0.5, CaCl₂ 1.8, MgSO₄ 0.6, NaHCO₃ 11.9, glikoz 11.5. ; pH:7.4

Krebs solüsyonu ve KCl solüsyonları için gerekli olan tüm kimyasallar Sigma Aldrich (St. Louis, MO, A.B.D) firmasından elde edilmiştir.

2.6 Verilerin analizi

Çalışmada fenilefrin kasılmaları yüzde cevap olarak değerlendirilmiştir. Yüzde kasılma değerinin belirlenmesi için damar dokularında 80mM KCl uygulanması ve KK için ise 120 mM KCl uygulanması ile elde edilen maksimum kasılma cevabı %100 olarak alınmış ve fenilefrin uygulaması sonrası elde edilen cevap bu değere göre oranlanarak hesaplanmıştır.

Gevşetici ajanların cevaplarında ise ACh için 1. fenilefrin uygulanması ile oluşan kasılma yanıtı %100 olarak alınmış ve ACh uygulanması ile bu kasılma sonrasında oluşan gevşeme yanıtları, bu değere göre hesaplanarak elde edilmiştir. SNP yanıtlarının değerlendirilmesi için ise oluşturulan 2. fenilefrin kasılma yanıtları %100 olarak alınarak kümülatif SNP uygulaması ile oluşan gevşeme yanıtları sonuca göre değerlendirilmiştir.

Çalışmadaki tüm değerler, ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Deneylerde kontrol grubunda 8 tavşan, hiperkolesterolemik grupta ve resveratrol grubunda 6 tavşan kullanılmıştır. Tablo ve grafiklerde verilen n sayıları kullanılan doku sayılarını göstermektedir. Deney grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık için grup ortalamaları ve standart hataları alınarak “student t-test” aracılığı ile gruplar arası farkın önemlilik kontrolü yapılmıştır. p değerinin 0.05 in altında olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3 BULGULAR

3.1 Plazma parametrelerinin sonuçları

Tavşanlara altı hafta süre ile %2 kolesterol ile beslenmenin ve resveratrol tedavisinin (4mg/kg/gün, oral); plazma total kolesterol düzeyleri üzerine olan etkilerini değerlendirmek amacı ile altıncı hafta sonunda kan örnekleri alınmıştır.

Hem kolesterol grubunda hem de resveratrol grubunda; 6 haftalık kolesterol diyeti sonucu; plazma total kolesterol düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde artış görülmüştür ($p < 0.001$). Kolesterol grubu ve resveratrol grubunun 6. hafta değerleri arasında ise total kolesterol düzeylerinde anlamlı farklılık oluşmamıştır ($p > 0.05$) (Tablo 1).

	Plazma Total Kolesterol Düzeyi
Kontrol G. (n=8)	26.3±2.02 mg/dl
Hiperkolesterolemik G. (n=6)	1825.0±197.60** mg/dl
Resveratrol G. (n=6)	1661.0±147.60** mg/dl

Tablo 1: Plazma kolesterol düzeyleri. ** p<0.001 kontrol grubuna göre.

3.2 Hayvan kilolarının karşılaştırılması

Deney hayvanlarının vücut ağırlıkları her hafta düzenli olarak ölçülmüştür. Hayvanların deney süresince izlenen vücut ağırlıkları her 3 grupta da; çalışma başlangıcı ve altı hafta sonunda değerlendirilmiştir. Gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Tablo 2).

	Vücut Ağırlığı(g)	
	Başlangıç	6. hafta sonunda
Kontrol G. (n=8)	2851 ± 58.0 g	2894 ± 68.5 g
Hiperkolesterolemik G. (n=6)	2894 ± 67.0 g	2691 ± 142.2 g
Resveratrol G. (n=6)	2943 ± 47.3 g	2986 ± 49.2 g

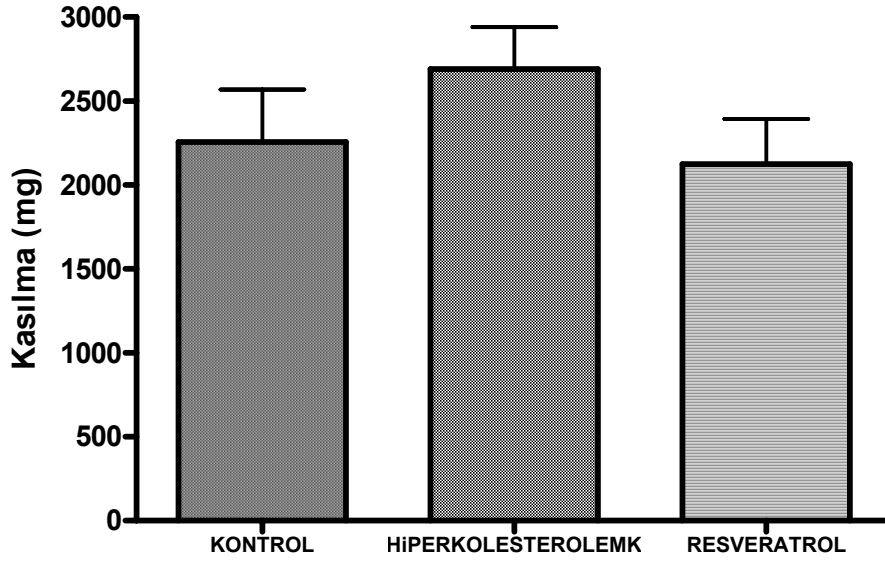
Tablo 2: Deney hayvanlarının deney başlangıcı ve sonundaki ağırlıkları

3.3 İzole organ banyosu sonuçları

3.3.1 Renal arter yanıtları

3.3.1.1 KCl ile kasılma yanıtları

80 mM KCl uygulanması RA'ler üzerinde her üç grupta da kasılma yanıtları oluşturmuştur. Kontrol (n=11), hiperkolesterolemik (n=13), ve resveratrol grupları(n=10) değerlendirildiğinde KCl'e bağlı kasılma yanıtları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (sırası ile 2256±311.8 mg, 2691±248.5 mg, 2125 ±269.2 mg; p>0.05).



Şekil 10: 80 mM KCl uygulaması sonucu renal arterde oluşan kasılma yanıtları

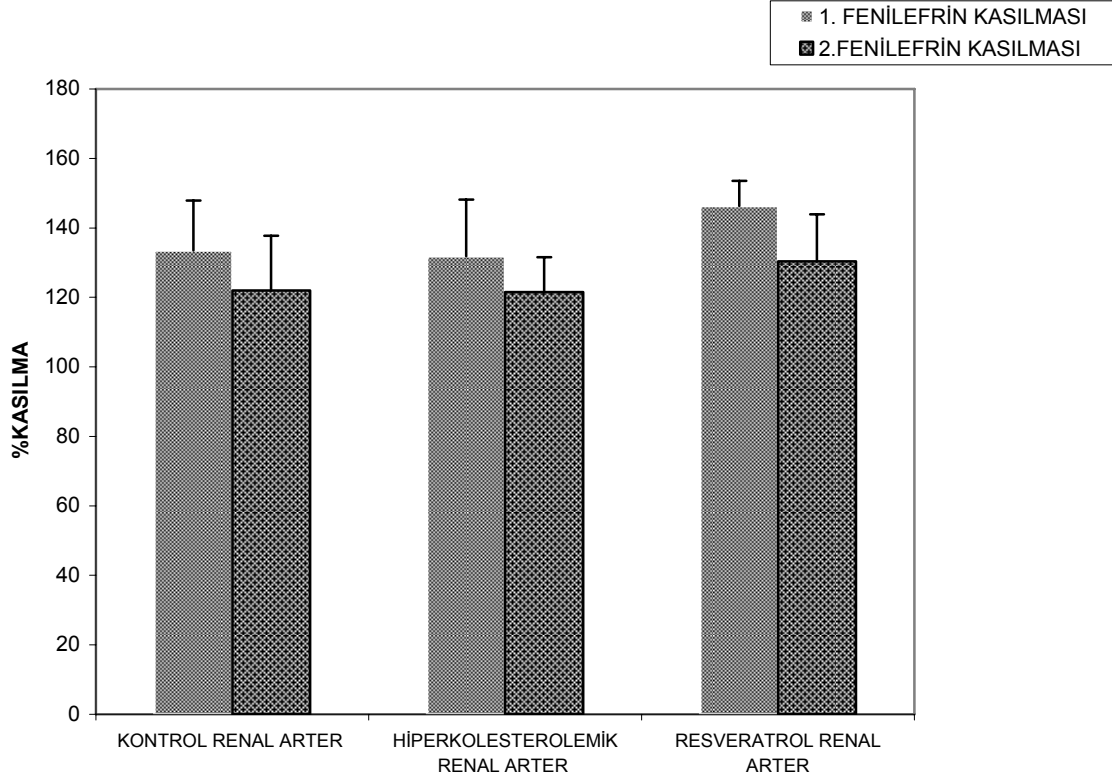
3.3.1.2 Fenilefrin ile kasılma yanıtları

Deney protokolü sırasında ACh gevşeme yanıtlarının değerlendirilmesi için 3×10^{-6} M fenilefrin uygulanmış ve oluşan kasılma yanıtı aynı dokunun KCl'e olan yanıtına göre yüzde olarak değerlendirilmiştir. RA üzerinde her üç grupta da oluşan bu kasılmalar gruplar arası karşılaştırıldığında herhangi bir anlamlılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Ortalama % kasılma değerleri; kontrol, hiperkolesterolemik ve resveratrol grubunda sırası ile 133.5 ± 14.43 , 131.8 ± 16.40 ve 146.3 ± 7.19 olarak bulunmuştur (Şekil 7).

Dokuların 1. fenilefrin kasılması sonrası ACh uygulanmasını takiben yarım saat dinlendirilmesinin ardından tekrar 3×10^{-6} M fenilefrin uygulanmış ve oluşan kasılma yanıtı tekrar aynı dokunun KCl'e olan yanıtına göre yüzde olarak değerlendirilmiştir. RA üzerinde, her üç grupta da oluşan 2. fenilefrin kasılmaları karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Ortalama % kasılma değerleri kontrol, hiperkolesterolemik ve resveratrol grubunda sırası ile 122.0 ± 15.75 , 121.5 ± 10.09 ve 130.4 ± 13.51 olarak bulunmuştur (Şekil 8).

Oluşturulan bu 1. ve 2. fenilefrin kasılmaları, aralarında herhangi anlamlı bir farklılık olup olmasına göre değerlendirilmiştir. 1. ve 2. fenilefrin kasılma değerleri

RA'in KCl'e olan kasılma yanıtına göre yüzde olarak alınarak değerlendirilmiş ve her grup kendi içerisinde karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda her üç grup içerisinde ve gruplar arasında anlamlı istatistiksel farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).



Şekil 11: Renal arterde birinci ve ikinci fenilefrin uygulamasının karşılaştırmalı sonuçları

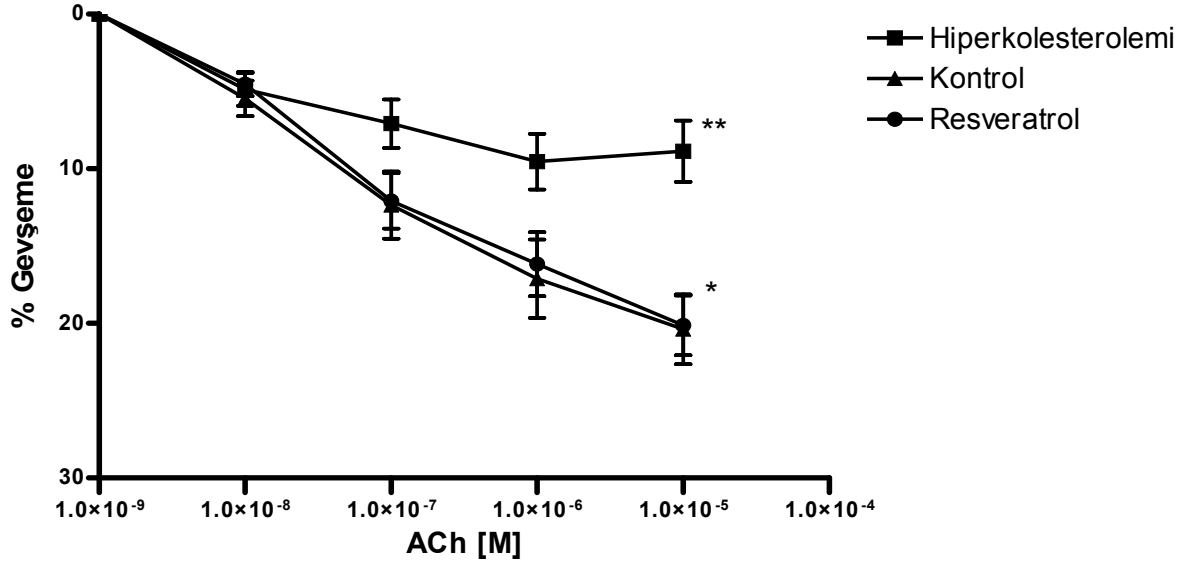
3.3.1.3 Asetilkolin ile gevşeme yanıtları

Her üç grupta da RA damar halkalarında 3×10^{-6} M fenilefrin kasılması sonrası ACh kümülatif olarak uygulanmıştır (10^{-8} - 10^{-5} M). Alınan gevşeme yanıtları fenilefrin kasılması üzerinden yüzde olarak değerlendirilmiştir.

Kontrol grubu, hiperkolesterolemik grup ve resveratrol grubunda ACh'e bağlı gözlenen maksimum gevşeme yanıtları sırası ile % 20.15 ± 1.93 ; 8.88 ± 1.97 ; 20.40 ± 2.24 olarak elde edilmiştir. Resveratrol grubu ve kontrol grubunun fenilefrin kasılması sonrası ACh ile oluşturulan gevşeme yanıtlarında herhangi anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$). Hiperkolesterolemik diyet ile beslenen tavşan RA'lerinde,

kontrol ve resveratrol grubuna göre anlamlı olarak gevşeme yanıtlarında azalma oluşmuştur ($p < 0.001$).

PD₂ değerleri karşılaştırıldığında ise kontrol grubu, hiperkolesterolemik grup ve resveratrol grup sonuçları sırası ile 6.90 ± 0.22 , 6.45 ± 0.37 , 6.65 ± 0.48 bulunmuş ve gruplar arasında herhangi bir anlamlı fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$) (Tablo 3).



Şekil 12: Renal arterde kümülatif dozlarda ACh uygulanması sonucu oluşan gevşeme yanıtları

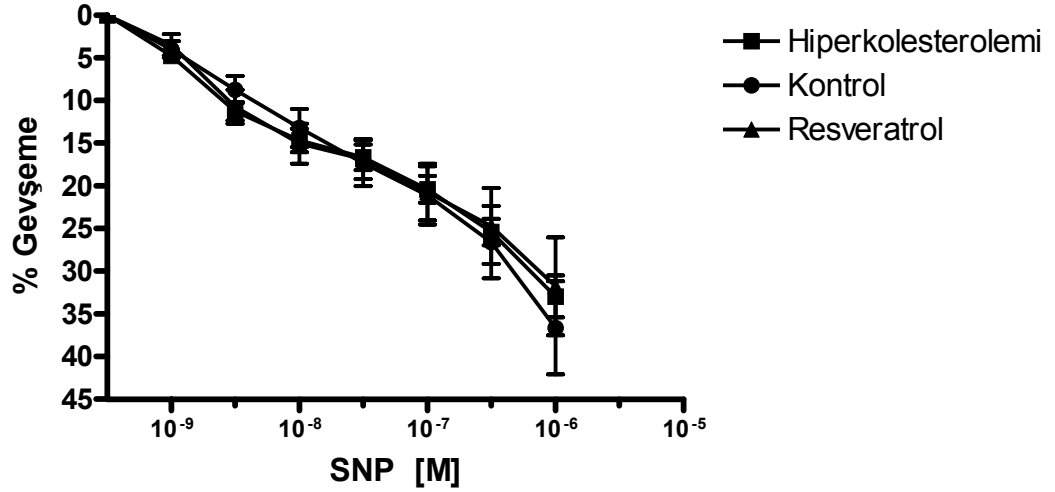
* $p > 0.05$ resveratrol ve hiperkolesterolemik grup arasında

** $p < 0.001$ kontrol ile hiperkolesterolemik ve resveratrol grupları arası

3.3.1.4 SNP gevşeme yanıtları

Deneyin bu gruba ait olan son basamağında RA halkaları 3×10^{-6} M fenilefrin ile kasılma oluşturulduktan sonra kasılmanın plato fazına ulaşması beklenmiş ve kümülatif olarak artan dozlarda SNP uygulanarak (10^{-9} - 10^{-6} M) gevşeme yanıtları değerlendirilmiştir. Her üç grup arasında SNP uygulanması sonucu oluşan maksimum gevşeme yanıtlarında anlamlı farklılık oluşmamıştır. Alınan yanıtlar sırası ile kontrol grubu, hiperkolesterolemik grup ve resveratrol grubu için sırası ile % 36.64 ± 5.44 , 32.96 ± 2.46 ; 31.77 ± 5.72 bulunmuştur. PD₂ değerlerinin karşılaştırılması sonucu kontrol grubu, hiperkolesterolemik grup ve resveratrol grubu sonuçları sırası

ile 7.08 ± 0.22 ; 7.11 ± 0.22 ve 7.72 ± 0.24 olarak bulunmuş ve gruplar arasında herhangi bir anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$) (Tablo 4).

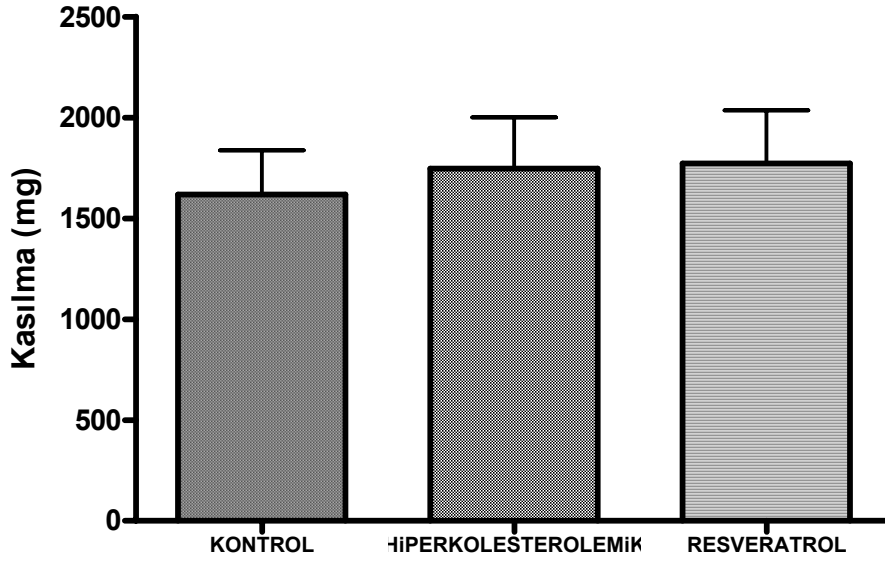


Şekil 13: Renal arterde kümülatif dozlarda SNP uygulanması sonucu oluşan gevşeme yanıtları

3.3.2 Mezenterik arter yanıtları

3.3.2.1 KCl ile kasılma yanıtları

80mM KCl'ün organ banyosuna uygulanması MA'de her üç grupta da kasılma yanıtları oluşmuştur. KCl'e bağlı bu maksimum kasılma yanıtları mg üzerinden kontrol (n=10), hiperkolesterolemik (n=6) ve resveratrol grupları (n=9) arasında değerlendirildiğinde kasılmalar arası anlamlı farklılık olmadığı bulunmuştur (sırası ile 1618 ± 219.9 mg, 1747 ± 254.0 mg, 1773 ± 263.6 mg; $p > 0.05$).



Şekil 14: Mezenterik arterde 80 mM KCl uygulaması sonucu oluşan kasılma yanıtları

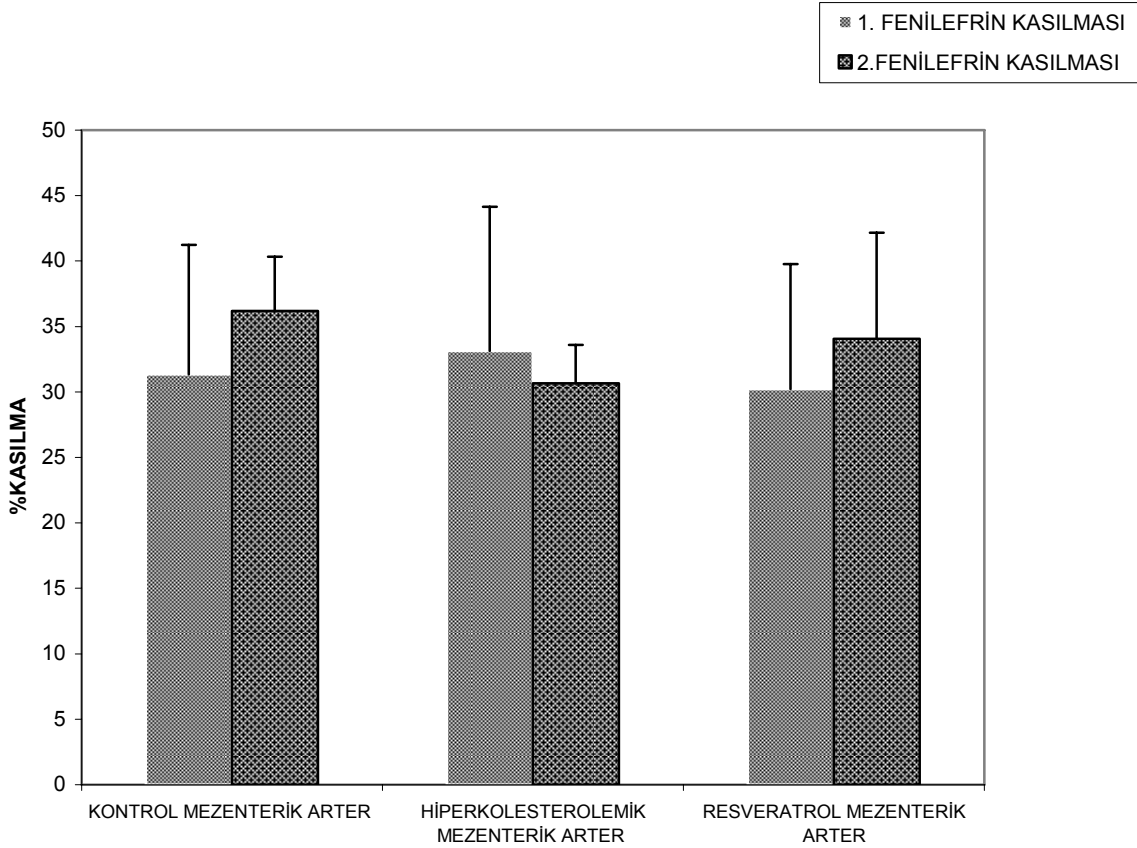
3.3.2.2 Fenilefrin ile kasılma yanıtları

Deney protokolü sırasında ACh gevşeme yanıtlarının değerlendirilmesi için 3×10^{-6} M fenilefrin uygulanmış ve oluşan kasılma yanıtı aynı dokunun KCl'e olan yanıtına göre yüzde olarak değerlendirilmiştir. MA üzerinde her üç grupta da oluşan bu kasılmalar gruplar arası karşılaştırıldığında herhangi bir anlamlılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Ortalama % kasılma değerleri kontrol, hiperkolesterolemik ve resveratrol grubunda sırası ile 116.0 ± 9.90 , 109.8 ± 11.04 ve 105.9 ± 9.56 olarak bulunmuştur.

Dokuların 1. fenilefrin kasılması sonrası kümülatif olarak ACh uygulanmasını takiben yarım saat dinlendirilmiş ve ardından tekrar 3×10^{-6} M fenilefrin uygulanmıştır. Oluşan kasılma yanıtı aynı dokunun KCl'e olan yanıtına göre yüzde olarak değerlendirilmiştir. MA üzerinde her üç grupta da oluşan 2. fenilefrin kasılmaları karşılaştırıldığında herhangi bir anlamlılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Ortalama % kasılma değerleri kontrol, hiperkolesterolemik ve resveratrol grubunda sırası ile 116.6 ± 11.45 , 120.7 ± 10.22 ve 111.0 ± 10.77 olarak bulunmuştur.

Oluşturulan bu 1. ve 2. fenilefrin kasılmaları, dokunun deney başındaki ve sonundaki kasılma değerlerinin karşılaştırılması ve oluşan bu kasılma yanıtları arasında herhangi bir anlamlı farklılık olup olmasına göre değerlendirilmiştir. 1. ve

2. fenilefrin kasılma değerleri MA'in KCl'e olan kasılma yanıtına göre yüzde olarak değerlendirilmiş ve her grup kendi içerisinde karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda her üç grup içerisinde ve gruplar arasında anlamlı istatistiksel farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).



Şekil 15: Mezenterik arterde birinci ve ikinci fenilefrin uygulamasının karşılaştırmalı sonuçları

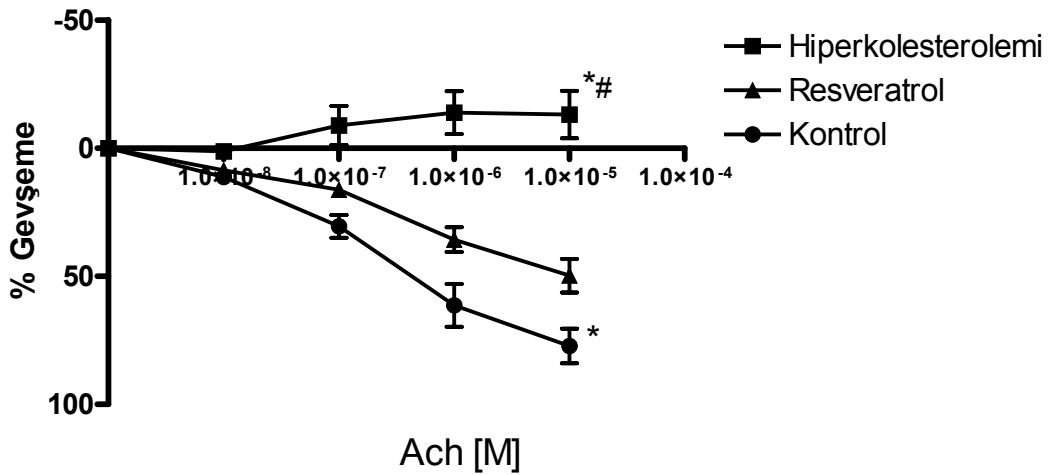
3.3.2.3 Asetilkolin ile gevşeme yanıtları

Her üç grupta da MA damar halkalarında 3×10^{-6} M fenilefrin kasılması sonrası ACh kümülatif olarak uygulanmıştır (10^{-9} - 10^{-5} M). Alınan gevşeme yanıtları fenilefrin kasılması üzerinden yüzde olarak değerlendirilmiştir.

Kontrol grubu, hiperkolesterolemik grup ve resveratrol grubunda gözlenen maksimum gevşeme yanıtları sırası ile % 77.3 ± 6.75 ; -13.0 ± 9.24 ; 49.9 ± 6.58 olarak elde edilmiştir. Her üç grup arasında da ACh'e bağlı endotel gevşeme yanıtlarında

anlamlı farklılık gözlenmiştir ($P<0.001$). Hiperkolesterolemik grupta ACh uygulanması sonucu kasılma yanıtı gözlenirken resveratrol ve kontrol grubunda ise; en fazla kontrol grubunda olmak üzere; gevşeme yanıtı gözlenmiştir.

PD₂ değerleri karşılaştırıldığında ise kontrol grubu, hiperkolesterolemik grup ve resveratrol grup sonuçları sırası ile 6.38 ± 0.18 , 7.49 ± 0.97 , 6.23 ± 0.20 bulunmuş ve gruplar arasında herhangi bir anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 3).



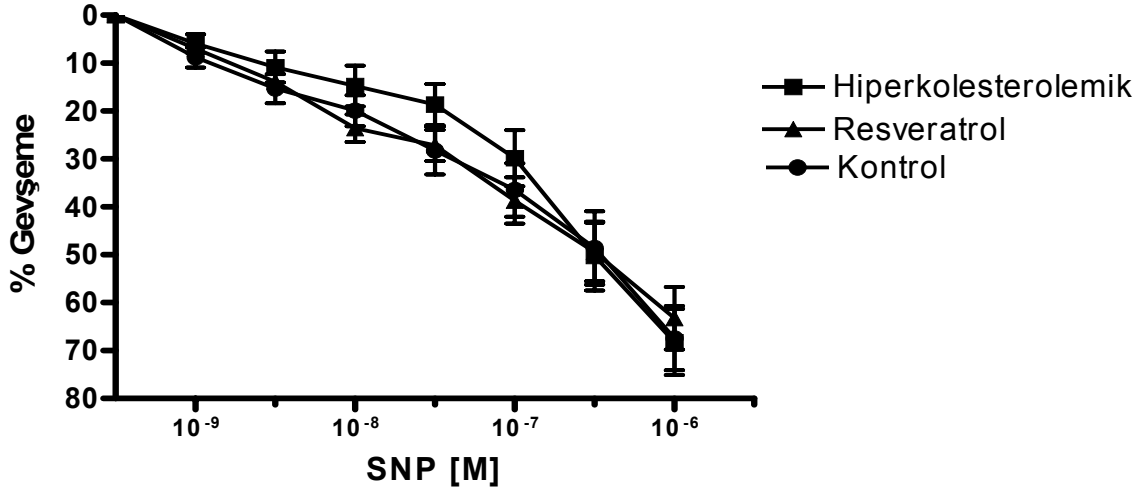
Şekil 16: Kontrol grubu, hiperkolesterolemik grup ve resveratrol grubunda gözlenen ACh'e bağlı mezenterik arter gevşeme yanıtları.
* $p<0.001$ kontrol ile resveratrol grupları arası, resveratrol ve hiperkolesterolemi grubu arası
$p<0.001$ kontrol ile hiperkolesterolemi grubu arası

3.3.2.4 SNP gevşeme yanıtları

MA halkaları 3×10^{-6} M fenilefrin ile kasılma oluşturulduktan sonra kasılmanın plato fazına ulaşması beklenmiş ve kümülatif olarak artan dozlarda SNP uygulanarak (10^{-9} - 10^{-6} M) gevşeme yanıtları değerlendirilmiştir. Her üç grup arasında SNP uygulanması sonucu oluşan maksimum gevşeme yanıtları arasında anlamlı farklılık oluşmamıştır. Alınan yanıtlar sırası ile kontrol grubu, hiperkolesterolemik grup ve resveratrol grup sonuçları sırası ile $\% 67.5\pm 6.70$; 68.5 ± 6.89 ; 63.3 ± 6.56 bulunmuştur.

PD₂ değerleri karşılaştırılması sonucu kontrol grubu, hiperkolesterolemik grup ve resveratrol grubu sonuçları sırası ile 6.46 ± 0.32 ; 6.63 ± 0.14 ve 7.09 ± 0.25 olarak

bulunmuştur. Gruplar arasında herhangi bir anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 4).

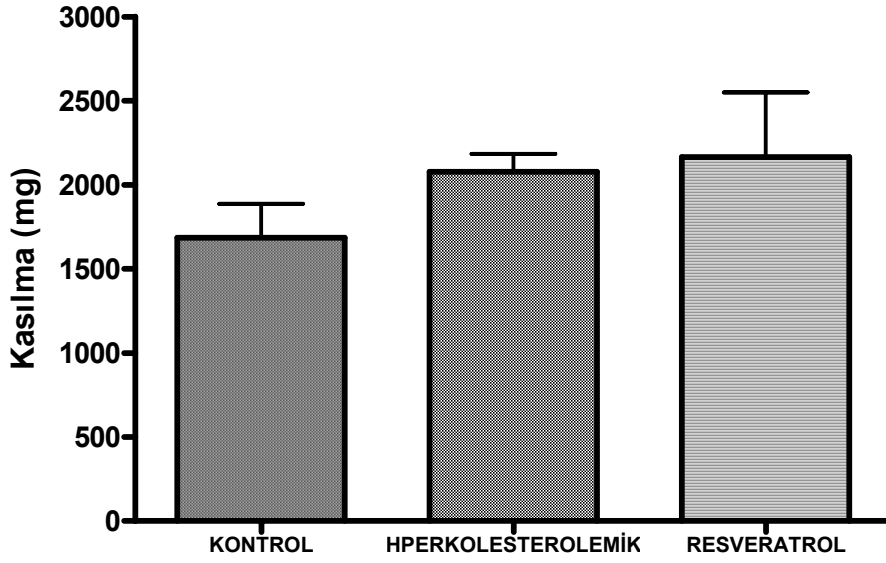


Şekil 17: Mezenterik arterde kümülatif dozlarda SNP uygulanması sonucu oluşan gevşeme yanıtları

3.3.3 Torakal aorta yanıtları

3.3.3.1 KCl ile kasılma yanıtları

80mM KCl'ün organ banyosuna uygulanması TA üzerinde her üç grupta da kasılma yanıtları oluşmuştur. Bu KCl'e bağlı maksimum kasılma yanıtlarının mg üzerinden kontrol (n=11), hiperkolesterolemik (n=9) ve resveratrol grupları (n=9) arasında değerlendirildiğinde kasılmalar arası anlamlı farklılık bulunmamıştır (sırası ile 1685±202.0 mg, 2078±105.2 mg, 2164±385.8 mg; $p>0.05$).



Şekil 18: Torakal Aorta'da 80 mM KCl uygulaması sonucu oluşan kasılma yanıtları

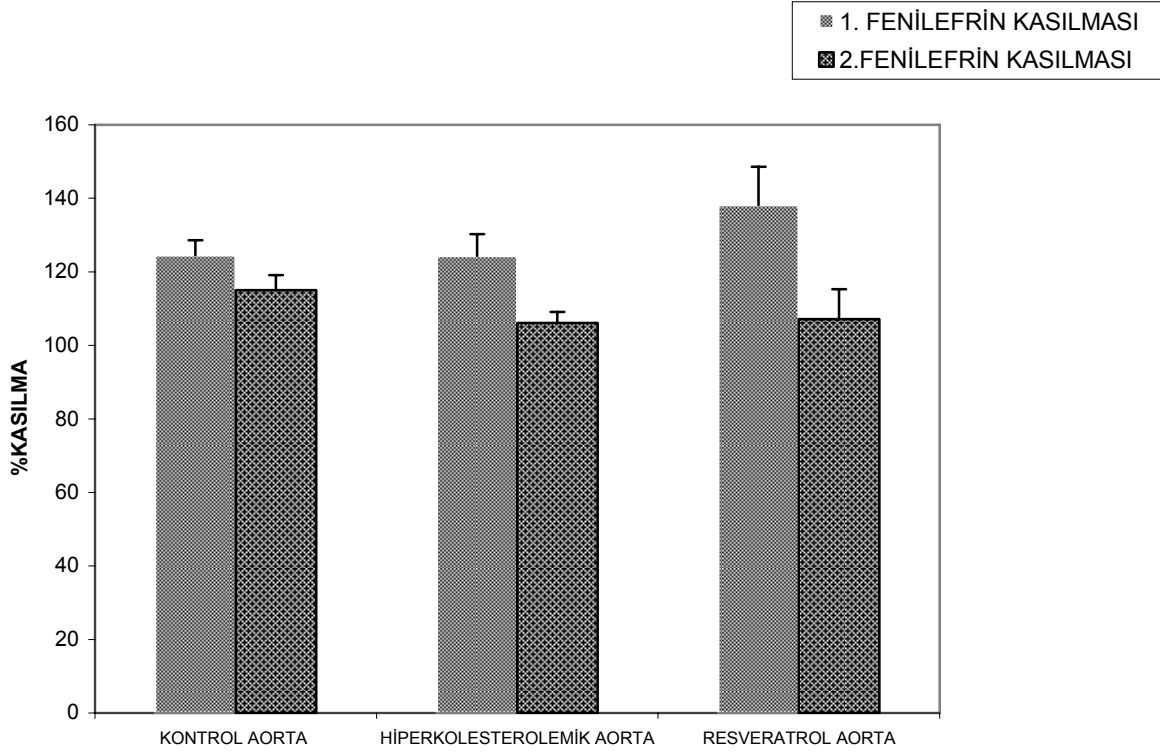
3.3.3.2 Fenilefrin ile kasılma yanıtları

Deney protokolü sırasında ACh gevşeme yanıtlarının değerlendirilmesi için 3×10^{-6} M fenilefrin uygulanmış ve oluşan kasılma yanıtı aynı dokunun KCl'e olan yanıtına göre yüzde olarak değerlendirilmiştir. TA üzerinde her üç grupta da oluşan bu kasılmalar gruplar arası karşılaştırıldığında herhangi bir anlamlılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Ortalama % kasılma değerleri kontrol, hiperkolesterolemik ve resveratrol grubunda sırası ile 124.5 ± 4.10 , 124.3 ± 5.95 ve 138.2 ± 10.35 olarak bulunmuştur.

Dokuların 1. fenilefrin kasılması sonrası ACh uygulanmasını takiben yarım saat dinlendirilmesinin ardından tekrar 3×10^{-6} M fenilefrin uygulanmış ve oluşan kasılma yanıtı aynı dokunun KCl'e olan yanıtına göre yüzde olarak değerlendirilmiştir. TA üzerinde her üç grupta da oluşan 2. fenilefrin kasılmaları karşılaştırıldığında herhangi bir anlamlılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$). 2. fenilefrin kasılmaları için ortalama % kasılma değerleri kontrol, hiperkolesterolemik ve resveratrol grubunda sırası ile 115.0 ± 4.13 , 106.1 ± 2.96 ve 107.2 ± 8.11 olarak bulunmuştur.

Oluşturulan bu 1. ve 2. fenilefrin kasılmaları, dokunun deney başındaki ve sonundaki kasılma değerlerinin karşılaştırılması ve oluşan bu kasılma yanıtları arasında herhangi bir anlamlı farklılık olup olmamasına göre değerlendirilmiştir. 1. ve 2. fenilefrin kasılma değerleri TA'nın KCl'e olan kasılma yanıtlarına göre yüzde olarak alınarak değerlendirilmiş ve her grup kendi içerisinde karşılaştırılmıştır. Bu

karşılaştırma sonucunda her üç grup içerisinde ve gruplar arasında anlamlı istatistiksel farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).



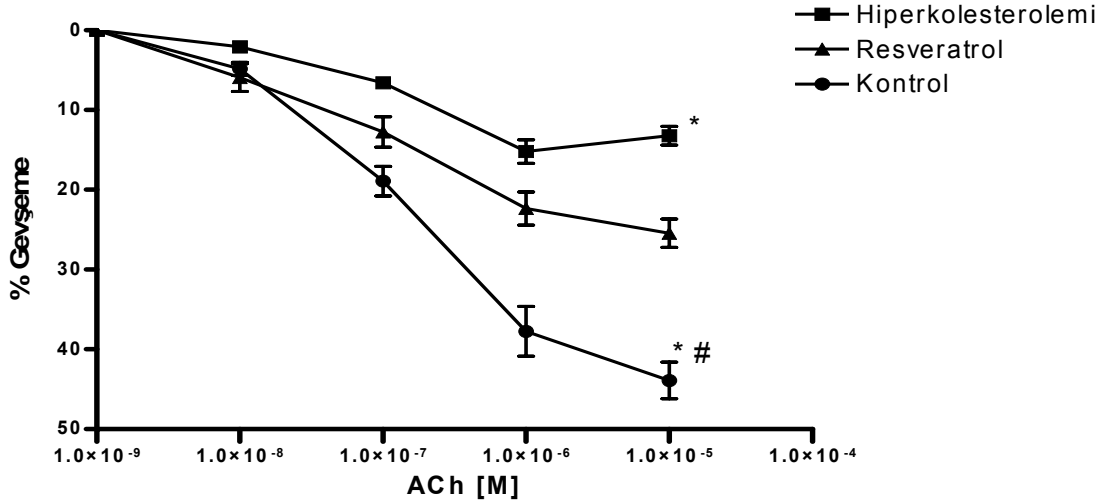
Şekil 19: Torakal aortada birinci ve ikinci fenilefrin uygulamasının karşılaştırmalı sonuçları

3.3.3.3 Asetilkolin ile gevşeme yanıtları

Her üç grupta da TA damar segmentlerinde 3×10^{-6} M fenilefrin kasılması sonrası ACh kümülatif olarak uygulanmıştır (10^{-9} - 10^{-5} M). Alınan gevşeme yanıtları fenilefrin kasılması üzerinden yüzde olarak değerlendirilmiştir.

Kontrol grubu, hiperkolesterolemik grup ve resveratrol grubunda gözlenen maksimum gevşeme yanıtları sırası ile % 43.9 ± 2.30 ; 13.3 ± 1.18 ; 25.5 ± 1.79 olarak elde edilmiştir. Kontrol grubu, hiperkolesterolemik grup ve resveratrol grubunda aralarında fenilefrin kasılması sonrası ACh gevşeme yanıtlarında her üç grup arasında da anlamlı farklılık gözlenmiştir ($P < 0.001$). Hiperkolesterolemik grupta ACh uygulanması sonucu en az, kontrol grubunda en fazla olmak üzere tüm dokularda gevşeme yanıtı gözlenmiştir.

Elde edilen PD₂ değerleri kontrol grubu için 6.74±0.09, hiperkolesterolemik grup için 6.91±0.10 ve resveratrol grubunda ise 6.78±0.15 olarak bulunmuştur. PD₂ değerleri karşılaştırıldığında ise üç grup arasında herhangi bir anlamlı fark gözlenmemiştir (P > 0.05) (Tablo 3).

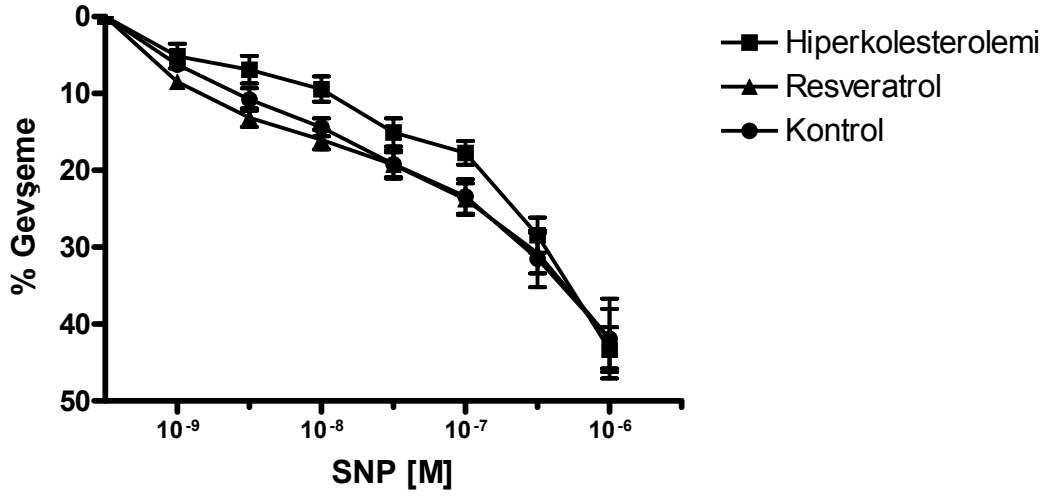


Şekil 20: Kontrol grubu, hiperkolesterolemik grup ve resveratrol grubunda gözlenen ACh'e bağlı torakal aorta gevşeme yanıtları.
* p<0.001 kontrol ile resveratrol grupları arası, resveratrol ve hiperkolesterolemi grubu arası
p<0.001 kontrol ile kolesterol grubu arası

3.3.3.4 SNP gevşeme yanıtları

Deneyin son basamağında TA halkaları 3x10⁻⁶ M fenilefrin ile kasılarak SNP ile gevşeme yanıtları değerlendirilmiştir. Her üç grup arasında SNP ile oluşan maksimum gevşeme yanıtları herhangi bir anlamlı farklılık oluşmamıştır (kontrol grubu: 41.91±5.18; hiperkolesterolemik grup: % 43.36±2.98; resveratrol grubu: 41.94±3.87)

PD₂ değerleri karşılaştırılması sonucu kontrol grubu, hiperkolesterolemik diyet ile beslenen grup ve hiperkolesterolemik diyet ve resveratrol ile beslenen gruplar arasında herhangi bir anlamlı farklılık gözlenmemiştir (Sırası ile 6.9±0.10; 6.5±0.04; 6.7±0.11; p>0.05) (Tablo 4).

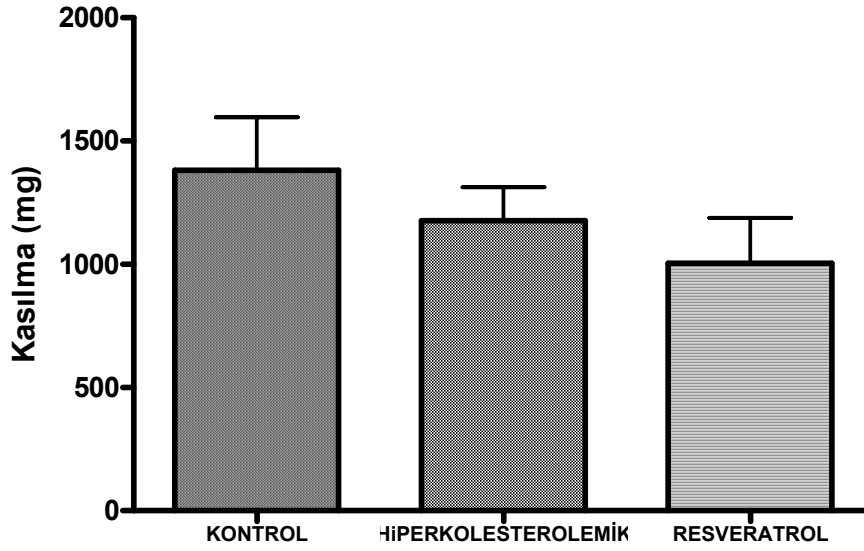


Şekil 21: Torakal Aortada kümülatif dozlarda SNP uygulanması sonucu oluşan gevşeme yanıtları

3.3.4 Kavernöz doku yanıtları

3.3.4.1 KCl ile kasılma yanıtları

120 mM KCl'ün organ banyosuna uygulanması KK dokusu üzerinde her üç grupta da kasılma yanıtları oluşmuştur. Bu KCl'e bağlı maksimum kasılma yanıtlarının mg üzerinden kontrol (n=8), hiperkolesterolemik (n=10) ve resveratrol grupları (n=12) arasında değerlendirildiğinde kasılmalar arası anlamlı farklılık olmadığı bulunmuştur (sırası ile 1381±214.4 mg, 1176±136.7 mg, 1004±183.9 mg; p>0.05).



Şekil 22: Korpus kavernozumda 80 mM KCl uygulaması sonucu oluşan kasılma yanıtları

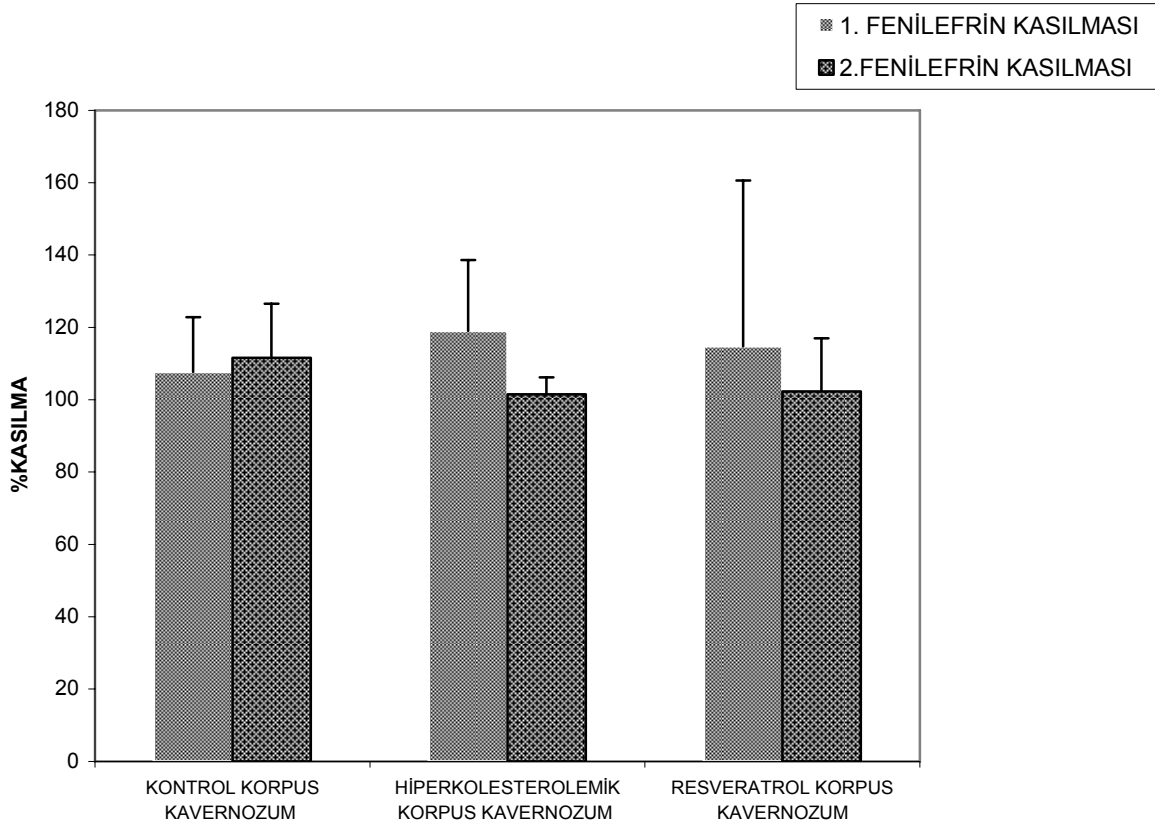
3.3.4.2 Fenilefrin ile kasılma yanıtları

Deney protokolü sırasında ACh gevşeme yanıtlarının değerlendirilmesi için 3×10^{-6} M fenilefrin uygulanmış ve oluşan kasılma yanıtı aynı dokunun KCl'e olan yanıtına göre yüzde olarak değerlendirilmiştir. KK dokusu üzerinde her üç grupta da oluşan bu kasılmalar gruplar arası karşılaştırıldığında herhangi bir anlamlılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Ortalama % kasılma değerleri kontrol, hiperkolesterolemik ve resveratrol grubunda sırası ile 107.7 ± 16.39 , 119.0 ± 16.83 ve 114.8 ± 45.81 olarak bulunmuştur.

Dokuların 1. fenilefrin kasılması sonrası ACh uygulanmasını takiben yarım saat dinlendirilmesinin ardından tekrar 3×10^{-6} M fenilefrin uygulanmış ve oluşan kasılma yanıtı aynı dokunun KCl'e olan yanıtına göre yüzde olarak değerlendirilmiştir. KK dokusu üzerinde her üç grupta da oluşan 2. fenilefrin kasılmaları karşılaştırıldığında herhangi bir anlamlılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Ortalama % kasılma değerleri kontrol, hiperkolesterolemik ve resveratrol grubunda sırası ile 111.6 ± 14.99 , 101.5 ± 4.65 ve 102.3 ± 14.67 olarak bulunmuştur.

Oluşturulan bu 1. ve 2. fenilefrin kasılmaları, dokunun deney başındaki ve sonundaki kasılma değerlerinin karşılaştırılması ve oluşan bu kasılma yanıtları

arasında herhangi bir anlamlı farklılık olup olmasına göre değerlendirilmiştir. 1. ve 2. fenilefrin kasılma değerleri KK dokusu üzerinde KCl'e olan kasılma yanıtına göre yüzde olarak alınarak değerlendirilmiş ve her grup kendi içerisinde karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda her üç grup içerisinde ve gruplar arasında anlamlı istatistiksel farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).



Şekil 23: Kavernoöz dokuda birinci ve ikinci fenilefrin uygulamasının karşılaştırmalı sonuçları

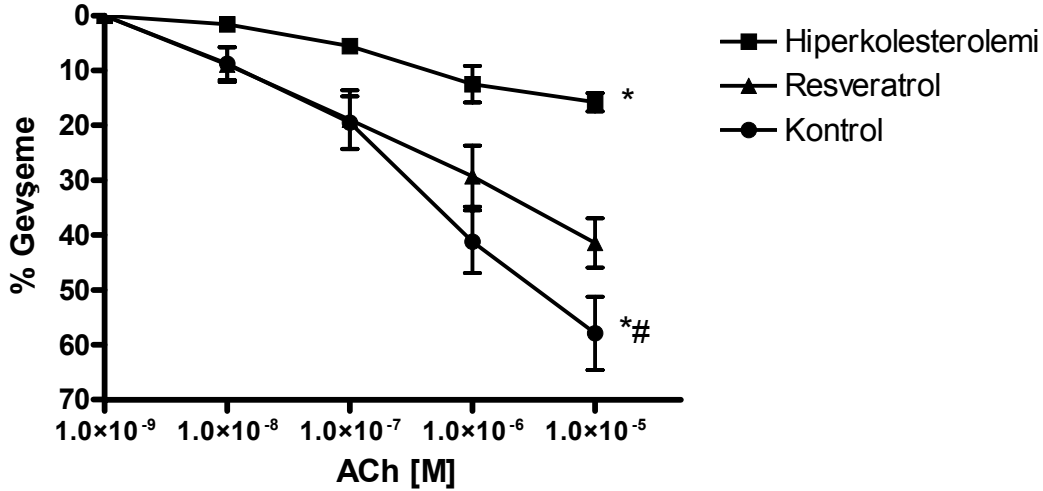
3.3.4.3 Asetilkolin ile gevşeme yanıtları

Her üç grupta da KK dokusu üzerinde 3×10^{-6} M fenilefrin kasılması sonrası ACh kümülatif olarak uygulanmıştır (10^{-9} - 10^{-5} M). Alınan gevşeme yanıtları fenilefrin kasılması üzerinden yüzde olarak değerlendirilmiştir.

Kontrol grubu, hiperkolesterolemik grup ve resveratrol grubunda gözlenen maksimum gevşeme yanıtları sırası ile 57.9 ± 6.69 ; 15.8 ± 1.65 ; 41.5 ± 4.47 olarak

elde edilmiştir. Her üç grup arasında da ACh'e bağlı maksimum endotel gevşeme yanıtlarında anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p < 0.05$).

PD₂ değerleri karşılaştırıldığında ise kontrol grubu, hiperkolesterolemik grup ve resveratrol grubu sonuçları sırası ile 6.38 ± 0.16 , 6.42 ± 0.19 ; 6.30 ± 0.48 bulunmuş ve gruplar arasında herhangi bir anlamlı fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$) (Tablo 3).

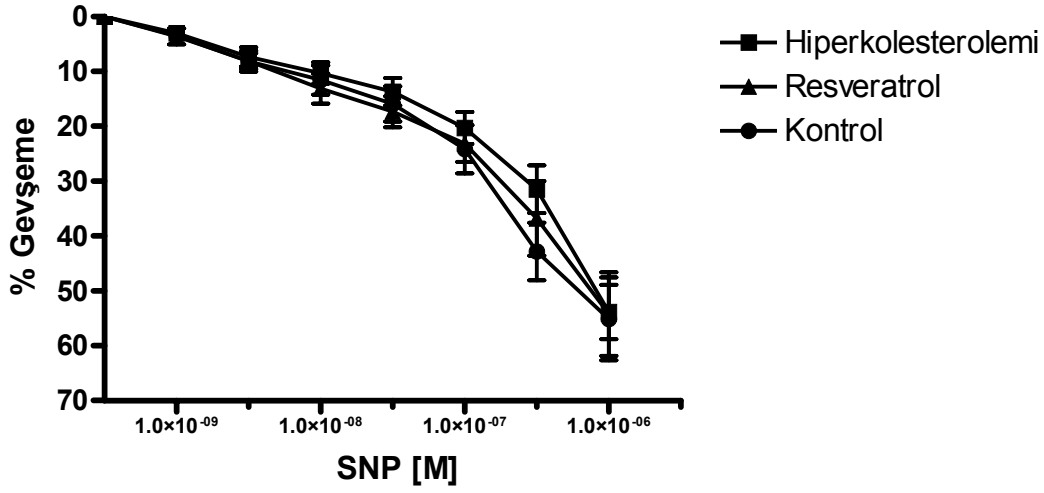


Şekil 24: Kontrol grubu, hiperkolesterolemik grup ve resveratrol grubunda gözlenen ACh'e bağlı korpus kavernozum gevşeme yanıtları.
* $p < 0.05$ kontrol ile resveratrol grupları arası, resveratrol ve hiperkolesterolemi grubu arası
$p < 0.001$ kontrol ile kolesterol grubu arası

3.3.4.4 SNP gevşeme yanıtları

KK stripleri 3×10^{-6} M fenilefrin ile kasılarak SNP ile gevşeme yanıtları değerlendirilmiştir. Her üç grup arasında SNP ile oluşan maksimum gevşeme yanıtları herhangi bir anlamlı farklılık oluşmamıştır (Sırası ile 55.13 ± 7.56 ; 53.89 ± 4.97 ve 54.25 ± 7.60).

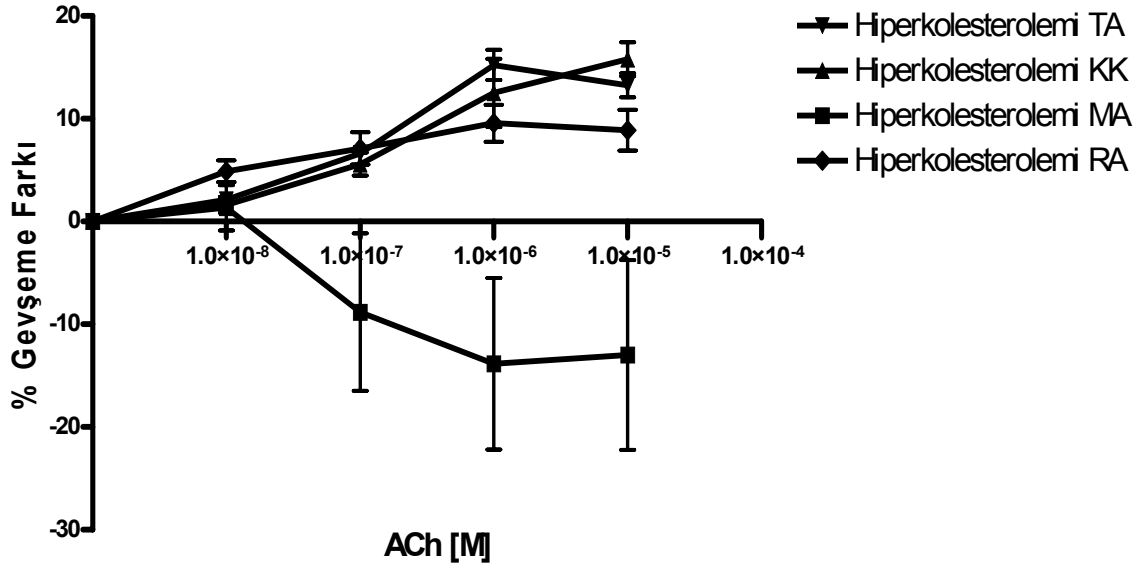
PD₂ değerleri karşılaştırılması sonucu kontrol grubu, hiperkolesterolemik grup ve resveratrol grubu sonuçları sırası ile 6.9 ± 0.10 ; 6.50 ± 0.04 ; 6.65 ± 0.11 olarak bulunmuştur. Gruplar arasında herhangi bir anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$) (Tablo 4).



Şekil 25: Korpus Kavernozumda kümülatif dozlarda SNP uygulanması sonucu oluşan gevşeme yanıtları

3.3.5 Hiperkolesterolemik dokulardaki ACh yanıtlarının karşılaştırılması olarak değerlendirilmesi

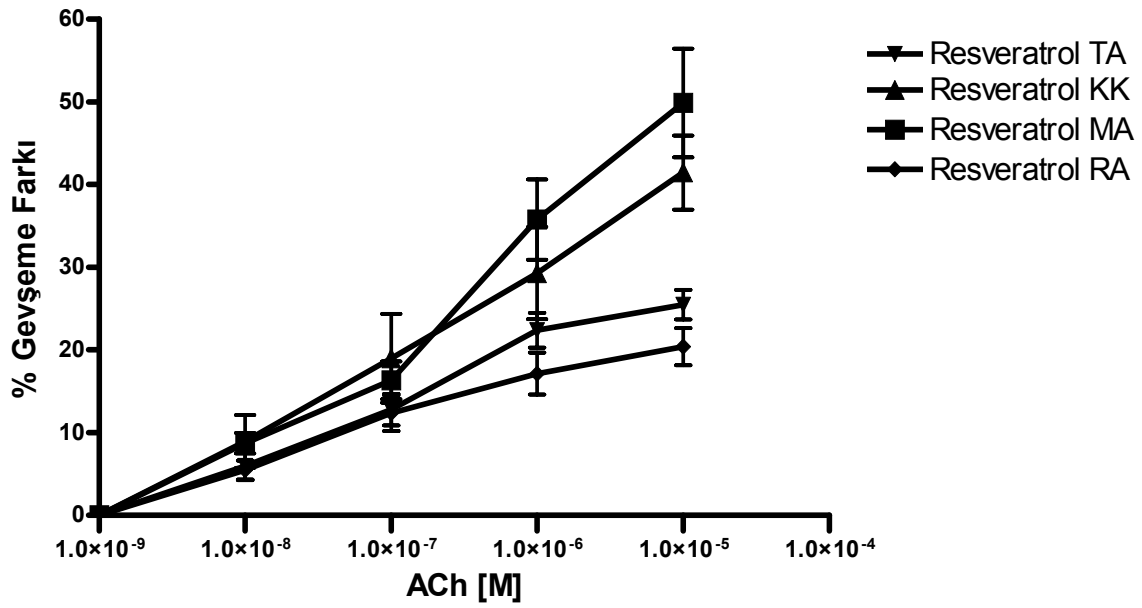
Kontrol grubunun maksimum gevşeme değerleri %100 olarak alınıp; hiperkolesterolemik grup ve resveratrol grubunun maksimum gevşeme yanıtları bu değere göre yüzde değişim olarak oranlanarak hesaplanmıştır. Her iki grupta çıkan sonuçlar arasındaki fark değerlendirilerek hiperkolesterolemi sonrası EBGY ve resveratrolün hiperkolesterolemiden koruyucu etkisi değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonrası %2 a/a 6 hafta süre ile hiperkolesterolemiye bağlı oluşan gevşeme yanıtları en fazla sırası ile MA>KK>TA>RA'de bozulma göstermektedir (Şekil 26).



Şekil 26: Hiperkolesterolemik diyet uygulanan grupta tüm dokuların ACh'e bağlı gevşeme yanıtlarının karşılaştırılması

3.3.6 Resveratrol grubunda tüm dokulardaki ACh yanıtlarının karşılaştırılması olarak değerlendirilmesi

Resveratrolün farklı düz kas yapılarında koruyucu etkisi ile ilgili yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda ise tavşanların 6 hafta süre ile %2 kolesterol ile beraber 4mg/kg/gün resveratrol ile beslenmeleri ACh yanıtlarında düzelmeye neden olmuştur. Bu düzelme değerlendirildiğinde ise sırası ile en fazla MA>RA>KK>TA' da olmaktadır.



Şekil 27: Resveratrol tedavisi uygulanan grupta tüm dokuların Ach'e bağlı gevşeme yanıtlarının karşılaştırılması

PD ₂ değerleri	Kontrol	Hiperkolesterolemik	Resveratrol
Renal Arter	6.90±0.22	6.45±0.37	6.65±0.48
Mezenterik Arter	6.38±0.18	7.49±0.97	6.23±0.20
Torakal Aorta	6.74±0.09	6.91±0.10	6.78±0.15
Korpus Kavernozum	6.38±0.16	6.42±0.19	6.30±0.48

Tablo 3: ACh uygulanmış olan dokularının PD₂ değerleri.

PD ₂ değerleri	Kontrol	Hiperkolesterolemik	Resveratrol
Renal Arter	7.08±0.22	7.11±0.22	7.72±0.24
Mezenterik Arter	6.46±0.32	6.63±0.14	7.09±0.25
Torakal Aorta	6.92±0.09	6.48±0.04	6.74±0.11
Korpus Kavernozum	6.90±0.10	6.50±0.12	6.65±0.11

Tablo 4: SNP uygulanmış olan dokularının PD₂ değerleri.

4 TARTIŞMA

4.1 VÜCUT AĞIRLIĞI

Kolesterol beslenmesi ve hayvanların vücut ağırlıklarına olan etkisi ile ilgili yapılmış olan pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan bazılarında hayvanların kolesterol diyeti ile beslenmesi sonrası vücut ağırlıklarında artma (146) bazılarında ise azalma (147) bildirilmiştir. Bunun yanı sıra Shao-cai Hong ve ark. nın 2006 yılında yaptığı çalışmada tavşanların 8 hafta süre ile %1 kolesterol diyeti ile beslenmeleri sonucunda ağırlıklarında kontrol grubuna göre herhangi bir anlamlı artış gözlenmemiştir. Aynı çalışmada kontrol grubu olan ve normal yem ile beslenen hayvanlarda da istatistiksel anlamlı bir ağırlık değişikliği gözlenmemiştir (148).

Çalışmamızda da Shao-cai Hong ve ark.nın sonuçlarına benzer şekilde kontrol grubu, kolesterol diyeti ve kolesterol diyeti+resveratrol diyeti alan deney gruplarının vücut ağırlıklarında başlangıç ve bitiş dönemleri arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark bulunmamıştır.

4.2 PLAZMA KOLESTEROL DÜZEYLERİ

Tavşanlarda hiperkolesterolemi, deneysel ateroskleroz modeli olarak sıklıkla kullanılmasına rağmen beslenme süresi ve alınan günlük diyetin kolesterol içeriği ile ilgili birçok farklı çalışma bulunmaktadır. Kolesterol miktarları %0.5 ile %2 arasında değişkenlik göstermekle beraber beslenme süreleri ise sıklıkla 4 hafta ile 8 hafta arasında farklılık gösterebilmektedir. Sonuç olarak yapılan çalışmalar ateroskleroz modeli için hem diyet kolesterol oranının hem de beslenme süresinin önemini vurgulamaktadır. Yeni Zelanda tavşanları ile yapılmış olan çalışmalarda, plazma kolesterol düzeyleri yaklaşık olarak 20-80 mg/dl olarak bildirilmektedir (149-153). Kolesterol diyeti alan tavşanlarda ise plazma kolesterol düzeyleri beslenme süresi ve kolesterol oranı ile farklılık göstermekle beraber 1000-2000 mg/dl olarak değerlendirilmektedir (151, 153,154).

Çalışmamızda tavşanlar %2 a/a kolesterol ile 6 hafta süre ile beslenerek hiperkolesterolemi modeli oluşturulmuştur. Kolesterol grubu hayvanların %2 kolesterol diyeti ile 6 hafta süre ile beslenmeleri sonucunda plazma kolesterol düzeyleri anlamlı ölçüde yükselmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız resveratrol, oral olarak 4mg/kg/gün olarak uygulandığında plazma kolesterol düzeylerine olan etkisi kolesterol grubu ile anlamlı farklılık göstermemiştir. Ancak; resveratrolün insan ve sıçan plazma kolesterol düzeylerini düşürdüğünü gösteren çalışmalar bulunmaktadır (154-157). Çalışma sonuçlarımıza benzer olarak; 2005 yılında yapılmış olan bir çalışmada %1.5 kolesterol diyeti ile 12 hafta beslenmiş olan tavşanlardaki plazma lipit düzeyleri aynı süre boyunca 3mg/kg/gün resveratrol ve %1.5 kolesterol diyeti alan tavşanlar ile farklılık göstermemiştir (158). Wilson ve ark. nın yaptığı başka bir çalışmada resveratrolün plazma DYL düzeylerini değiştirmedeği belirtilmiştir (159).

4.3 DAMAR YANITLARI

Çalışmamızdaki majör bulgu yüksek kolesterollü diyet ile beslenen tavşanlarda 4mg/kg/gün dozda resveratrolün ACh'e bağlı oluşan EBGY koruduğu yönündedir. ACh, EBGY'nı eNOS-NO-cGMP yolağı üzerinden göstermektedir. ACh'in endotel hücrelerine bağlanması sonrası sitozolik Ca^{+2} miktarı artarak eNOS'u aktive eder. eNOS ile sentezlenen NO plazma membranından difüze olur ve komşu VDKH'lerine geçer. Burada guanil siklaz enzimi ile cGMP oluşumunu arttırarak sitozolik Ca^{+2} miktarını azaltır. Bu olay ise düz kaslarda gevşemeye neden olur.

Bilindiği üzere aterosklerotik hayvanların vasküler yapıları endotelial hasar gösterir ve bu da aterosklerotik plak gelişiminde ilk basamaktır (160). Ateroskleroz başlangıcında öncelikle endotelial disfonksiyon olduğu pek çok çalışma ile gösterilmiştir (161-163). Endotelial disfonksiyon oluşma mekanizması henüz tam olarak gösterilememiş olsa da konu ile ilgili pek çok hipotez bulunmaktadır. Bu yaralanma endotelin normal fonksiyonlarında azalmaya, endotelial bağımlı NO miktarında (164) ve ACh gibi agonistler ile oluşan EBGY'nda azalmaya neden olur (165). ACh ile oluşan EBGY ile lezyonlar arasında anlamlı lineer ilişki olduğu bildirilmiştir (166).

4.3.1 KCI KASILMASI

Farklı dokularda hiperkolesterolemiye bağı KCI yanıtlarındaki değişiklikleri değerlendiren çalışmalar bulunmaktadır. Kısıtlı sayıda çalışmada kasılma yanıtlarında artış olduğu bildirilmekle beraber (167,168), genel görüş yanıtlarda değişiklik olmadığı yönündedir. 2006 yılında yapılmış olan bir çalışmada 16 hafta süre ile %0.5 kolesterol diyeti uygulanan tavşanlarda ve bu süre sonunda KCI ile TA halkalarında oluşturulan kasılma yanıtları kontrol grubuna göre farklı bulunmamıştır. Bu alışmada KCI'e bağlı olan kasılma yanıtlarındaki artış 16 haftadan sonra ortaya çıkmıştır (169). Başka bir çalışmada ise tavşanlar 4 hafta süre ile yüksek kolesterolü diyet ile beslenmiş ve bu süre sonunda subklavian arterlerinde KCI ile oluşturulan kasılmalar kontrol grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir (170). Mercedes ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise %0.5 kolesterol ile 17 hafta beslenen tavşanların plazma kolesterol düzeyleri 1121.0 ± 104.0 mg/dl olarak bulunmuş, MA ve TA dokuları ayrı olarak değerlendirildiğinde 80 mM KCI ile kasılma sonrası kontrol grubu ile hiperkolesterolemik grup kasılmaları arasında farklılık bulunmamıştır (171).

Çalışmamızda tavşan TA, MA, RA ve KK dokularının KCI ile kasılması sonucu oluşan yanıtlarda kontrol ve hiperkolesterolemik grup arasında bir fark oluşmamıştır. Benzer biçimde hiperkolesterolemik grup ile resveratrol grubu arasında da herhangi bir fark bulunmamıştır. Çalışmalarda genellikle KCI yanıtları VDKH kasılma yanıtlarını değerlendirmek amacı ile uygulanmaktadır (172). Sonuçlarımıza göre non-reseptör yollar ile oluşan kasılmalarda gruplar arasında herhangi bir fark bulunmamaktadır (173).

4.3.2 FENİLEFRİN YANITLARI

Çalışmamızda endotel bağımlı ve bağımsız gevşeme yanıtlarını değerlendirmek amacıyla fenilefrin ile kasılan dokulara ACh ve SNP denenmiştir. Fenilefrine bağlı oluşan maksimum kasılma yanıtları değerlendirildiğinde; kolesterol ile beslenen grup ve kolesterol+resveratrol tedavisi alan grup ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Benzer olarak %0.3 kolesterol diyeti ile 20 hafta süre ile beslenen tavşanlarda aorta fenilefrin yanıtlarında herhangi bir farklılık gözlenmediği bildirilmiştir (174). Tavşan karotis arterlerinde yapılan bir çalışmada ise 4 ve 8 hafta süre ile kolesterol diyeti ile beslenen tavşanlarda bu süreler sonucunda fenilefrin yanıtları

arasında kontrol grubu ile herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (175). %1 kolesterol diyeti ile tavşanların 8 hafta beslenmesi sonrası torakal ve abdominal aortalarının verdikleri fenilefrin yanıtları ise kontrol grubu ile bir farklılık göstermemiştir (176). KK düz kası ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada sonuçlarımıza benzer biçimde hiperkolesterolemi diyeti sonrası oluşturulan fenilefrin kasılmalarında kontrole göre herhangi bir fark oluşmadığı bildirilmiştir (177).

4.3.3 ACH YANITLARI

4.3.3.1 Renal arter

Çalışmamızda hiperkolesterolemik RA'de, ACh'e bağlı gevşeme yanıtlarının kontrol ve resveratrol grubuna göre anlamlı biçimde azaldığı görülmüştür. Resveratrol grubu ve kontrol grubu arasında ise anlamlı farklılık bulunmamıştır. Resveratrol, hiperkolesterolemiye bağlı gelişen endotel hasarını kontrole yakın bir düzeyde koruyabilmektedir. 2004 yılında yapılmış olan bir çalışmada, 10 hafta süre ile % 0.5 kolesterollü diyetle beslenen tavşan RA'inde ACh'e bağlı olan gevşeme yanıtlarında azalma olduğunu gösterilmiştir. Bu çalışmadaki plazma kolesterol düzeyleri bizim sonuçlarımızla yakın olarak 1697 ± 215 mg/dl olarak bulunmuştur (171). Resveratrolün RA üzerinde hiperkolesterolemiden koruyucu etkisi ile ilgili herhangi bir izole organ çalışması henüz bulunmamaktadır. Çalışmamızda diğer düz kas yapıları da göz önüne alındığında kontrol grubuna en yakın gevşeme yanıtları RA'de elde edilmiştir.

4.3.3.2 Mezenterik arter

Hiperkolesterolemik diyet ile beslenen tavşanların MA' de plazma kolesterol düzeylerine göre ACh yanıtları farklılık gösterebilmektedir. %0.5 kolesterol ile 17 ve 18 hafta beslenen tavşanlarda ACh gevşeme yanıtları anlamlı olarak azalmıştır (178,1179). 1998 yılında tavşanlarda yapılan bir çalışmada ise hiperkolesterolemiye bağlı olarak MA'de ACh'e kasılma yanıtları geliştiği gözlenmiştir (180). Çalışmamızda MA dokularında ACh'e bağlı olarak kasılma yanıtları oluşmuştur. Resveratrol ile tedavi, hiperkolesterolemik MA'de azalan gevşeme yanıtlarını anlamlı biçimde korumuştur.

Resveratrolün MA için hiperkolesterolemiden koruyucu etkisi ile ilgili yapılmış olan bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla beraber Miatello ve ark.'nın sıçanlara

früktoz uygulaması ile deneysel insülin-rezistansı oluşturduğu bir çalışmada oral resveratrol uygulanması (10mg/kg/gün) MA'de eNOS aktivitesinde azalmayı engellemiş ve resveratrolün vasküler koruyucu etkilerine eNOS aktivitesindeki artışın aracılık ettiği düşünülmüştür (181).

4.3.3.3 Torakal Aorta

Çalışmamızda TA'da resveratrol, hiperkolesterolemiye bağlı oluşan azalmış EBGY'nı korumuş fakat kontrol değerlerine ulaşamamıştır.

Tavşan aortasında hiperkolesterolemiye bağlı olarak EBGY'larındaki azalma pek çok çalışma ile gösterilmiştir (169,171,182,183). %1.2 kolesterol ile 8 hafta beslenen tavşanların EBGY ACh uygulanarak denenmiş ve hiperkolesterolemik grup ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. Bunun nedeni olarak ise eNOS miktarında azalma ve buna bağlı olarak NO miktarında azalma gösterilmiştir (184). Başka bir çalışmada ise %1 kolesterol ile 6 hafta süre ile beslenen tavşanların (kolesterol düzeyleri 1682 ± 165 mg/dl) aortalarında ACh uygulanması sonrası %8±8'lik gevşeme yanıtı görülürken bu yanıt kontrol grubunda %84±4 olarak gözlenmiştir (158). Yang ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada tavşanlar 4 hafta süre ile %2 kolesterol ile beslenmişlerdir. Elde edilen plazma kolesterol düzeyleri 2007 ± 329 mg/dl olarak bulunmuştur. Bu değerler çalışmamızdaki değerlere yakındır ve ACh uygulanması sonrası oluşan yanıtlar da benzerdir.

Resveratrolün hiperkolesterolemik aorta üzerinde oluşturduğu etkiler ile yapılmış olan benzer bir çalışmada tavşanlar 12 hafta süre ile %1.5 kolesterolü diyet ve 3mg/kg/gün resveratrol uygulanması aortada oluşan aterosklerotik plak oluşumunda azalmaya neden olmuştur. Aynı çalışmada aorta endotelial fonksiyonları ultrason ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak ilaç alan grupta endotelial fonksiyonlarda da hiperkolesterolemik gruba göre düzelme gözlenmiştir (185). Bunun yanında; resveratrolün sıçan aortasında intimal hasar oluşturulduktan sonra 10 mg/kg dozunda uygulanması sonucu endotelial progenitör hücreleri aktive ettiği ve eNOS miktarını arttırdığı, buna bağlı olarak ise hasar alanında kontrol grubuna göre düzelme oluşturduğu bildirilmiştir (159). Ancak; 1996 yılında yapılmış olan bir çalışmada ise tavşanlar 60 gün boyunca %0.5 kolesterol ile beslenmiş, diğer gruba ise aynı süre boyunca %0.5 kolesterol ile beraber, ilk hafta 0.5 mg/kg/gün sonraki 5

hafta ise 1 mg/kg/gün resveratrol verilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda ise resveratrol tedavisinin aortada anlamlı biçimde aterosklerotik plak oluşumunu arttırdığı bildirilmiştir ($p < 0.02$) (186).

4.3.3.4 Korpus kavernozum

Çalışmamızda hiperkolesterolemik grupta ACh'e bağlı gevşeme yanıtlarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. Resveratrol hiperkolesterolemik KK'da EBGY'nı korumuştur.

2005 yılında yapılmış olan bir çalışmada tavşanlar 2.5, 4.0 ve 7.5 hafta süre ile %1 kolesterol ile beslenmiş ve bu süreler sonunda KK dokuları izole organ banyosunda ACh uygulanarak değerlendirilmiştir. Gruplar içerisinde sadece 7.5 haftalık grubun KK dokusu ACh'e bağlı endotel bağımlı gevşeme yanıtlarında kontrol grubuna göre anlamlı farklılık göstermiştir (187). Yapılmış olan başka bir çalışmada ise tavşanlar 4 ve 8 hafta süre ile %2 kolesterol ile beslenmişlerdir. Her iki sürenin de sonunda KK dokularının ACh'e olan gevşeme yanıtlarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir (176). Azadzo ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada %0.5 lik kolesterol diyeti ile 10 hafta süre ile beslenen tavşanların KK dokularında da ACh gevşeme yanıtında anlamlı azalma gözlenmiştir (188). Hiperkolesterolemik insanlarda yapılan araştırmalarda da KK dokusunun hayvan çalışmalarında olduğu gibi EBGY'nda endotel bağımlı gevşeme yanıtla normokolesterolemik hastalara göre ACh'e bozulmuş yanıtlar alındığı bildirilmiştir (184).

KK dokusunu ve buna bağlı olarak erektil fonksiyon işlevinin korunması amacı ile hiperkolesterolemik tavşan modellerinde pek çok molekül denenmiştir. Daha önce resveratrolün KK üzerine hiperkolesterolemiden koruyucu etkileri ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim sonuçlarımıza göre ise resveratrol 4mg/kg günlük doz ile %2 kolesterol ile beraber uygulandığında, hiperkolesteroleminin etkilerinden koruma sağlayabilmektedir.

4.3.4 SNP YANITLARI

%1 kolesterol ile 6 hafta süre ile beslenen tavşanların aortalarında, ACh uygulanması sonrası kontrol ve hiperkolesterolemik grup aorta yanıtları arasında 10 kat gibi bir gevşeme farkı gözlenirken SNP yanıtlarında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (186). KK dokusunda da damar yanıtlarına benzer biçimde 7.5 hafta

süre ile kolesterol diyeti sonrası ACh yanıtlarında değişiklik oluşmasına rağmen SNP yanıtlarında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (187). Benzer olarak 4 ve 8 hafta süresince %2 kolesterol ile beslenen tavşanlarda da ACh yanıtlarında azalma görülmesine rağmen SNP yanıtlarında herhangi bir değişme görülmemiştir (188). İnsan çalışmalarında ise hiperkolesterolemik insanlardan alınan dokularda normokolesterolemik insanlara göre EBGY'nda azalma olmasına rağmen endotel bağımsız yanıtlarda herhangi bir azalma gözlenmemiştir (183). Yani; endotel bağımlı ACh'e verilen yanıtlar azalmış olmasına rağmen düz kas dokusunda hasar oluşmadığı sürece endotel bağımsız olan SNP yanıtlarında değişiklik görülmemektedir (169, 171,189). Benzer şekilde çalışmamızda da 3×10^{-6} M fenilefrin ön kasılması sonrası her üç grupta kümülatif SNP uygulanarak elde edilen gevşeme yanıtları arasında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir.

Resveratrolün hiperkolesterolemide SNP yanıtları üzerine olan etkisi ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Hücre kültüründe yapılmış olan bir çalışmada resveratrolün VDKH proliferasyonu ve bu olayın aterosklerotik oluşum üzerine olan etkisi çalışılmıştır. VDKH proliferasyonunun ateroskleroz gelişimi üzerine olan etkisi ve resveratrolün bu olayı doza bağımlı olarak geri çevirebildiği gösterilmiştir (190). Başka bir çalışmada ise; intimal kalınlaşmanın VDKH proliferasyonunun sonucu olması değerlendirilerek; tavşan iliak arterlerinde resveratrolün intimal kalınlaşma üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda ise resveratrolün tavşanlara intimal hasar oluşturulmadan 1 hafta önce başlanarak ve 5 hafta süre ile, 2-4 mg/kg dozlarda uygulandığında intimal kalınlaşmayı engellediği gösterilmiştir (191). Çalışmamızda %2 a/a kolesterol ile tavşanların 6 hafta süre ile beslenmesi SNP yanıtları üzerine herhangi bir anlamlı farklılık oluşturmamıştır.

Yapılan literatür araştırmalarında farklı dokular arasında EBGY'nda karşılaştırma yapan herhangi bir çalışmaya rastlamadık. Çölyak, süperiyor ve inferior MA genellikle ateroskleroz durumlarında birbirlerini çok iyi tolere ederler. Bu nedenle MA' de insanlarda aterosklerotik hastalıklara sıklıkla karşılaşılmamasına rağmen intestinal İskeminin klinik bulguları nadir olarak gözlenmektedir (192). KK için ise durum biraz daha farklılık göstermektedir. 2003 yılında yapılan bir derlemede penisin endotelial sistem sağlığının barometresi olarak görev yaptığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada ED' un vaskülopatilerin ön habercisi olabileceği bildirilmiştir (193).

Endotelial disfonksiyon riskinin göstergesi ED olabileceğine göre hiperkolesterolemide de ilk olarak KK' un etkilenmesini bekleyebiliriz.

Renovasküler stenotik hastalıkların %80'inin ateroskleroza bağlı olduğu bildirilmiştir. RA'lerde oluşan aterosklerotik hastalıkların sıklıkla koroner arter, aorta, sistemik serebral ve periferik arterlerde oluşan bir sistemik aterosklerozun parçası olduğu belirtilmiştir (194). Çalışmamızda RA'e bağlı olarak oluşan endotelial disfonksiyon diğer endotelial kas yapıları ile karşılaştırıldığında en az bozulma gösteren doku olarak bulunmuştur.

5 SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda 3×10^{-6} M fenilefrin uygulaması sonrası uygulanan ACh yanıtları hiperkolesterolemik grupta, resveratrol grubunda ve kontrol grubunda karşılaştırılmıştır. Tüm hiperkolesterolemik doku gruplarında, kümülatif olarak ACh uygulanması sonucu elde edilen maksimum gevşeme yanıtları kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Resveratrol uygulanması bu iyileştirici etkisini en fazla RA üzerinde göstermiştir ve kontrol grubu ile yakın sonuçlar elde edilmiştir. Diğer dokularda ise resveratrol uygulanması hiperkolesteroleminin EBGY üzerine olan koruyucu etkisine rağmen kontrol grubu cevaplarına ulaşamamıştır.

Kolesterol ile beslenen tavşanlarda ACh yanıtlarının azaldığını gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu azalmanın nedeni olarak NO'nin azalması gösterilmektedir. NO' deki bu azalmanın nedeni üzerine olan ilgi sadece eNOS değil aynı zamanda caveolae membran yapısına da bağlanmaktadır. Fazla miktarda caveolin olması durumunda endotelial hücre kültürlerinde NO üretiminde azalma meydana geldiği gösterilmiştir (194). NO salınımındaki azalmanın nedeni olarak eNOS aktivitesindeki bu azalma gösterilmiştir. Bu nedenle hiperkolesterolemi durumunda NO miktarının azalmasına bir neden olarak da kalmodulin ve caveolin arasındaki yarışma neden olarak gösterilmiştir (195). DYL miktarında artışla paralel olarak Ox-DYL miktarında artış ise endotelial tabakasından reseptör bağımlı NO salınımında azalmanın kaybı ile ilişkilidir. Olası açıklama olarak; Ox-DYL'nin eNOS aktivitesini olumsuz yönde etkilediği düşünülmektedir. Blair ve ark. Ox-DYL'nin caveolaedan kolesterol depleksiyonuna neden olarak bu yapıların bozulmalar gösterdiği ve bu nedene bağlı olarak eNOS'ın internal membranal alana doğru

hareket ettiğini göstermişlerdir (195). Ox-DYL' ye bağlı oluşan bu yer değişikliği normal agonist uyarı ile oluşan yer değiştirme ile farklılıklar gösterir. Ox-DYL'ye bağlı oluşan bu etkide eNOS-caveolin kompleksi membran yapısı ile beraber intermembranal alana doğru göç eder. Bu yer değişikliğinin olması durumunda ise herhangi bir agonist uyarı sonrasında eNOS aktive olmasını engeller. Normal şartlarda eNOS aktivasyona enzimin hiperfosforilasyonu ile eşlik eder. Ox-DYL varlığında enzim herhangi spesifik aktivasyon alanından hiperfosforile olmaz ve NO sentezini gerçekleştiremez (144).

Resveratrolün; kolesterolün endotel üzerine olan etkilerini azaltmasına sebep olarak birkaç mekanizma aşağıda belirtilmiştir:

Hiperkolesteroleminin endotel üzerinde oluşturduğu hasardan artmış olan süperoksit oluşumu sorumlu tutulmaktadır. Oluşan süperoksit anyonları NO'yu inaktive edebilir (Şekil 4). Resveratrol hücre içi ROS'u yakalayabilme özelliğine sahiptir (196-198). Antioksidan özellikler göstermesine rağmen (133) in-vitro olarak çok yüksek antioksidan özelliği gösterilememiştir (199). İn-vitro olarak gösterilen bu düşük antioksidan özelliğine karşın in vivo olarak yüksek antioksidan özellik göstermesinin nedeninin eNOS miktarını ve buna bağlı olarak da NO salınımını arttırmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Antioksidan özelliğinin, süper oksit radikallerini yakalayıcı özellik olduğu düşünülmektedir (199).

Yapılmış olan çalışmalar resveratrolün eNOS miktarında artış oluşturduğunu göstermişlerdir (201-203). Aterosklerozun başlangıcı endotelyal disfonksiyon olarak belirtilmiştir. Endotelyal disfonksiyon oluşumunun ise birçok çalışmada NO miktarında azalma ile başladığı bildirilmiştir. Yapılmış olan birçok çalışma resveratrolün NO miktarında artışa neden olduğunu belirtmiştir (204).

Ox-DYL oluşumunun azalması ateroskleroz ve endotelyal disfonksiyon gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Demir ve bakır iyonlarının DYL peroksidasyonunu arttırdığı bilinmektedir. Yapılmış olan çalışmalarda resveratrolün lipit peroksidasyonu üzerinde anlamlı olarak azaltıcı etkisi olduğu gösterilmiştir (205). Benzer bir çalışmada yine bakır ile uyarılan lipit peroksidasyonu üzerinde diğer fenollere göre daha fazla önleyici etkisi olduğu gösterilmiştir (206). Resveratrol hidroksil radikallerini süpürücü bir özellik de göstermektedir (207). DYL oksidasyonu üzerine resveratrolün etkisi ile ilgili kobaylarda yapılmış olan bir çalışmada,

resveratrolün lipit peroksidasyonunu anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir (208). 2006 yılında Ox-DYL'ye bağlı oluşan endotel hücrelerindeki hasarlanmada resveratrolün koruyucu etkisi gösterilmiştir. Bu çalışmada insan umbilikal endotel hücreleri kullanılmıştır. Sonuç olarak ise resveratrolün Ox-DYL'ye bağlı olan hasarlanmayı, apoptotik oluşumları engellediği, ROS oluşumunu ve hücre içi kalsiyum akımını engellediğini göstermişlerdir (209).

YYL'nin aterosklerozun oluşmasını ve ilerlemesini engelleyen birçok mekanizma bulunmakla beraber en önemli damar koruyucu etkisi reverse kolesterol transportudur. ABCA1'in hücre dışına kolesterol taşınmasında büyük bir öneme sahip olduğu gösterilmiştir. ABCA1 sadece reverse kolesterol transportunda değil aynı zamanda karaciğer tarafından YYL kolesterol sentezininin de artışına sebep olarak etki etmektedir. ABCA1 aktivitesinin farmakolojik olarak kontrol edilebilir olması arterlerde ve makrofajlardaki lipit miktarını azaltarak plazma kolesterol konsantrasyonlarında regülasyona neden olabilmektedir (210). 2006 yılında yapılmış olan bir çalışma resveratrolün makrofajlarda ABCA1 mRNA ekspresyonunu arttırdığını ve buna bağlı olarak makrofajlarda kolesterol birikimini engellediğini göstermiştir (211). Resveratrol ile yapılmış olan başka bir çalışmada ise aterosklerozdan koruyucu etkisini DYL ve YYL düzeylerini değiştirmeden yaptığını göstermiştir (158).

Çalışmamız farklı düz kas yapılarında aterosklerozun farklı etkileri ve resveratrolün bu yapılar üzerindeki koruyucu etkisini gösteren ilk çalışmadır. Endotelial disfonksiyon başlangıcının NO azalması ile beraber başladığı daha önceden de belirttiğimiz gibi pek çok çalışma ile gösterilmiş olsa da NO'in azalma nedeni henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Resveratrol ve birçok ajanın bu etkiden koruyabileceği gösterilmiş olmasına rağmen halen günümüzde endotelial disfonksiyonu engelleyebilecek bir molekül bulunmamaktadır. Çalışmamızda farklı damar çapları üzerine farklı miktarda etki gösterdiği gösterilmiştir. Bu düz kas yapıları içerisinde klinik olarak ilk bulgu verebilecek olan, belirttiğimiz üzere KK yapısı ve buna bağlı olarak üzerinde uzun zamandır tartışılan ED'dur. Farklı damarlarda hiperkolesteroleminin farklı etki göstermesi ile ilgili henüz yapılmış olan bir çalışmada bu etki nedeni olarak endotelial caveola dağılımının farklı olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonucuna göre caveola dağılımlarına göre ACh'e bağlı yanıtlarda

değişiklik gözlenebilmektedir. Bu olayın nedeni ise bu dağılımın NO miktarını etkilemesi olarak değerlendirilmiştir (212).

Çalışmamızın projede yer alan bundan sonraki aşamasında ise aldığımız doku örneklerinde caveolin-1 proteini, eNOS ve ABCA1 miktarları değerlendirilecektir. . ABCA1 hücre yüzeyinde hem caveolin-1 hem de YYL ile beraber lokalizasyon göstermektedir. Aldığımız örneklerde hiperkolesteroleminin bu yapılar üzerine etkilerine bakılacak ve resveratrolün olası koruyucu etki mekanizması değerlendirilecektir. Caveolin-1 proteini ABCA1 ve YYL arasındaki etkileşim için gerekli bir proteindir. Hipotezimiz resveratrolün bu koruyucu etkisini endotel hücrelerinde ABCA1 miktarını arttırarak gösterdiğiidir. Plazmalemmal caveola içerisindeki ABCA1 proteininin hücre içerisindeki kolesterolü uzaklaştırması ateroskleroz tedavisi için kullanılabilinecek bir tedavi metodu olabilir.

6 KAYNAKLAR

- 1 Herbert C. Stary. Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 2000, 20: 1177–1178.
- 2 Assmann G, Cullen P, Jossa F, Lewis B et al. Coronary heart disease: reducing the risk: the scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease. A worldwide view. International Task force for the Prevention of Coronary Heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Aug; 19(8):1819-1824,
- 3 Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med.*; 1999 Jun 10, 340(23):1801-1811.
- 4 Schieken RM. The management of the family at high risk for coronary heart disease. *Cardiol Clin.*; 1989 May; 7(2):467-77,
- 5 Türk kardioloji derneği. Koroner kalp hastalığından korunma ve tedaviye ilişkin ulusal kılavuz. III. Baskı, 1998.
- 6 Cox D.A. and Cohen M.L.: Effects of oxidized low density lipoprotein on vascular contraction and relation. Clinical and Pharmacological implications in atherosclerosis, *Pharmacological Review*, 1996; 48 (1), 3-15.
- 7 Goodman and Gillman's ; The pharmacological Basis of Therapeutic, 10 ed, Hardman G,J. And Limbird L.E.2001
- 8 Wu J.M. Wang Z., Hsieh J.C. Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic present in red wine. *Int J. Molecular Medicine*. 2001; 8,3-17.
- 9 Alison Blair, Philip W. Shaul, Ivan S. et al. Smart: Oxidized Low Density Lipoprotein Displaces Endothelial Nitric-oxide Synthase (eNOS) from Plasmalemmal Caveolae and Impairs eNOS Activation. *The Journal Of Biological Chemistry*; 1999 Vol. 274, No. 45, Issue of November 5, pp. 32512–32519.
- 10 Kubes P, Suzuki M, Granger DN: Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA*: 1991; 88: 4651–4655.
- 11 De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*, 1995; 96: 60–68.
- 12 Marks DS, Vita JA, Folts JD, Keane JF Jr et al. Inhibition of neointimal proliferation in rabbits after vascular injury by a single treatment with a protein adduct of nitric oxide. *J Clin Invest* 1995; 96: 2630–2638.
- 13 Grag UC, Hassid A: Nitric oxide (NO) and 8-bromo-cyclic GMP inhibits mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989, 83: 1974–1978.
- 14 Fukuo K, Inoue T, Morimoto S, Nakahashi T et al. Nitric oxide mediates cytotoxicity and basic fibroblast growth factor release in cultured vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* , 1995; 95: 669–672.
- 15 Mendelsohn ME, O'Neill S, George D, Loscalzo J: Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by S-nitroso-N-acetylcysteine. *J Biol Chem* 1990; 265:19028–19034.
- 16 Stamler JS, Vaughan DE, Loscalzo J: Synergistic disaggregation of platelets by tissue-type plasminogen activator, prostaglandin E1, and nitroglycerin. *Circ Res* 1989; 65: 796–804.
- 17 Simari RD, San H, Rekhter M, Ohno T et al: Regulation of cellular proliferation and intimal formation following balloon injury in atherosclerotic rabbit arteries. *J Clin Invest* 1996; 98: 225–235.
- 18 Garcia-Cardena F, Fan R, Stern DF, Liu J et al: Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J Biol Chem* 1996; 271: 27237–27240.
- 19 Rubanyi GM: The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22: S1–S14.
- 20 Adams MR, Kinlay S, Blake GJ, Orford JL et al: Atherogenic lipids and endothelial dysfunction: mechanisms in the genesis of ischemic syndrome. *Annu Rev Med* 2000; 51: 149–167.
- 21 Arnman V, Nilsson A, Stemme S, Risberg B et al. Expression of plasminogen activator inhibitor 1 mRNA in healthy, atherosclerotic and thrombotic human arteries and veins. *Thromb Res* 1994; 76: 487–499.
- 22 Hamsten A: Hemostatic function and coronary disease. *N Engl J Med* 1991; 332: 677–678.
- 23 Szczeklik A, Musial J, Undas A, Swadzba J et al. Inhibition of thrombin generation by aspirin is blunted in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 948–954.

- 24 Davi G, Ganci A, Averna M, Giammarresi C et al. Thromboxane biosynthesis, neutrophil and coagulation activation in type IIa hypercholesterolemia. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1015–1019.
- 25 Fleming I, Busse R: Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovascular Res* 1999; 43: 532–541,
- 26 Abe J, Berk BC: Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 1998; 8: 59–64.
- 27 Freeman BA, Crapo JD: Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412–426.
- 28 Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H et al. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 1992; 5: 834–842.
- 29 Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 2003; 111: 1201–1209.
- 30 Griendling KK, FitzGerald GA: Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 2003; 108: 1912–1916.
- 31 Anderson TJ, Meredith IT, Charbonneau F, Yeung AC et al. Endothelium-dependent coronary vasomotion relates to the susceptibility of LDL to oxidation in humans. *Circulation* 1996; 93: 1647–1650.
- 32 Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J, Sanchez-Pascuala R et al. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelium-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1998; 101: 2711–2719.
- 33 Bode-Böger SM, Böger RH, Kienke S, Junker W et al. Elevated L-arginine/ dimethylarginine ratio contributes to enhanced systemic NO production by dietary L-arginine in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 219: 598–603.
- 34 Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J et al: Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339: 572–575.
- 35 Feron O, Dessy C, Desager JP, Balligand JL: Hydroxy-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance. *Circulation* 2001; 103: 113–118.
- 36 Radomski MW, Palmer RM, Moncada S: Comparative pharmacology of endothelial-derived relaxing factor and prostacyclin in platelets. 1987; *J Pharmacol* 92: 181–187.
- 37 Boulanger CM, Tanner FC, Béa ML, Hahn AW et al. Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res* 70: 1992; 1191–1197.
- 38 Kita T, Kume N, Minami M, Hayashida K et al. Role of Oxidized LDL in atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci* 2001; 947: 199–206.
- 39 Palmer HJ, Paulson KE: Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression. *Nutr Rev* 1997; 55: 353–361.
- 40 Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K et al. Requirements for generation of H₂O₂ for PDGF signal transduction. *Science* 1995; 270: 296–299.
- 41 Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr: Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991; 251: 788–791.
- 42 Khan BV, Parthasarathy SS, Alexander RW, Medford RM: Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1995; 95: 1262–1270.
- 43 Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA: Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* 1992; 90: 1138–1144.
- 44 Lopez-Garcia E, Schulze MB, Meigs JB, Manson JE et al. Consumption of trans fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction. *Nutrition* 2005; 135: 562–566.
- 45 De Caterina R, Liao JK, Libby P: Fatty acid modulation of endothelial activation. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 213S–223S.
- 46 Wallace FA, Miles EA, Evans C, Stock TE et al. Dietary fatty acids influence the production of Th1-but not Th2-type cytokines. *J Leuk Biol* 2001; 69: 449–457.

- 47 Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M: Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:2175–2183.
- 48 Sowers JR: Hypertension, angiotensin II, and oxidative stress. *N Engl J Med* 2002; 346: 1999–2001.
- 49 Drexler H: Factors involved in the maintenance of endothelial function. *Am J Cardiol* 1998; 82: 3S–4S.
- 50 Langheinrich AC, Bohle RM: Atherosclerosis: humoral and cellular factors of inflammation. *Virchows Arch* 2005; 446: 101–111.
- 51 Griendling KK, FitzGerald GA: Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 2003; 108: 1912–1916.
- 52 Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Peetz D et al. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001; 104: 1336–1342.
- 53 Pradhan AD, Rifai N, Ridker PM: Soluble intercellular adhesion molecule-1, soluble vascular adhesion molecule-1, and the development of symptomatic peripheral arterial disease in men. *Circulation* 2002; 106: 820–825.
- 54 Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ et al. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 1998; 351: 88–92.
- 55 Endemann DH, Schiffrin EL: Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1983–1992.
- 56 Strom A, Franzen A, Wangnerud C, Knutsson AK et al. Altered vascular remodeling in osteopontin-deficient atherosclerotic mice. *J Vasc Res* 2004; 41: 314–322.
- 57 Mullenix PS, Andersen CA, Starnes BW: Atherosclerosis as inflammation. *Ann Vasc Surg* 2005; 19: 130–138.
- 58 Linton MF, Fazio S: Macrophages, inflammation, and atherosclerosis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 21: S35–S40.
- 59 Libby P: Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420, 868–874.
- 60 Jeziorska M, McCollum C, Woolley DE: Mast cell distribution, activation, and phenotype in atherosclerotic lesions of human carotid arteries. 1997;182(1):115-22.
- 61 Bhakdi S, Torzewski M, Klouche M, Hemmes M: Complement and atherogenesis: binding of CRP to degraded nonoxidized LDL enhances complement activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2348–2354.
- 62 Leskinen MJ, Kovanen PT, Lindstedt KA: Regulation of smooth muscle cell growth, function and death by activated mast cells a potential mechanism for the weakening and rupture of atherosclerotic plaques. *Biochem Pharmacol* 2003; 66:1493–1498.
- 63 De Caterina R, Zampolli A: From asthma to atherosclerosis—5-lipoxygenase, leukotrienes, and inflammation. *N Engl J Med* 2004; 350: 4–7.
- 64 Cracowski JL: Isoprostanes: an emerging role in vascular physiology and disease? *Chem Phys Lipids* 2004; 128: 75–83.
- 65 Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM: Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), α b integrin, and GPIIb. *J Exp Med* 1998; 187: 329–339.
- 66 Hamsten A, Wiman B, Faire U, Blomback M: Increased plasma levels of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1985; 313: 1557–1563.
- 67 Eberhardt W, Beeg T, Beck KF, Walpen S et al. Nitric oxide modulates expression of matrix metalloproteinase-9 in rat mesangial cells. *Kidney Int* 2000; 57: 59–69.
- 68 Flak E: Pathogenesis of plaque disruption In: Fuster V, Ross R, Topol EJ (eds), *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease 2*. Lippincott-Raven, Philadelphia 1996; 492–510.
- 69 Caramori PR, Zago AJ: Endothelial dysfunction and coronary artery disease. *Arq Bras Cardiol* 2000; 75: 173–182.
- 70 Fishman AP: Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities. *Ann NY Acad Sci* 1982; 401: 1–8.
- 71 Palmer RM, Ashton DS, Moncada S: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333: 664–666.
- 72 Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J: Biochemistry of nitric oxide and its redoxactivated forms. *Science* 1992; 258: 1898–1902.

- 73 Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F: Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 3203–3207.
- 74 Weksler BB, Marcus AJ, Jaffe EA: Synthesis of prostaglandin I₂ (prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74:3922–3926.
- 75 FitzGerald GA, Pedersen AK, Patrono C: Analysis of prostacyclin and thromboxane biosynthesis in cardiovascular disease. *Circulation* 1983; 67: 1174–1177.
- 76 Garland CJ, Plane F, Kemp BK, Cocks TM: Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16:23–30.
- 77 Levin ER: Endothelins. *N Engl J Med* 1995; 333: 356–363.
- 78 Haynes WG, Webb DJ: Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. *Lancet* 1994; 344: 852–854.
- 79 Pigazzi A, Heydrick S, Folli F, Benoit S et al. Nitric oxide inhibits thrombin receptor-activating peptide-induced phosphoinositide 3-kinase activity in human platelets. *J Biol Chem* 1999; 274: 14368–14375.
- 80 Freiman PC, Mitchell GG, Heistad DD, Armstrong ML et al. Atherosclerosis impairs endothelium-dependent vascular relaxation to acetylcholine and thrombin in primates. *Circ Res* 1986; 58: 783–789.
- 81 Cooke JP, Singer AH, Tsao P, Zera P et al. Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest* 1992; 90: 1168–1172.
- 82 Jayakody L, Senaratne M, Thomson A, Kappagoda T: Endothelium-dependent relaxation in experimental atherosclerosis in the rabbit. *Circ Res* 1987; 60: 251–264.
- 83 Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne R et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1986; 315: 1046–1051.
- 84 Nabel EG, Selwyn AP, Ganz P: Large coronary arteries in humans are responsive to changing blood flow: an endothelium-dependent mechanism that fails in patients with atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1990; 16: 349–356.
- 85 Zeiher AM, Drexler H, Wollschlager H, Just H: Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1991; 83: 391–401.
- 86 Zeiher AM, Drexler H, Saurbier B, Just H: Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans: effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia and hypertension. *J Clin Invest* 1993; 92: 652–662.
- 87 Adams MR, Robinson J, McCredie R, Seale JP et al. Smooth muscle dysfunction occurs independently of impaired endothelium-dependent dilation in adults at risk of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 123–127.
- 88 Cernacek P, Stewart DJ: Immunoreactive endothelin in human plasma: marked elevations in patients in cardiogenic shock. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161:562–567.
- 89 Shichiri M, Hirata Y, Ando K, Emori T, Ohta K, Kimoto S, Ogura M, Inoue A, Marumo F: Plasma endothelin levels in hypertension and chronic renal failure. *Hypertension* 1990; 15: 493–496.
- 90 Lopez JA, Armstrong ML, Piegors DJ, Heistad DD: Vascular responses to endothelin-1 in atherosclerotic primates. *Arteriosclerosis* 1990; 10: 1113–1118.
- 91 Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.
- 92 Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J* 1995; 9: 1319-1330.
- 93 Burnett al, Lowenstein Cj, Brecht DS, Chang T et al. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science* 1992; 257: 401-403.
- 94 Burnett Al, Tillman SL, Chang TSK, Epstein JI, Lowenstein CJ, Brecht DS, Snyder SH, Walsh PC. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the autonomic innervation of the human penis. *J Urol* 1993; 150: 73-76.
- 95 Hedlund P, Alm P, Andersson KE. NO synthase in cholinergic nerves and NO-induced relaxation in the rat isolated corpus cavernosum. *Br J Pharmacol*, 1999; 127: 349-360.
- 96 Hedlund P, Ny L, Alm P, Andersson KE. Cholinergic nerves in human corpus cavernosum and spongiosum contain nitric oxide synthase and heme oxygenase. *J Urol*, 2000; 164: 868- 875.
- 97 Stanarius A, Uckert S, Machtens Sa, Stief Cg, Wolf G, Jonas U. Immunocytochemical distribution of nitric oxide synthase in the human corpus cavernosum: an electron microscopical study using the tyramide signal amplification technique. *Urol Res*, 2001; 29: 168-172.

- 98 Dail WG, Barba V, Leyba L, Galindo R. Neural and endothelial nitric oxide synthase activity in rat penile erectile tissue. *Cell Tissue Res*, 1995; 282: 109-116.
- 99 Celtek S, Moncada S. Modulation of noradrenergic responses by nitric oxide from inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide*, 1997; 1: 204-210.
- 100 Moncada S, Higgs EA, Furchgott RF. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev*, 1997; 49: 137-142.
- 101 Ignarro LJ, Bush PA, Buga Gm, Wood KS, Fukoto JM, Rajfer J. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990; 170:843-850.
- 102 Leone Am, Wiklund NP, Hokfelt T, Brundin L, Moncada S. Release of nitric oxide by nerve stimulation in the human urogenital tract. *Neuroreport*, 1994; 5: 733-736.
- 103 Holmquist F, Stief CG, Jonas U, Andersson KE. Effects of the nitric oxide synthase inhibitor NG-nitro-L-arginine on the erectile response to cavernous nerve stimulation in the rabbit. *Acta Physiol Scand*, 1991; 143: 299-304.
- 104 Finberg JP, Levy S, Vardi Y. Inhibition of nerve stimulation-induced vasodilatation in corpora cavernosa of the pithed rat by blockade of nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol*, 1993; 108: 1038-1042.
- 105 Trigo-Rocha F, Aronson WJ, Hohenfellner M, Ignarro LJ, Rajfer J, Lue TF. Nitric oxide and cGMP: mediators of pelvic nerve-stimulated erection in dogs. *Am J Physiol*, 1993; 264: H419-422.
- 106 Rees DD, Palmer RM, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 3375-3378.
- 107 Hurt KJ, Musicki B, Palese MA, Crone JK, Becker RE, Moriarty JL, Snyder SH, Burnett AL. Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase mediates penile erection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 4061-4066.
- 108 Hobbs AJ. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol Sci*, 1997; 18: 484-491.
- 109 Bush PA, Gonzalez NE, Ignarro LJ. Biosynthesis of nitric oxide and citrulline from L-arginine by constitutive nitric oxide synthase present in rabbit corpus cavernosum. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992; 186: 308-314.
- 110 Dahiya R, Trigo-Rocha F, Brock G, Narayan P, Lue TF. Sodium nitroprusside and neurostimulation cause increased levels of cyclic guanosine monophosphate and not cyclic adenosine monophosphate during canine penile erection. *Biochem Mol Biol Int*, 1993; 29: 167-173.
- 111 Celtek S, Kasakov L, Moncada S. Inhibition of nitrenergic relaxations by a selective inhibitor of the soluble guanylate cyclase. *Br J Pharmacol*, 1996; 118: 137-140.
- 112 Celtek S, Moncada S. Nitrenergic control of peripheral sympathetic responses in the human corpus cavernosum: a comparison with other species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997; 94: 8226- 8231.
- 113 Recio P, Lopez Pg, Hernandez M, Prieto D, Contreras J, Garcia-Sacristan A. Nitrenergic relaxation of the horse corpus cavernosum: Role of cGMP. *Eur J Pharmacol*, 1998; 351: 85-94.
- 114 Paul, B., Masih, I., Deopujari, J., and Charpentier, C. Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakchasava, an Ayurvedic medicine from India. *J. Ethnopharmacol.* 1999; 68, 71–76.
- 115 Vastano, B.C., Chen, Y., Zhu, N., Ho, C.T., Zhou, Z., and Rosen, R.T. Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*. *J. Agri. Food Chem.* 2000; 48, 253–256.
- 116 Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Wine as a biological fluid: history, production and role in disease prevention. *J. Clin. Lab. Anal* 1997; 11:287-313.
- 117 St Leger AS, Cochrane AL, Moore F. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to consumption of wine. *Lancet*; 1979; 1:1017-1020.
- 118 Renoud S.C. Geuguen R, Schenker J. Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France. *Epidemiology* 1998; 9:184-188.
- 119 Law M, Wald N. Why hearth disease mortality is low in France: The time lag explanation. *Br. Med J* 1999;318:1471-1476.
- 120 Renoud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*; 1992; 339:1523-1526.
- 121 Koop P. Resveratrol a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the "French paradox". *Euro J Endo*; 1998; 138:619-620.

- 122 Manna, S.K., Mukhopadhyay, A., and Aggarwal, B.B. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF- κ B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J. Immunol.* 2000; 164, 6509–6519.
- 123 Ray, P.S., Maulik, G., Cordis, G.A., Bertelli, A.A., Bertelli, A., and Das, D.K. The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury *Free Rad. Biol. Med.* 1999; 27, 160–169.
- 124 Ray, P.S., Maulik, G., Cordis, G.A. et al. Myocardial protection by Protokin, a novel extract of trans-resveratrol and emodin. *Free Radic. Res.* 2000; 32, 135–144.
- 125 Yen, G.C., Duh, P.D., and Lin, C.W. Effects of resveratrol and 4-hexylresorcinol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Free Radic. Res.* 2003; 37, 509–514.
- 126 Fitzpatrick, D.F., Hirschfield, S.L., and Coffey, R.G. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine or other grape products. *Am. J. Physiol.* 1993; 265, H774–H748.
- 127 Klinge, C.M., Risinger, K.E., Watts, M.B., Beck, V., Eder, R., and Jungbauer, A. Estrogenic activity in white and red wine extracts. *J. Agri. Food Chem.* 2003; 51, 1850–1857.
- 128 Naderali EK, Doyle PJ, Williams G. Resveratrol induces vasorelaxation of mesenteric and uterine arteries from female guinea-pigs. *Clin Sci (Lond).* 2000; 98(5):537-43.
- 129 Orallo F, Alvarez E, Camina M, Leiro JM, Gomez E, Fernandez P. The possible implication of trans-Resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol Pharmacol.*; 2002; 61(2):294-302.
- 130 Iijima K, Yoshizumi M, Hashimoto M, Kim S, Eto M, Ako J, Liang YQ, Sudoh N, Hosoda K, Nakahara K, Toba K, Ouchi Y. Red wine polyphenols inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells and downregulate expression of cyclin A gene. *Circulation.* 2000; 22;101(7):805-11.
- 131 Pezzuto, J.M. Plant-derived anticancer agents. *Biochem. Pharmacol.* 1997; 53, 121–133.
- 132 Jang, M., Cai, L., Udenani, G.O. et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997; 275, 218–220.
- 133 Bhat, K.P., Kosmeder, J.W., II, Pezzuto, J.M. Biological effects of resveratrol. *Antiox. Redox Signal.* 2001; 3, 1041–1064.
- 134 Hattori, R., Otani, H., Maulik, N., and Das, D.K. Pharmacological preconditioning with resveratrol: Role of nitric oxide. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002; 282, H1988–H1995.
- 135 Das, S., Cordis, G.A., Maulik, N., and Das, D.K. Pharmacological preconditioning with resveratrol: A role of CREB-dependent Bcl-2 signaling via adenosine A3 receptor activation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005; 288, H328–H335.
- 136 Kirk RI, Deitch JA, Wu JM, Lerea KM. Resveratrol decreases early signaling events in washed platelets but has little effect on platelet in whole blood. *Blood Cells Mol Dis.*; 2000; 26(2):144-50.
- 137 Pendurthi, U.R., Williams, J.T., and Rao, L.V. Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells: A possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine. *Arterioscler. Throm. Vasc. Biol.* 1999; 19, 419–426.
- 138 Fremont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 2000; 66: 663– 73.
- 139 Belguendouz L, Fremont L, Gozzelino MT. Interaction of transresveratrol with plasma lipoproteins. *Biochem Pharmacol.* 1998; 55:811–816.
- 140 Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E et al. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet.* 1993; 341:454– 7.
- 141 Kerry NL, Abbey M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis.* 1997; 135:93– 102.
- 142 Wang Z, Huang Y, Zou J, Cao K et al. Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. *Int J Mol Med.* 2002; 9:77– 9.
- 143 Rotondo S, Rajtar G, Manarini S, Celardo A, Rotillo D, de Gaetano G, et al. Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. *Br J Pharmacol.* 1998; 123:1691 –1619.
- 144 Lin MT, Yen ML, Lin CY, Kuo ML. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by resveratrol through interruption of Src-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation. *Mol Pharmacol.* 2003; 64:1029– 36.
- 145 Pendurthi UR, Rao LV. Resveratrol suppresses agonist-induced monocyte adhesion to cultured human endothelial cells. *Thromb Res.* 2002; 106:243– 8.

- 146 Moreland RS, Lichtenstein AH, Chobanian AV. Effects of hypertension on hypercholesterolemia-induced changes in contraction of rabbit aorta and carotid artery. *Eur J Pharmacol.* 1996; 20;307(1):55-64.
- 147 Rikitake Y, Kawashima S, Takeshita S, Yamashita T et al. Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis.* 2001; 154(1):87-96.
- 148 Shao-cai Hong, Shui-ping Zhao, and Zhi-hong Wu. Probucoyl Up-Regulates Paraoxonase 1 Expression in Hepatocytes of Hypercholesterolemic Rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol*; 2006; 47:77–81.
- 149 Menzoian JO, Haudenschild CC, Shipman JL, Nickerson CJ et al. Correction of enhanced endothelial permeability by cessation of cholesterol feeding. *J Vasc Surg.* 1987; 5(2):336-41.
- 150 Kojda G, Stein D, Kottenberg E, Schnaith EM, Noack E. In vivo effects of pentaerythrityl-tetranitrate and isosorbide-5-mononitrate on the development of atherosclerosis and endothelial dysfunction in cholesterol-fed rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995; 25(5):763-73.
- 151 Santilli SM, Kronson J, Payne WD. The effect of hypercholesterolemia on the rabbit transarterial wall oxygen gradient. *Ann Vasc Surg.* 1998; 12(5):418-23.
- 152 Yang BC, Phillips MI, Mohuczy D, Meng H et al. Increased angiotensin II type 1 receptor expression in hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18(9):1433-9.
- 153 Laal Jayakody, Manohara Senaratne, Alan Thomson, and Tissa Kappagoda. Endothelium-Dependent Relaxation in Experimental Atherosclerosis in the Rabbit. *Circ. Res.* 1987;60;251-264.
- 154 Catherine M. Lenich, Aram V. Chobanian et al. Effect of dietary cholesterol and alloxan-diabetes on tissue cholesterol and apolipoprotein E mRNA levels in the rabbit. *Journal of Lipid Research* 1991 Mar;32(3):431-8.
- 155 Miura D, Miura Y, Yagasaki K. Hypolipidemic action of dietary resveratrol, a phytoalexin in grapes and red wine, in hepatoma-bearing rats. *Life Sci.* 2003; 73(11):1393-400.
- 156 Rimando AM, Nagmani R, Feller DR, Yokoyama W. Pterostilbene, a new agonist for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha-isoform, lowers plasma lipoproteins and cholesterol in hypercholesterolemic hamsters. *J Agric Food Chem.* 2005; 4;53(9):3403-7.
- 157 Penumathsa SV, Thirunavukkarasu M, Koneru S, Juhasz B et al. Statin and resveratrol in combination induces cardioprotection against myocardial infarction in hypercholesterolemic rat. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; 42(3):508-516.
- 158 Wang Z, Zou J, Cao K, Hsieh TC et al. Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels. *Int J Mol Med.* 2005; 16(4):533-40.
- 159 Wilson T, Knight TJ, Beitz DC, Lewis DS et al. Resveratrol promotes atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Life Sci.* 1996; 59(1):PL15-21.
- 160 Hattori Y, Kawasaki H, Abe K, Kanno M. Superoxide dismutase recovers altered endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. *Am J Physiol;* 1991; 261:H1086–94.
- 161 Macovei L. Pleiotropic effects of therapy in endothelial dysfunction syndrome. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 2004; 108(1):17-22.
- 162 Qiang Shi, Jane F Vandenberg, Catherine Jett, Karen Rice, et al. Arterial endothelial dysfunction in baboons fed a high-cholesterol, high-fat diet. *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 82, No. 4, 751-759.
- 163 Kensey KR. The mechanistic relationships between hemorheological characteristics and cardiovascular disease. *Curr Med Res Opin.* 2003; 19(7):587-96.
- 164 Vane JR, Anggard EE, Botting RM: Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990; 323: 27–36.
- 165 Kang SY, Kim SH, Schini VB, Kim ND. Dietary ginsenosides improve endothelium-dependent relaxation in the thoracic aorta of hypercholesterolemic rabbit. *Gen Pharmacol;* 1995; 26:483–7.
- 166 Muller S, Konig I, Meyer W, Kojda G. Inhibition of vascular oxidative stress in hypercholesterolemia by eccentric isosorbide mononitrate. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 44(3):624-31.
- 167 Merkel LA, Rivera LM, Bilder GE, Perrone MH. Differential alteration of vascular reactivity in rabbit aorta with modest elevation of serum cholesterol. *Circ Res.* 1990; 67(3):550-5.
- 168 Zoltowska M, St-Louis J, Ziv E, Sicotte B et al. Vascular responses to alpha-adrenergic stimulation and depolarization are enhanced in insulin-resistant and diabetic Psammomys obesus. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003; 81(7):704-10.

- 169 Dupasquier CM, Weber AM, Ander BP, Rampersad PP, Steigerwald S et al. Effects of dietary flaxseed on vascular contractile function and atherosclerosis during prolonged hypercholesterolemia in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291(6):H2987-96.
- 170 Hadoke P, Wainwright CL, Wadsworth RM, Butler K et al. Characterization of the morphological and functional alterations in rabbit subclavian artery subjected to balloon angioplasty. *Coron Artery Dis.* 1995; 6(5):403-15.
- 171 Mercedes Sanz, Patricia Ganado, Teresa Tejerina. Two angiotensin AT1 receptor antagonists, irbesartan and losartan, effects in cholesterol-fed rabbits. *European Journal of Pharmacology* 2002; 442 99– 106.
- 172 Srinivas Ghatta and Poduri Ramarao. Increased contractile responses to 5-hydroxytryptamine and Angiotensin II in high fat diet fed rat thoracic aorta *Lipids Health Dis.*; 2004; 3: 19.
- 173 Dowell FJ, Hamilton CA, Reid JL. Effects of manipulation of dietary cholesterol on the function of the thoracic aorta from New Zealand white rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1996; 27(2):235-9.
- 174 Valérie Deckert, Linda Duverneuil, Sandrine Poupon, Serge Monier, et al. The impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by 7-ketocholesterol is associated with an early activation of protein kinase C. *British Journal of Pharmacology* 2002; 137, 655–662.
- 175 Du ZY, Woodman OL. The effect of hypercholesterolaemia and atherosclerosis on alphaadrenoceptor- mediated vasoconstriction in conscious rabbits and rabbit aorta. *Eur J Pharmacol.* 1992; 11;211(2):149-56.
- 176 Azadzo KM, Saenz de Tejada I. Hypercholesterolemia impairs endothelium-dependent relaxation of rabbit corpus cavernosum smooth muscle. *J Urol.* 1991; 146(1):238-40.
- 177 Moroe H, Fujii H, Honda H, Arai K et al. Characterization of endothelium-dependent relaxation and modulation by treatment with pioglitazone in the hypercholesterolemic rabbit renal artery. *Eur J Pharmacol.* 2004; 30;497(3):317-25.
- 178 Mercedes Sanz, Patricia Ganado, Emilio Ruiz and Teresa Tejerina Effect of trandolapril on vascular responsiveness in cholesterol-fed rabbit-isolated arteries. *European Journal of Pharmacology* 2000; Volume 397, Issues 2-3, 2 ; 359-365.
- 179 Rozsa Z, Pataricza J, Nemeth J, Papp JG. Differential efficacy of vasodilators in hypercholesterolaemic rabbits. *J Pharm Pharmacol.* 1998; 50(9):1035-44.
- 180 Miatello R, Vazquez M, Renna N, Cruzado M et al. Chronic administration of resveratrol prevents biochemical cardiovascular changes in fructose-fed rats. *Am J Hypertens.* 2005; 18(6):864-70.
- 181 Oubina MP, de las Heras N, Cediel E, Sanz-Rosa D et al. Synergistic effect of angiotensin-converting enzyme (ACE) and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase inhibition on inflammatory markers in atherosclerotic rabbits. *Clin Sci (Lond).* 2003;105(6):655-62.
- 182 Muller S, Konig I, Meyer W, Kojda G. *J Am Coll Cardiol.* Inhibition of vascular oxidative stress in hypercholesterolemia by eccentric isosorbide mononitrate. 2004; 4;44(3):624-31.
- 183 Tang FT, Qian ZY, Liu PQ, Zheng SG et al. Crocetin improves endothelium-dependent relaxation of thoracic aorta in hypercholesterolemic rabbit by increasing eNOS activity. *Biochem Pharmacol.* 2006 ; 72(5):558-65.
- 184 White CR, Parks DA, Patel RP, Shelton J, et al. L-Arginine inhibits xanthine oxidase-dependent endothelial dysfunction in hypercholesterolemia. *FEBS Lett.* 2004; 12;561(1-3):94-8.
- 185 J G, Cq W, Hh F, Hy D et al. Effects of resveratrol on endothelial progenitor cells and their contributions to reendothelialization in intima-injured rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006;47(5):711-21.
- 186 Xie D, Thompson MA, Pippen AM, Waters RE et al. Decreases in corporeal vascular endothelial growth factor expression precede vasoreactivity changes in cholesterol fed rabbits. *J Urol.* 2005;173(4):1418-22.
- 187 Seo KK, Yun HY, Kim H, Kim SC. Involvement of endothelial nitric oxide synthase in the impaired endothelium-dependent relaxation of cavernous smooth muscle in hypercholesterolemic rabbit. *J Androl.* 1999; 20(2):298-306.
- 188 Kim SC, Kim IK, Lee MY, Uhm DY. Relaxation responses of cavernous smooth muscles to vasodilators in impotent patients with hypercholesterolemia or hypertriglyceridemia. *Kor J Androl* 1995; 13: 95-101.
- 189 Araim O, Ballantyne J, Waterhouse AL, Sumpio BE. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation with red wine and red wine polyphenols. *J Vasc Surg.* 2002 Jun;35(6):1226-32.
- 190 Zou J, Huang Y, Cao K, Yang G et al. Effect of resveratrol on intimal hyperplasia after endothelial denudation in an experimental rabbit model. *Life Sci.* 2000 1;68(2):153-63.
- 191 Fisher DF Jr, Fry WJ. Collateral mesenteric circulation. *Surg Gynecol Obstet*; 1987; 164:487-92.

- 192 McCullough AR. The penis as a barometer of endothelial health. *Rev Urol.* 2003;5 Suppl 7:S3-8.
- 193 Safian RD, Textor SC. Renal-artery stenosis. *N Engl J Med* 2001;344:431-42.
- 194 Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP et al: Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1999; 103: 897–905.
- 195 Blair A, Shaul PW, Yuhanna IS, Conrad PA et al: Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *J Biol Chem* 1999; 274: 32512–32519.
- 196 Liu JC, Chen JJ, Chan P, Cheng CF et al. Inhibition of cyclic strain-induced endothelin-1 gene expression by resveratrol. *Hypertension.* 2003; 42(6):1198-205.
- 197 Olas B, Wachowicz B, Saluk-Juszczak J, Zielinski Tat al. A. Antioxidant activity of resveratrol in endotoxin-stimulated blood platelets. *Cell Biol Toxicol.* 2001;17(2):117-25.
- 198 Simonini G, Pignone A, Generini S, Falcini Fat al. Emerging potentials for an antioxidant therapy as a new approach to the treatment of systemic sclerosis. *Toxicology.* 2000; 30;155(1-3):1-15.
- 199 Chiou WF, Lin LC, Chen CF. Acteoside protects endothelial cells against free radical-induced oxidative stress. *J Pharm Pharmacol.* Jun 2004;56(6):743-8.
- 200 Fukuda S, Kaga S, Zhan L, Bagchi D et al. Resveratrol ameliorates myocardial damage by inducing vascular endothelial growth factor-angiogenesis and tyrosine kinase receptor Flk-1. *Cell Biochem Biophys.* 2006;44(1):43-9.
- 201 Wallerath T, Li H, Godtel-Ambrust U, Schwarz P et al. A blend of polyphenolic compounds explains the stimulatory effect of red wine on human endothelial NO synthase. *Nitric Oxide.* 2005; 12(2):97-104.
- 202 Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H et al. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2003; 25;107(11):e78-9.
- 203 Liu ZP, Song Y, Liu ZQ, Zhang XP. Preventive effect of trans-resveratrol on hypertension-induced cardiac hypertrophy in partially nephrectomized rats. *Wei Sheng Yan Jiu.* Nov 2005;34(6):756-8.
- 204 Liu Z, Song Y, Zhang X, Liu Z et al. Effects of trans-resveratrol on hypertension-induced cardiac hypertrophy using the partially nephrectomized rat model. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* Dec 2005;32(12):1049-54.
- 205 Faoconneau B., Waffo-Teguo P., Huguet f., Barrier Lat et al. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from vitis vinifera cell cultures using invitro tests. *Life sciences.*: 1997; 61: 2103-2110.
- 206 Fulgenzi A., Berteli AAE., Magni E., Ferrero E et al. In vivo inhibition of TNF-alpha induced vascular permeability by resveratrol. *Transp. Proceedings.* 2001; 33:2341-2343.
- 207 Mark J., Duncan J. Effects of trans-resveratrol on copper dependent hydroxyl radical formation and DNA damage: evidence for hydroxyl radical scavenging and a novel, glutathione sparing mechanism of action. *Archives of Biochem. And Biophys.* 381: 253-263. 2000.
- 208 Belguendouz L., Fremont L., Linard A. Resveratrol inhibits metal ion dependent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. *Biochemical Pharmacol.* 1997; 53: 1347-1355.
- 209 Ou HC, Chou FP, Sheen HM, Lin TM et al. Resveratrol, a polyphenolic compound in red wine, protects against oxidized LDL-induced cytotoxicity in endothelial cells. *Clin Chim Acta.* 2006; 364(1-2):196-204.
- 210 Knight BL. ATP-binding cassette transporter A1: regulation of cholesterol efflux. *Biochem Soc Trans.* 32(Pt 1): 2004; 124-7.
- 211 Sevov M, Elfineh L, Cavalier LB. Resveratrol regulates the expression of LXR-alpha in human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 29;348(3):1047-54.
- 212 Y. Xu, R.H. Henning, J.J.L. van der Want, A. van Buiten, W.H. van Gilst, H. Buikema. Disruption of endothelial caveolae is associated with impairment of both NO as well as EDHF in acetylcholine-induced relaxation depending on their relative contribution in different vascular beds. *Life Sciences* 2007; 80: 1678–1685.