

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANA BİLİM DALI

**ALLOKSAN İLE DİYABET OLUŞTURULMUŞ
TAVŞANLARDA RESVERATROLÜN ENDOTEL
FONKSİYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz.M.Bilgehan PEKTAŞ

Tez Yöneticisi

Prof. Dr. Fatma AKAR

ANKARA
Ocak 2008

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANA BİLİM DALI

**ALLOKSAN İLE DİYABET OLUŞTURULMUŞ
TAVŞANLARDA RESVERATROLÜN ENDOTEL
FONKSİYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. M. Bilgehan PEKTAŞ

Tez Yöneticisi

Prof.Dr. Fatma AKAR

Bu tez TÜBİTAK tarafından 105S431 proje numarası ile desteklenmiştir

ANKARA
Ocak 2008

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	I
İÇİNDEKİLER	II
KISALTMALAR VE TABLOLAR	III
1. GİRİŞ	8
2. GENEL BİLGİLER	9
2.A. RESVERATROL	10
2.A.1. FRANSIZ PARADOKSU	10
2.A.2. RESVERATROLÜN ETKİNLİĞİ	10
2.A.3. RESVERATROLÜN SENTEZİ	11
2.A.4. NO SENTAZ, AKTİVASYONU VE BİYOSENTEZİ	13
2.A.5. RESVERATROLÜN FARMAKOKİNETİĞİ	14
2.B. DIABETES MELLITUS	15
2.B.1. DIABETES MELLITUS TANIMI VE SINIFLANDIRILMASI	15
2.B.2. ENDOTEL VE DİYABET	17
3. MATERYELVE YÖNTEM	19
3.A. MATERYEL	19
3.A.1. DENEY HAYVANLARI	19
3.A.2. KİMYASAL MADDELER VE HAZIRLANMALARI	22
3.A.3. ARAÇ VE GEREÇLER	23
3.B. YÖNTEM	24
3.B.1. DENEY PROTOKOLÜ	25
3.B.2. İSTATİKSEL ANALİZ	26
4. SONUÇLAR	28
5. TARTIŞMA	47
6. ÖZET	50
7. SUMMARY	51
8. KAYNAKLAR	52
9. ÖZGEÇMİŞ	60

KISALTMALAR VE TABLOLAR

LDL	:	Düşük Dansiteli Lipoprotein
HDL	:	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
NO	:	Nitrik Oksit
NOS	:	Nitrik oksit sentaz
SOD	:	Süper oksit dismütaz
L-NO ARG	:	L-NG-Nitroarjinin
TABLO 1	:	Deneylerde kullanılan tavşan grupları
TABLO 2	:	Deney gruplarına ait ağırlık, kan şekeri ve içilen su miktarları

1. GİRİŞ

Çağımızın hastalıkları içerisinde halen çözüm bekleyenlerin başında kuşkusuz kardiyovasküler hastalıklar gelmektedir. Gerek yaşam kalitesini azaltması, gerekse iş gücü kaybı ve sağlık giderleri gibi topluma verdiği zararlar dikkate alındığında araştırmaların bu alanda yoğunlaşması kaçınılmazdır. Teknoloji ile birlikte değişen yaşam tarzı ve buna bağlı olarak da düşük fiziksel etkinlik, sağlıksız beslenme ve bunun sonucu ortaya çıkan obezite ile diyabet günümüzün en önemli sağlık sorunları arasında bulunmaktadır. Diyabetin, kardiyovasküler sistem hastalıkları ile ilişkisi ve hastalığın etiyolojisi günümüzde araştırmaların yoğunlaştığı bir alan olmakla beraber, tedaviye yönelik tam bir başarı henüz sağlanamamıştır.

Kardiyovasküler sistem hastalıklarının tedavisi için çözüm arayışları sürerken, özellikle kırmızı et ve doymuş yağ asitlerinden zengin diyetle beslenen Güney Fransa halkında, kardiyovasküler sistem hastalıklarına yakalanma ve bu hastalıklara bağlı mortalite oranının, benzer beslenme özelliği gösteren diğer ülkelere oranla daha az olması oldukça ilginç bulunmuştur. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, Fransız toplumundaki düzenli şarap tüketimi geleneğinden dolayı kardiyovasküler hastalıklara yakalanma oranının düşmüş olabileceği varsayımını ortaya koymuştur. Deney hayvanlarına kırmızı şarap ekstraktları ve bileşenleri verilerek yapılan çalışmalar bu varsayımın doğruluğunu desteklemektedir.

İçerisinde birçok biyoaktif bileşik bulunan şaraptaki kimyasallardan, en çok resveratrol üzerinde araştırmalar yoğunlaşmıştır. Üzüm çekirdeği ve kabuğunda yoğun olarak bulunan resveratrolün kırmızı şarapta beyaz şaraba oranla daha yüksek konsantrasyonda bulunmasının sebebi, kırmızı şarabın maserasyonunda üzüm kabuğunun da kullanılmasıdır. Yapılan araştırmalar sonucu doğal bir antioksidan olarak bilinen resveratrolün trombosit agregasyonunu ve lökosit adezyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Ayrıca endotel hücrelerinden salınan vazodilatör faktör nitrik oksit salınımını artırıcı etki göstererek endotel fonksiyonlarını iyileştirdiği bildirilmiştir.

Bu çalışmada alloksan uygulaması ile diyabet oluşturulmuş tavşanların bir kısmına, 8 hafta boyunca içme suyu içerisinde 5 ve 50 mg/kg resveratrol içirilerek damarların vazokonstriktör bileşik fenilefrin ile vazodilatör bileşik asetilkoline cevapları incelenmiştir. Böylece, diyabetik tavşanlara resveratrolün iki farklı konsantrasyonda verilmesi sonucunda vasküler fonksiyonda bir değişiklik oluşturup-oluşturmadığı incelenmiş olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Gelişmiş ve gelişmekte olan toplumlarda metabolik sendrom ve diabetes mellitus'un görülme sıklığı hızla artmaktadır. Yeterli insülin salgılanmaması sonucu tip I diyabet ya da insüline cevaplılık azalması sonucu ortaya çıkan tip II diyabet, kardiyovasküler komplikasyonlarla birlikte seyreden metabolik bir hastalıktır. Bu sebeplerden dolayı hem dünya genelinde hem de Türkiye'de diyabetle ilgili pek çok çalışma yapılmaktadır. Bu güne kadar diyabetli insanlar ve hayvanlarda yapılan çalışmalar, damarların endotel hücre fonksiyonundaki azalmanın, kardiyovasküler komplikasyonların ortaya çıkmasının asıl nedeni olarak göstermiştir. Arterlerin endotel hücrelerinde sentezlenen nitrik oksidin, reaktif oksijen türlerinin artmasıyla biyoyararlanımının azaldığı bunun sonucu olarak da dokuların oksijenasyonunun giderek bozulduğu bilinmektedir. Damarların endotel fonksiyonunu düzeltmek için antioksidan tedavi de dahil pek çok yöntem denenmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, orta dereceli kırmızı şarap tüketiminin kalp-damar hastalıklarına bağlı ölüm insidansını azalttığını göstermektedir. Kırmızı şarabın içinde biyoaktif pek çok flavonoid ve antosiyanin türü bileşik bulunmaktadır. Bu maddelerden üzerinde en çok araştırma yapılan, bir polifenolik bileşik olan resveratroidir.

2.A. RESVERATROL

Resveratrol yakın zaman içerisinde kardiyovasküler hastalıklara karşı olumlu etkileri açısından sıralanırsa, kuşkusuz en popüler bileşikler arasında yerini alır. Biyolojik deneylerde resveratrolün nitrik oksit sentaz(NOS) ve antioksidan kapasiteyi arttırdığı, oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir. Resveratrol bu etkileriyle sağlığın sürdürülmesi açısından oldukça yararlı etkiler taşımaktadır²⁰. Resveratrol kırmızı şarabın içerisinde yüksek oranda bulunan, üzüm çekirdeği, üzüm kabuğu ve yer fıstığı gibi birçok bitki ekstresinden elde edilen polifenolik yapıda bir bileşiktir. Resveratrol ilk olarak Polygonum Cuspidatum bitkisinde tespit edilmiştir.²⁰

2.A.1. Fransız Paradoksu

Fransızların fazla tereyağı ve domuzyağı tüketmelerine rağmen kardiyovasküler hastalıklardan ölüm oranı daha düşüktür. Bu çelişkili durum “Fransız Paradoksu” olarak bilinmektedir.²¹

Fransızlar, diğer batı toplumlarından daha fazla şarap tüketmektedirler. Gerçekte fazla miktarda ve uzun süre etil alkolün başta sinir sistemi olmak üzere pek çok organ ve dokuda toksik etkilerinin olduğu bilinmektedir. Bu zararların bir kısmı etil alkolün oksidatif stresi artırarak, serbest oksijen radikali ve lipid peroksidasyonuna sebep olmasına bağlıdır. Etil alkol hakkındaki bu bilimsel gerçeklere rağmen Fransız Paradoksu’nun nedeni olarak orta derecede kırmızı şarap tüketimi gösterilmiştir.²¹

2.A.2. Resveratrolün Biyolojik Etkileri

Kırmızı şarabın polifenolik ekstraktları kullanılarak yapılan çalışmalar, endotel bağımlı gevşeme cevaplarının ve NOS aktivitesinin arttığı, trombosit agregasyonunun inhibe olduğu, lökosit adezyonunun engellendiği ve düşük dansiteli lipoprotein’ in (LDL) oksidasyonunun önlenmesine dikkat çekmektedir.² Kırmızı şarabın polifenolik bileşenlerinden resveratrolün de benzer etkilere sahip olması, onun kalp damar hastalıkları üzerindeki yararlı etkilerinin resveratrol ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Epidemiyolojik çalışmalar kırmızı şarap tüketen toplumlarda kalp damar hastalıkları görülme sıklığının daha düşük olduğunu göstermektedir²⁰.

Resveratrolün LDL oksidasyonunu önleyici etkisinin, esas olarak bakırla şelasyon sonucu ortaya çıkan serbest radikal süpürücü etkiden kaynaklandığı anlaşılmıştır.⁵⁶

Resveratrolün 1-100 µmol/L konsantrasyonlarda sıçan aortası,²⁶ domuz koroner arteri,²⁷ sıçan ve kobay mezenterik arterleri²⁸, insan safen ven ve internal meme arterinde³⁰ hem endotel bağımlı ve hem de endotel bağımsız gevşetici etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalarda endotel bağımlı gevşetici etkisinin NO aracılıklı olduğu saptanmıştır.

Resveratrol 2-4 mg/kg miktarlarda intragastrik olarak 5 hafta boyunca verildiğinde endotel kazınması sonucu ortaya çıkan intimal hiperplaziyi belirgin olarak zayıflatmaktadır.³¹

25mg/mL resveratrolün içme suyu içinde 15 gün boyunca sıçanlara verilmesi sonucunda, Langendorf perfüze sıçan kalplerindeki iskemi-reperfüzyon hasarının belirgin olarak azaldığı rapor edilmiştir. Bu koruyucu etkinin, kısmen nitrik oksit sentezindeki artışa bağlı olarak ortaya çıktığı ileri sürülmüştür.²

İçme suları içinde 21 gün boyunca 50mg/L resveratrol içen dişi ve erkek sıçanların torasik aortalarında yapılan vasküler çalışmalarda fenilefrin ve angiotensin II ile oluşan kontraksiyonların azaldığı asetilkolin ile oluşan gevşemelerin ise belirgin biçimde arttığı gösterilmiştir.³²

Streptozotosin ile insülin bağımlı diyabet oluşturulmuş ve nikotinamid ile insülin-bağımsız diyabet oluşturulmuş sıçanlara gastrik sonda ile 7 gün boyunca günde 3 kez 3mg/kg dozda verilen resveratrolün etkileri incelenmiştir. Resveratrol tedavisinin soleus kasındaki glukoz taşıyıcılarından GLU4 ekspresyonunu artırdığı ve karaciğerde glikoneogeneziste hız kısıtlayıcı enzimin ekspresyonunu azalttığı saptanmıştır. Ayrıca her iki yöntemle diyabet yapılmış sıçanlara 0.05-10 mg/kg dozda resveratrol verilmesinden 90 dakika sonra kan glukoz düzeylerinin anlamlı ölçüde düştüğü ve insülin düzeylerinin yükseldiği saptanmıştır.⁴⁶

Streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş sıçanların aortalarından izole edilen düz kas hücreleri 24 saat sitokin maruziyetine bırakıldıktan sonra iNOS protein ekspresyonu ölçülmüştür. Hücre kültür ortamına resveratrol (0.1-100 mM) eklenmesinden sonra iNOS protein ekspresyonunun daha da arttığı görülmüştür. Fakat en yüksek resveratrol dozu ile kontrol aortadaki protein düzeyinde azalma olurken, diyabetik sıçanların hücrelerinde artma devam etmiştir. Selektif estrogen antagonisti ICI 182,780 resveratrolün iNOS üzerindeki etkisini geri çevirmiştir.³³

Sprague Dawley sıçanlar üzerinde yapılan bir başka çalışmada içme suyu içinde 45 gün boyunca % 10 fruktoz verilmesi sonrasında kan basıncı, damarda eNOS aktivitesi ve kanda thiobarbitürik asid düzeyleri ölçülmüştür. Resveratrol (10 mg/kg/ gün) tedavisinin fruktozla yükselen kan basıncını düşürdüğü ve eNOS protein aktivitesini artırdığı saptanmıştır.⁴⁷

Bir başka araştırmada, resveratrol (3 mg/kg i.p.) uygulamasının kontrol sıçanlarda insülin sekresyonunun artışına bağlı olarak plazma glukoz düzeyini azalttığı fakat streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş hayvanlarda bu değerleri değiştirmedeği görülmüştür. Resveratrolün, kontrol sıçanların pankreas beta hücrelerinde K_{ATP} and K_V kanallarını inhibe ederek insülin salınımını artırarak kan glukoz düzeyini azalttığı gösterilmiştir.³⁴

İnsanlar üzerinde yapılan bir çalışmada miyokard infarktüsü ve diyabeti olan 1050 kişiye günde yiyeceklerle birlikte 118 ml kırmızı şarap verilmiştir. Sonuçlar, kırmızı şarap alan grupta inflamatuvar sitokinlerin ve oksidatif stresin azaldığını göstermiştir. Bu uygulamanın, hastaların sağkalım oranının artırabileceği öngörülmüştür.⁴⁸

2.A.3. Resveratrolün Sentezi

Resveratrol, 3,4',5 trihidroksisistilben yapısında olup(sentetik estrogen), trans ve cis izomeri olmak üzere 2 izomeri vardır.²

Trans izomerlerinin biyolojik aktivitelerinin cis izomerlerine göre daha yüksek olduğu saptanmıştır.²²

Trans resveratrol yapı olarak dietilstilbesterol' e ve 17 β -estradiol' e benzemekte olup miksestrojenik, agonist/antagonist, özelliklere sahiptir.²³

Resveratrolün biyosentezi fenilalanin ile başlar, deamilasyon ile sinnamik asit oluşur. 4-kumarik asit ile yükseltgenen sinnamik asit 4-kumaril KO-A ile estere döner ve stilben sentaz enzimi aracılığı ile biyosentezi tamamlanır.²⁰

2.A.4. Resveratrolün Farmakokinetiği

Yapılan analizler sonucu resveratrolün metabolizasyonunun çok hızlı olması nedeniyle biyoyararlanımının çok düşük olduğu tespit edilmiştir. Resveratrolün intravenöz yada oral yolla verilmesiyle plazmada fazla bulunmadığı, kısa sürede bazal seviyeye indiği rapor edilmiştir. Cis-resveratrolün trans-resveratrole göre 5–10 kat daha hızlı yıkıma uğradığı tespit edilmiştir. Wistar sıçanlarında yapılan in-vivo bir çalışmada sıçanların midesine 170 µci/ml trans-resveratrol enjekte edilmiş ve enjeksiyondan sonra 24 saat boyunca kan-plazma, idrar, örnekleri toplanmış, ayrıca kalp, böbrek ve karaciğerden alınan dokularda analiz edilmiştir. Sonuç olarak trans-resveratrol plazmada 15 dakika içinde maksimum konsantrasyona ulaştığı, karaciğer, böbrek ve kalpte ise uygulanan dozun %1'inin altında olduğu tespit edilmiştir.⁴⁹

Bir başka çalışmada ise sıçanlara gastrik entübasyonla 86µg/kg resveratrol uygulanmış ve resveratrolün kan ve çeşitli dokulardaki miktarları ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları, plazmada 20.2 ng/ml, karaciğerde 20.7 ng/g, kalpte 2.2 ng/g ve böbrekte 20 ng/g konsantrasyonlarında resveratrol bulunduğunu göstermiştir. Bu çalışmada ayrıca, sıçanlara 15 gün boyunca 43 µg/kg dozunda resveratrol uygulanmış ve sonuçta plazmada 7.6 ng/ml, karaciğerde 53.5 ng/g, kalpte 3.1 ng/g ve böbrekte 44.1 ng/g konsantrasyonlarında resveratrol bulunduğu gösterilmiştir.⁴⁹

Gönüllü, sağlıklı kişilerde yapılan bir çalışmada resveratrol 25 mg/70kg (360 µg/kg) dozunda içecekler içinde (bu doz normal şarap içimiyle alınabilecek resveratrolün 20 katı) gönüllülere uygulanmıştır.⁸⁵ Gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi yöntemi kullanılarak yapılan ölçümlerde, alımdan 30 dk sonra resveratrolün plazma doruk konsantrasyonu 40nM olduğu bulunmuştur. Şaraptaki ortalama resveratrol miktarı yaklaşık 1-5 mg/L'dir. Ortalama şarap tüketimiyle 70 kg ağırlığındaki bir birey günde 250 ml şarap içerse alınan resveratrol miktarı yaklaşık 18/µg/kg/gün olarak hesap edilmektedir.⁸ Sağlıklı gönüllüler üzerinde yapılan bir çalışmada da [¹⁴C] işaretli 25 mg resveratrolün ağız yolundan ve 0.2 mg intravenöz olarak verilmesinden sonra resveratrol ve metabolitlerinin plazmadaki doruk düzeyleri 2µM olarak bulunmuştur.⁵¹

2.A.5. Nitrik Oksit Sentaz Aktivasyonu ve Biyosentezi

Nitrik oksit (NO) ilk olarak 1979 yılında Furchgott ve Zawadzski adlı araştırmacılar tarafından bulunmuştur. İlk olarak, endotel bağımlı gevşetici faktör (EDRF) olarak farkedilen bu vazodilatör ajan, son derece dayanıksız olup, serbest oksijen radikalleri tarafından hızlı bir şekilde inaktive edilmektedir. Süperoksit radikallerini temizleyen süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan bileşikler onun yarı ömrünü uzatmaktadır. 1987 yılında NO' nun EDRF' nin biyolojik etkilerinden sorumlu molekül olduğu ileri sürülmüştür. Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi varlığında L-Arjinin substratı ve tetrahidrobiopterin kofaktörü ile sentezi gerçekleşir. Endotelde eNOS, nöronlarda nNOS, ve makrofajlar, lökositler gibi tüm çekirdekli hücrelerde bulunan iNOS olmak üzere 3 formu vardır. Bu formlardan eNOS ve nNOS Ca^{+2} 'nin kalmodoline bağlanması ile aktive olurken, iNOS bakteriyel toksinlerle aktive olur. NO lipid ortamda iyi çözünürken sulu çözeltilerde kısmen çözünür. Böylelikle hücre çevresine rahatlıkla yayılır. Yüksek miktarda NO oksijenli bileşiklerle peroksinitrit ve nitrojen dioksit gibi toksik metabolitlere dönüşebilir. NO ayrıca nitrozamine dönüşerek nükleik asitleri modifiye ettiği ve kansere neden olduğu bildirilmiştir. Glutasyon bu toksisiteyi azaltır. Bir kısım NO' da eritrositlerin içerisinde hemoglobine bağlanarak nitrit ve nitratlara dönüşerek dışarı atılırlar.

Endotel hücreleri tarafından L-arjininden sentezlenen NO başta damar tonüsünün ayarlamasının yanı sıra damar düz kas hücrelerinin poliferasyonunu da önlediği yapılan in vitro çalışmalar sonucu ortaya çıkmıştır. Plazma içerisinde ise trombositlerin agregasyonunu önleyen NO, ayrıca kümelenmiş trombositler üzerinde de disagregan özelliği taşır. Endotel kökenli iki ürün olan prostasiklin(PGI_2) ve NO birbirlerinin antiagregan etkilerini artırır. Lökosit adezyonunu da önlediği belirtilen NO, serbest radikal oluşumunu inhibe ederek, vazorelaksasyon sağlar. Bu özelliği ile başta ateroskleroz olmak üzere vasküler sistem hastalıklarına karşı etkinlik gösterdiği kabul edilmektedir.

Damar endotelinde NO inhibisyonu NO substratı olan L-Arjininin analoglarıyla sağlanır. Bunlar arasında aminoguanidin, L-Nitroarjinin, N-Monometilarjinin (L-NMMA), L-Nitroarjinin metil ester (L-NAME), klinik çalışmalarda NO' nun rolünü anlamak için kullanılan temel inhibitörlerdir.²⁴

2.B. DİYABET

Karakteristik özelliklerine M.Ö. 1500 yılından kalma belgelerde (Ebers Papirüsleri) bile rastlanan diabetes mellitus için bugünkü tanım, kronik hiperglisemi ile seyreden, etyolojisi değişik bir dizi metabolik bozukluktur. İnsülin salınımındaki veya etkisindeki bazen de her ikisindeki bozukluk kandaki glukoz, konsantrasyonunun normalden yüksek değerlerde seyretmesine, karbonhidrat, yağ, protein metabolizması bozukluklarına ve sonuçta da uzun dönemde, vücudun çeşitli organ ve sistemlerinde hasarlar, işlev bozuklukları ve yetersizliklere neden olmaktadır. Radikal bir tedavisi bulunmayan diyabet, tedavi maliyeti yüksek, sürekli doktor kontrolü gerektiren, çoğu zaman hastaların kardiyovasküler komplikasyonlardan kaybedildiği bir hastalıktır. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde diyabet hızlı bir yayılım eğilimi göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, Türk Toplumu'nda 1990 yılından bugüne diyabetin erkeklerde %13, kadınlarda %27 oranında arttığı sonucu çıkmıştır. Bunun sebebi olarak, obeziteye eğilim, fiziksel aktivitede azalma ve sigara içimindeki artma görülmekle birlikte toplumumuzdaki diyabet hastalığı sıklığının erkeklerde %4,5 ve kadınlarda %7,3 oranında olduğu saptanmıştır. Konuyla ilgili yapılan çalışmalarla, diyabetin kardiyovasküler hastalıklardan anjina pectoris, akut myokard infarktüsü ve ateroskleroza hızlandıran bir durum olduğu açıkça ortaya konulmuştur. Diyabet, ateroskleroz, hipertansiyon, koroner kalp hastalığı ve yaşlanma gibi fizyopatolojik durumlarda oksidatif stress artışından dolayı, damar endotel fonksiyonunun zayıfladığı, damar düz kas cevaplılığının değiştiği bildirilmiştir.

2.B.1. Diyabetin Tanımı Ve Sınıflandırılması

Diyabet günümüzde çok sık görülen kronik, progressif seyir izleyen, bir metabolizma hastalığıdır. Diyabet kronik hiperglisemi sonucu gözlerde, böbreklerde, sinirlerde, kalpte ve kan-damar sisteminde kronik komplikasyonlara yol açar, bu organların fonksiyonlarını bozar ve sakatlıklara yol açabilen bir hastalıktır.

Tip I Diyabet

Mutlak insülin eksikliğine neden olan beta hücresi harabiyetiyle seyreden şeklidir.

a) İmmün Kökenli Diyabet

Tüm diyabetin %5-10'u arasındakileri oluşturan diyabet tipidir. Daha önce insüline bağımlı diyabet olarak adlandırılmış olan bu diyabet şekli pankreas beta hücrelerinin otoimmün olay sonucu harabiyetinden ortaya çıkmaktadır.²⁹

b) İdyopatik Tip Diyabet

Tip I diyabet tanısı konan olguların bir kısmında hiçbir etiyoloji tanımlanamaz ve otoimmün belirteçler negatiftir. Bu olguların bir kısmında mutlak insülin eksikliği ve ketoasidoza eğilim görülür. Tip I diyabetli hastaları çok az bir kısmı bu kategoriye uymaktadır ve bunlar Asya ve Afrika kökenli insanlardır.²⁹

Tip II Diyabet

Tip II diyabet heterojen bir hastalıktır. Karaciğer, kas ve adipöz dokuda insülin duyarlılığının azalması ve beta hücre fonksiyon bozukluğu ile karakterizedir. Genetik olarak planlanmış bir beta hücreleri disfonksiyonuna periferde meydana gelen insülin direncinin yanı sıra yetersiz egzersiz, obezite gibi çevresel faktörlerde Tip II diyabetin tetikleyici nedenleridir.³⁵

2.B.2. Endotel Ve Diyabet

Çeşitli deneysel diyabetik hayvan modelleri ve diyabetik hastaların damarlarında yapılan çalışmalarda endotel bağımlı gevşeme cevaplarının azaldığı gösterilmiştir.³⁶ Endotel cevaplarındaki bu azalmanın nedeni henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Damar dokusunda serbest oksijen radikallerinin oluşumunun arttığı buna karşılık antioksidan aktivitenin azaldığı ve giderek endotel kaynaklı nitrik oksit (NO) ve prostasiklin oluşumunun zayıfladığı kabul edilmektedir.³⁷ Diyabetik arterlerde endoteliyal nitrik oksit sentaz (eNOS) ekspresyonunun azaldığı³⁸ fakat bazı çalışmalarda protein eNOS ekspresyonunda bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir³⁹. Tersine bazı çalışmalarda diyabetik arterlerde eNOS ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir⁴⁰.

Streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda, eNOS ekspresyonundaki artış diyabet ile tetiklenen oksidatif stresin yarattığı endotel fonksiyon bozukluğuna karşı, diyabetik damarlarda kompensatuvar bir mekanizma sistemini uyarılmasına bağlanmıştır⁴⁰. Nitrik oksit sentaz ekspresyonundaki bu farklılığın sebebi, hastalığın süresi ve deneysel modellerdeki farklılıklarla açıklanmıştır.³⁷ Genelde nitrik oksit fonksiyonunun ve eNOS gen ekspresyonunun erken dönemde arttığı, ikinci basamakta normalize olduğu ve üçüncü basamakta da azaldığı yönünde sonuçlar bulunmaktadır.⁴¹

Sıçanlarda, endotel hücre tabakasının uzaklaştırılması ya da nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörü L-NAME tedavisinin, diyabetik arterlerde süper oksit anyon oluşumunu azalttığı ve aşırı oksijen radikal oluşumunun NOS kaynaklı olduğu bildirilmiştir.³⁷ NOS kenetsizlenmesi (uncoupling) adı verilen bu olayın, L-arjinin ve/ya da tetrahidrobiopterin bağımlı yollarda bu maddelerin eksikliğine bağımlı olabileceği düşünülmektedir.

Gerçekten, NOS kofaktörü olarak çalışan tetrahidrobiopterin oksidasyonunun, diyabetik hayvan modellerindeki arterlerde arttığı ve bunun sonucunda NAD(P)H oksidaz aktivitesinin yükseldiği ve sonuçta serbest oksijen radikallerinin oluşumunun hızlandığı gösterilmiştir.⁴² Bununla birlikte NOS'un serbest oksijen radikallerinin oluşumunu tetikleme mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. NAD(P)H Oksidaz sisteminin endotel fonksiyon bozukluğu oluşumunda kritik bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bu enzimin aktivitesindeki artışın çeşitli patolojik durumlarda damar endotel ve düz kas hücrelerinde süperoksit oluşumunu hızlandırdığı kabul edilmektedir.⁴³

Yüksek doz glikoza maruziyet sonucu azalan endotel bağımlı gevşeme cevaplarının aynı anda yapılan süperoksid dismutaz (SOD)⁴⁴ L-arjinin⁴⁵ ve indometazin inkübasyonu ile düzeldiği gösterilmiştir. İnsanlarda yapılan bir çalışmada Vitamin E desteğiyle endotel hücre fonksiyon bozukluğunda belirgin düzelme olduğu saptanmıştır. Antioksidanlarla kronik tedavinin glikoz homeostazisini değiştirmeden, muhtemel protein glikasyonlarını module ederek reaktif oksijen aracılı yolakları bloke edip endotel fonksiyonunu koruduğu öngörülmektedir.³⁹ Diyabetik sıçan aortasında uzun süreli diyabete bağlı olarak Mn-SOD gen ekspresyonunun kademeli olarak azaldığı saptanmıştır.³⁹ Diyabetle ilgili endotel fonksiyon bozukluğunun hücresel ve moleküler mekanizmasını inceleyen araştırmalar, eNOS ekspresyonu ya da NO biyoyararlanımının bozulduğu NO'nun oksijen radikalleriyle parçalanmasının arttığı ve de reaktif oksijen/nitrojen türlerinin oluşumu oranında bir dengesizlik sonucu damarın mikro çevresinin homeostazisinin değiştiğini ileri sürmektedir.³⁷

Diyabetle ilgili deneylerde tip I diyabet modeli esas alınır. Bu çalışmalar içerisinde deney hayvanlarında insülin sentezinden sorumlu pankreas β hücrelerinin tahrip edilerek insülin sentezinin ve salınımının inhibe edilmesi amaçlanır. Bu yöntem için alloksan, streptozosin gibi sitotoksik moleküller kullanılır, yada belirli çalışmalarda pankreatektomi yöntemi ile pankreasın çıkarılması da öngörülebilmektedir.

Diyabetle ilgili bir çalışmada kullanılan Wistar tavşanlarına intravenöz yolla, 42 mg/kg alloksan verilmiş ve hayvanlar diyabet yapılmıştır.⁵⁷

Diyabetin kalp kası üzerinde etkisinin incelendiği başka bir çalışmada ise kullanılan dişi Wistar sıçanlarına intravenöz yolla 45 mg/kg sodyum sitrat tamponu içerisinde çözünmüş streptozosin verilerek diyabet oluşturulmuştur.⁵⁸

Sıçanlar üzerinde yapılan diğer bir deneyde streptozosin salin içerisinde çözülerek intraperitoneal yolla 42.5 mg/kg verilmiş, ve 4-8 hafta süre içerisinde diyabet sağlanmıştır.⁵²

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3. A.1. Kullanılan Deney Hayvanları

Bu çalışmanın deneysel protokolü Gazi Üniversitesi Hayvan Etik Komitesinin, G.Ü. ET-05.047 kararı ile onaylanmıştır. Deneylerde 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyodunda (21 – 24°C) sıcaklık kontrolüyle senkronize edilmiş 2100-2350 g ağırlığında erkek Yeni Zellanda Tavşanları kullanılmıştır. Tavşanlar, Hıfzıssıha Enstitüsü Deney Hayvanları Üretim ve Satış Merkezi ile özel üretim çiftliklerinden sağlanmıştır. Hayvanlara standart yem verilmiştir. İçme suyu olarak kontrol gruplarına ve sadece diyabet yapılması planlanan tavşanlara çeşme suyu, diğer gruplara ise deney protokolünde belirtilen oranlarda resveratrol ilave edilmiş çeşme suyu 8 hafta boyunca içirilmiştir. Resveratrolün ışıktan bozunmasını önlemek için şişeler alüminyum folyo ile sarılarak ışık geçirilmesi engellenmiştir.

Tablo 1. Deneylerde kullanılan tavşan grupları

GRUPLAR	ÖZELLİKLERİ
KONTROL	sadece çeşme suyu içen
RESVERATROL KONTROL	çeşme suyu içinde 50 mg/ kg resveratrol verilen
AYNI ANDA RESVERATROL ALAN DİYABETİK	100 mg /kg alloksan ile birlikte 50 mg/L resveratrol verilen
ÖNCE DEN RESVERATROL ALAN DİYABETİK	100 mg/kg alloksan' dan 15 gün önce 50 mg/L resveratrol verilen
DÜŞÜK DOZ RESVERATROL ALAN DİYABETİK	100 mg/kg alloksan' dan 15 gün önce 5 mg/L resveratrol verilen
DİYABETİK	100 mg /kg alloksan

*** Not** : Çalışmalar Gazi Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu İzni alınarak gerçekleştirilmiştir.

Diyabet, steril izotonik NaCl çözeltisi içinde çözdürülen 100 mg/kg allokstanın kulak veninden enjeksiyonu ile oluşturulmuştur. Bu uygulamadan 3,5 ve 15 gün sonrasında hayvanların kulak veni kanatılarak ve Accu-Chek (Roche) cihazı kullanılarak kan şekeri ölçümü yapılmıştır. Kan şekeri 250 mg/dl üzerinde ölçülen tavşanlar diyabetik olarak değerlendirilmişlerdir. Resveratrol (5 ve 50 mg/L) 0.05% etil alkol ile çözülerek tavşanların içme sularına karıştırılmıştır. Resveratrol içeren su şişeleri ışık geçirmez malzeme ile kaplanmıştır. Hayvanlar standart yem ile beslenmiş ve içebildikleri kadar su içmelerine izin verilmiştir. Diyabetik tavşanların içme kaplarındaki su, sabah-akşam kontrol edilmiştir. Ön deneylerde diyabet oluşturma süresi 8 hafta olarak belirlenmiştir.

Tavşanlar, sodyum tiyopental (% 2 i.v.) enjeksiyonu ile anesteziye edildikten sonra kan ve doku örnekleri toplanmıştır.

3.A.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Hazırlanmaları

İzole Organ Banyosu Deneylerinde Kullanılan Kimyasallar

Fenilefrin (Sigma), Asetilkolin Klorür (Sigma), Potasyum Klorür (Sigma), L-Nitro Arjinin (Sigma), İndometazin(Sigma)

Asetilkolin, 0.001 N HCl içinde çözülmüştür. İndometazin 5% (w/v) sodyumbikarbonat içinde çözülmüştür. İleri seyreltimler Krebs çözeltisi kullanılarak yapılmıştır.

Deney Hayvanlarına Enjekte Edilen, ve Sunulan Kimyasallar Alloksan(Fluka), trans-resveratrol (Sigma) ve Herb-Tech (China) Farklı iki kaynaktan sağlanan resveratrol saflığının benzer olduğu, HPLC analizleri ile ön deneylerde gösterilmiştir

Deneylerde Kullanılan Krebs Çözeltisinin Bileşimi (mM):
NaCl(Merck) :118, KCl(Sigma) :4.73, KH₂PO₄ (Merck) : 1.2,
MgSO₄(Merck) : 1.2, CaCl₂(Merck) : 2.5, NaHCO₃(Sigma) : 25,
Glukoz (Sigma) :11, EDTA (Sigma) : 0.026.

Hazırlanan stok çözeltiler derin dondurucuda saklanmış, kullanılacakları zaman Krebs çözeltisi ile seyreltilerek kullanılmıştır..

3.A.3. ARAÇ VE GEREÇLER

İn vitro İzole Organ Banyosu Deneyleri
Çift cidarlı izole organ banyosu (EMKA)
Gerim ileticisi (EMKA)
Amplifier (EMKA)
Bilgisayar kontrollü özel kaydedici sistem (EMKA)
Sirkülasyonlu su banyosu (EMKA)
%95 O₂ ve %5 CO₂ içeren gaz karışım tüpü

3.B. YÖNTEMLER

Tavşan Aortalarının İzole Organ Banyosu İçin Hazırlanması

Anesteziye edilmiş tavşanların göğüs kafesleri açılarak torasik aorta izole edilmiş ve soğuk Krebs çözeltisi (mM): NaCl :118, KCl :4.73, KH_2PO_4 : 1.2, MgSO_4 : 1.2, CaCl_2 : 2.5, NaHCO_3 : 25, Glukoz: 11, EDTA: 0.026 içeren petri kabına alınmıştır. Petri kabına alınan torasik aorta çevre dokularından temizlendikten sonra 3-4 mm' lik halkalar halinde kesilmiştir. Dokular hazırlanırken endotel tabakasının zedelenmemesi için azami dikkat gösterilmiştir. Aorta halkaları, paslanmaz çelikten yapılmış L tipi doku kancaları arasına yerleştirilerek izometrik gerim ölçümü için 5 ml lik izole organ banyosuna yerleştirilmişlerdir.

Preparatlar, %95 O_2 ve %5 CO_2 karışımı ile havalandırılan 37°C'deki Krebs çözeltisi içinde 2 g' lık gerim altında 1-1.5 saat süreyle dengelenmeye bırakılmıştır. Dengelenme süresi içinde banyo çözeltisi her 15 dakikada bir değiştirilmiştir. Dokuların gerim değişiklikleri, izometrik transducer (EMKA, Technologies, Paris, gerim ölçer) yardımıyla bilgisayara kaydedilmiştir. Uzunluk-gerim ilişkisindeki optimum nokta, dinlenme durumunda, farklı aktif gerim uygulamalarında 3×10^{-6} M fenilefrin uygulaması yapılarak belirlenmiştir. Kontrol ve diyabetik tavşanların aorta halkalarında, 2 g lık ön gerimin maksimum fenilefrin kasılması oluşturduğu saptanmış. Aynı hayvanın torasik aortasından 4-8 halka oluşturulmuş ve paralel olarak çalışılmıştır. Her preparat yalnızca bir deneyde kullanılmıştır.

3.B.1. TAVŞAN AORTASINDA KASILMA VE GEVŞEME ÇALIŞMALARI İÇİN UYGULANAN DENEY PROTOKOLÜ

Yaklaşık 1.5 saatlik dengelenme periyodunun ardından aorta halkalarının canlılığı 3×10^{-6} M fenilefrin uygulaması ile kontrol edilmiştir. Bu konsantrasyondaki fenilefrine 2 g' dan az kasılma yanıtı veren arterler çalışma dışı tutulmuşlardır. 40 mM KCl ve 3×10^{-6} M fenilefrin uygulamasına kasılma cevaplarının en az 2 kez anlamlı olarak değişmeden tekrarlanabilir olduğu saptanmıştır. Endotel tabakasının bütünlüğü, 3×10^{-7} M fenilefrin ile ön kasılma oluşturulmuş aorta halkalarının 10^{-6} M asetilkolin uygulamasına verdiği gevşeme cevabı ölçülerek saptanmıştır.

Fenilefrinin (10^{-9} - 10^{-4} M) artan konsantrasyonlarda kümülatif uygulaması ile konsantrasyon-yanıt eğrisi elde edilmiştir. Bu konsantrasyon-yanıt eğrisinden fenilefrinin submaximal (80-90 %) kasılma oluşturan konsantrasyonu 3×10^{-7} M olarak saptanmıştır.

Asetilkolin (10^{-9} - 10^{-5} M) gevşeme yanıtları 3×10^{-7} M fenilefrin ile önceden kastırılmış aorta halkalarında incelenmiştir. Fenilefrin kasılması düzgün bir plato oluşturduktan sonra asetilkolin artan konsantrasyonlarda kümülatif olarak uygulanmıştır. Asetilkolinin her doz uygulaması bir önceki dozun etkisinin tamamlanmasından sonra yapılmıştır. Fenilefrin ve asetilkolin konsantrasyon-yanıt eğrileri kontrol, diyabetik ve resveratrol içeren diyabetik gruplarda 30 dakika 10^{-5} M indometazin preinkübasyonundan sonra da gerçekleştirilmiştir.

Zaman kontrollü çalışmalarda 3×10^{-7} M ile oluşturulan fenilefrinin kasılmasının, asetilkolin konsantrasyon-yanıt eğrisinin tamamlanması için gereken sürede korunduğu saptanmıştır.

3.B.2. İSTATİSTİK ANALİZ

Sonuçlar, ortalama $\pm$ standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. Fenilefrine kasılma cevapları, 40 mM KCl ile oluşturulan kasılmanın % si (relative tension) olarak gösterilmiştir. Asetilkolinle oluşan gevşemeler, fenilefrin prekontraksiyonundaki % azalmalar olarak verilmiştir. İstatistik analiz Student's t-test ve varyans analizi ile yapılmıştır. P değeri 0.05 den küçük ise bulgu anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

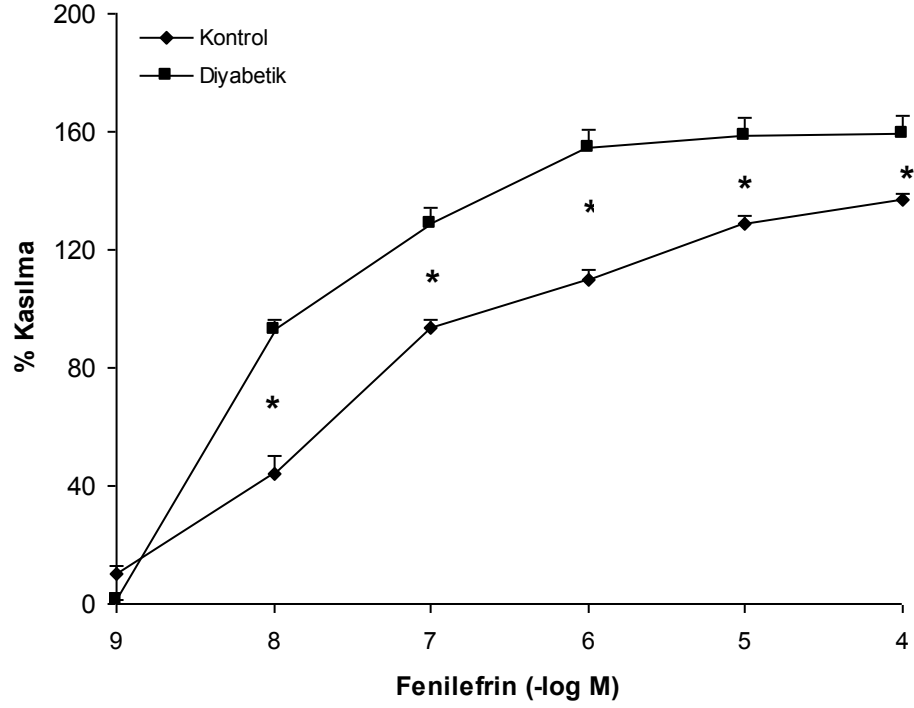
Tablo 2. Deney gruplarına ait ağırlık, kan şekeri ve günlük tüketilen su miktarlarına ait veriler.

GRUPLAR	AĞIRLIK (g)	KAN ŞEKERİ (mg/dl)	GÜNLÜK TÜKETİLEN SU MİKTARI (ml)
KONTROL	2285 ± 24	102 ± 10	160 ± 21
RESVERATROL KONTROL	2332 ± 30	110 ± 5	280 ± 35
AYNI ANDA RESVERATROL ALAN DİYABETİK	2324 ± 33	455 ± 71	685 ± 15
ÖNCEDEN RESVERATROL ALAN DİYABETİK	2216 ± 25	380 ± 29	675 ± 32
DÜŞÜK DOZ RESVERATROL ALAN DİYABETİK	2134 ± 23	422 ± 45	590 ± 11
DİYABETİK	2117 ± 31	485 ± 34	585 ± 13

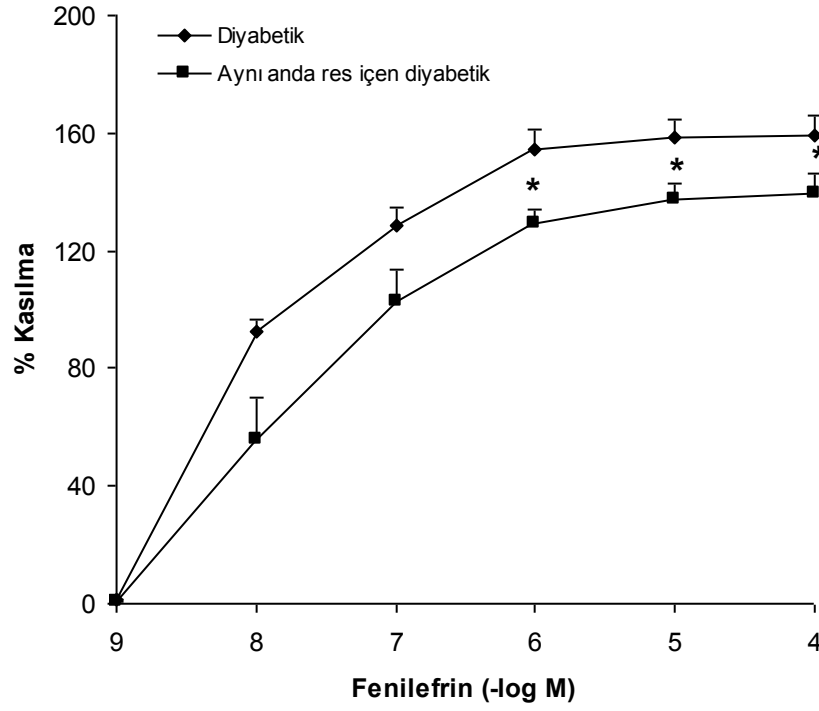
4. SONUÇLAR

Tavşan Aorta Halkalarında Fenilefrinin Kastırıcı Etkisi

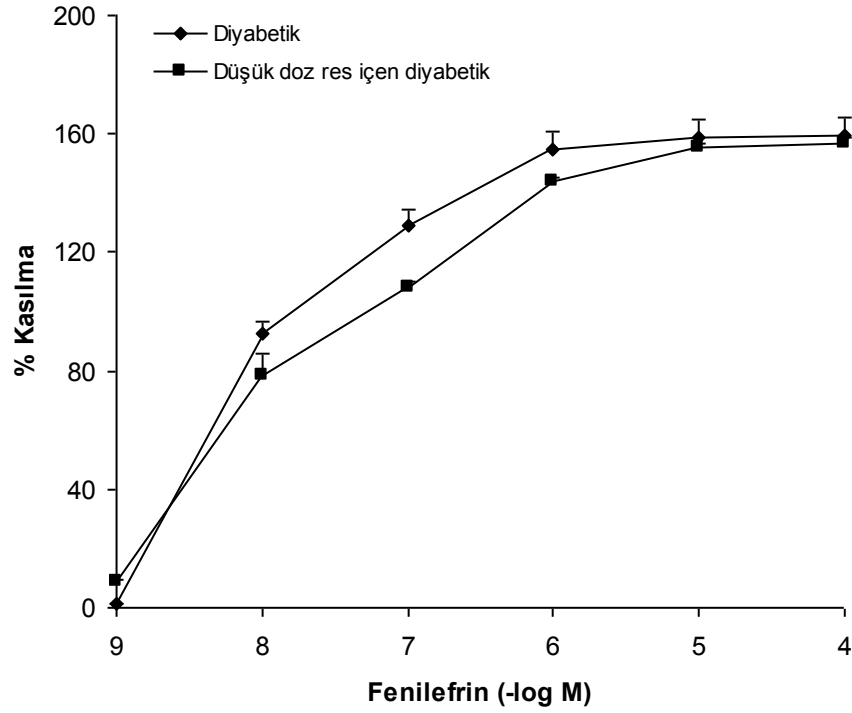
Fenilefrinin (10^{-9} - 10^{-4} M) kümülatif biçimde uygulanması endoteli sağlam tavşan aorta halkalarında konsantrasyon-bağımlı kasılma yanıtları oluşturmuştur. Kontrol ve diyabetik tavşanların fenilefrin konsantrasyon-yanıt eğrileri karşılaştırılması Şekil 1 de gösterilmiştir. Resveratrol içeren diyabetik hayvanlarda fenilefrin konsantrasyon-yanıt eğrilerinin, diyabetik tavşanlardan elde edilen yanıtlarla karşılaştırılması Şekil 2 ve 3 te gösterilmiştir. Diyabetik ve resveratrol içeren diyabetik hayvanlarda 30 dakika 10^{-5} M indometazin preinkübasyonundan sonra elde edilen veriler Şekil 4 ve 5 te gösterilmiştir.



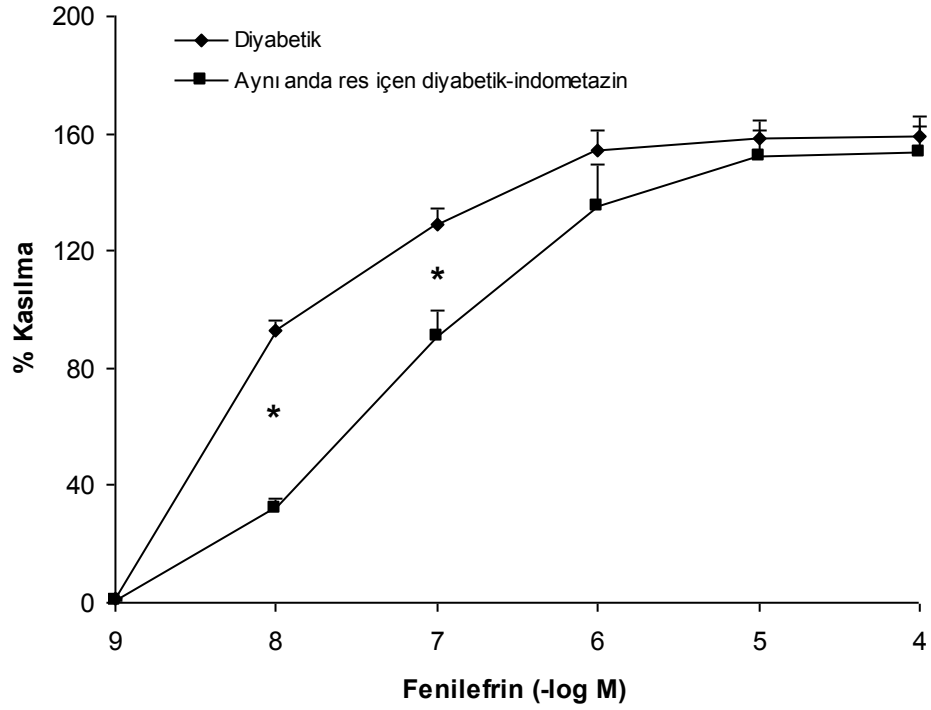
Şekil 1 : Kontrol ve diyabetik tavşanların endoteli sağlam aorta halkalarının fenilefrinin (10^{-9} - 10^{-4} M) kümülatif biçimde uygulanmasına oluşturduğu konsantrasyon-bağımlı kasılma yanıtları. Sonuçlar, 40 mM KCl' nin oluşturduğu kasılmaların yüzdesi (relative tension) olarak verilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ Standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. N=7-8



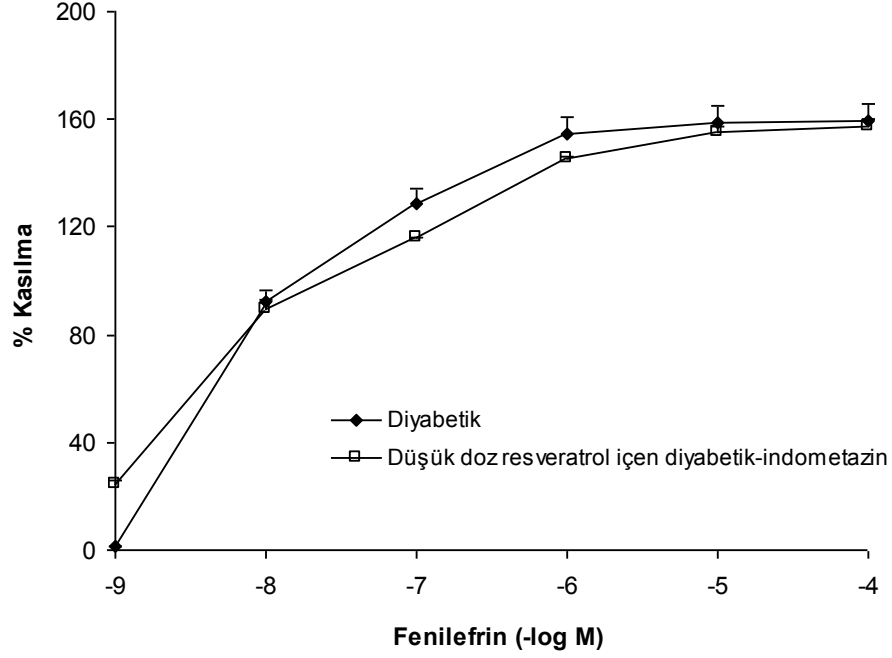
Şekil 2 : Resveratrol (50 mg/L, aynı anda resveratrol içen diyabetik) içen ve içmeyen diyabetik tavşanların endoteli sağlam aorta halkalarının fenilefrinin (10^{-9} - 10^{-4} M) kümülatif biçimde uygulanmasına oluşturduğu konsantrasyon-bağımlı kasılma yanıtları. Sonuçlar, 40 mM KCl'nin oluşturduğu kasılmaların yüzdesi (relative tension) olarak verilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ Standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. N=5-8



Şekil 3 : Diyabet oluşturulmadan 15 gün öncesinden düşük doz resveratrol (5 mg/L, düşük doz resveratrol içen diyabetik) içmeye başlayan ve içmeyen diyabetik tavşanların endoteli sağlam aorta halkalarının fenilefrinin (10^{-9} - 10^{-4} M) kümülatif biçimde uygulanmasına oluşturduğu konsantrasyon-bağımlı kasılma yanıtları. Sonuçlar, 40 mM KCl'ün oluşturduğu kasılmaların yüzdesi (relative tension) olarak verilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ Standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. N=3-8



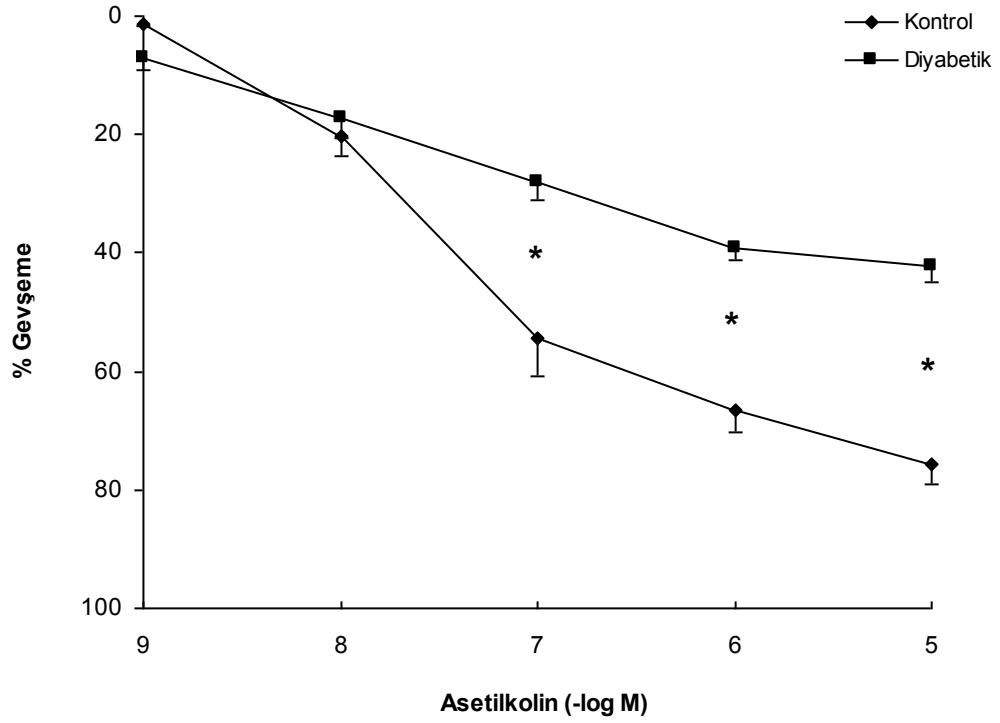
Şekil 4 : Resveratrol (50 mg/L) için diyabetik tavşanlardan alınan endoteli sağlam aortaların 30 dakika indometazin (10^{-5} M) ile preinkübasyondan sonra (aynı anda resveratrol için diyabetik-indometazin) fenilefrinin (10^{-9} - 10^{-4} M) ile elde edilen kasılma yanıtlarının. diyabetik tavşanların aortalarında elde edilen yanıtlarla karşılaştırılması. Sonuçlar 40 mM KCl'ün oluşturduğu kasılmaların yüzdesi (relative tension) olarak verilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ Standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. N=4-8



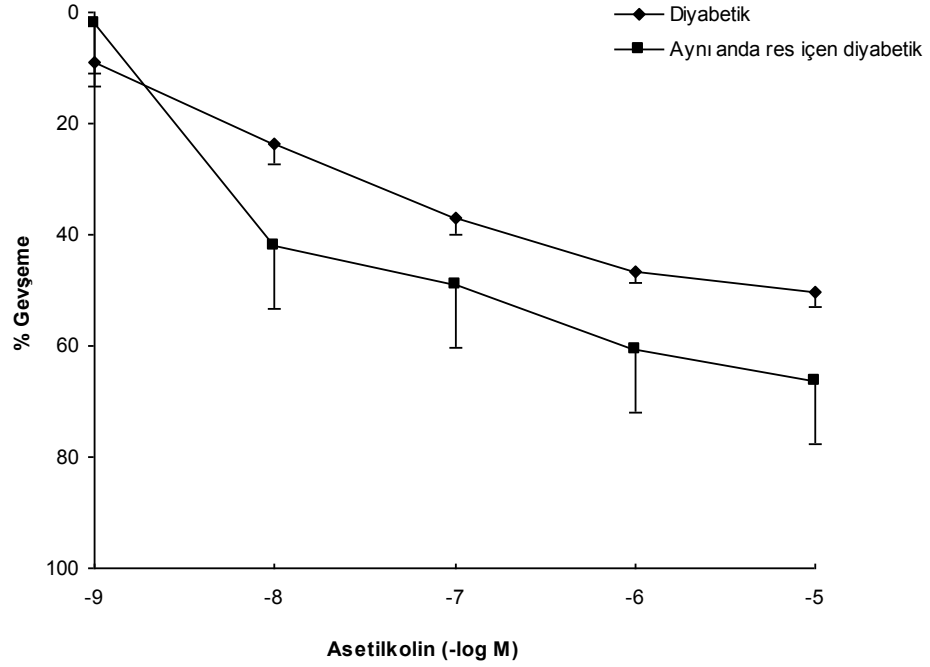
Şekil 5 : Diyabet oluşturulmadan 15 gün öncesinden düşük doz resveratrol (5 mg/L) içmeye başlayan diyabetik tavşanlardan alınan endoteli sağlam aortaların 30 dakika indometazin (10^{-5} M) ile preinkübasyondan sonra (düşük doz resveratrol içeren diyabetik-indometazin), elde edilen fenilefrin (10^{-9} - 10^{-4} M) kasılma yanıtlarının diyabetik tavşanların aortalarında elde edilen fenilefrin kasılma yanıtları ile karşılaştırılması. Sonuçlar, 40 mM KCl'ün oluşturduğu kasılmaların yüzdesi (relative tension) olarak verilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ Standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. N=3-8

Tavşan Aorta Halkalarında Asetilkolinin Gevşetici Etkisi

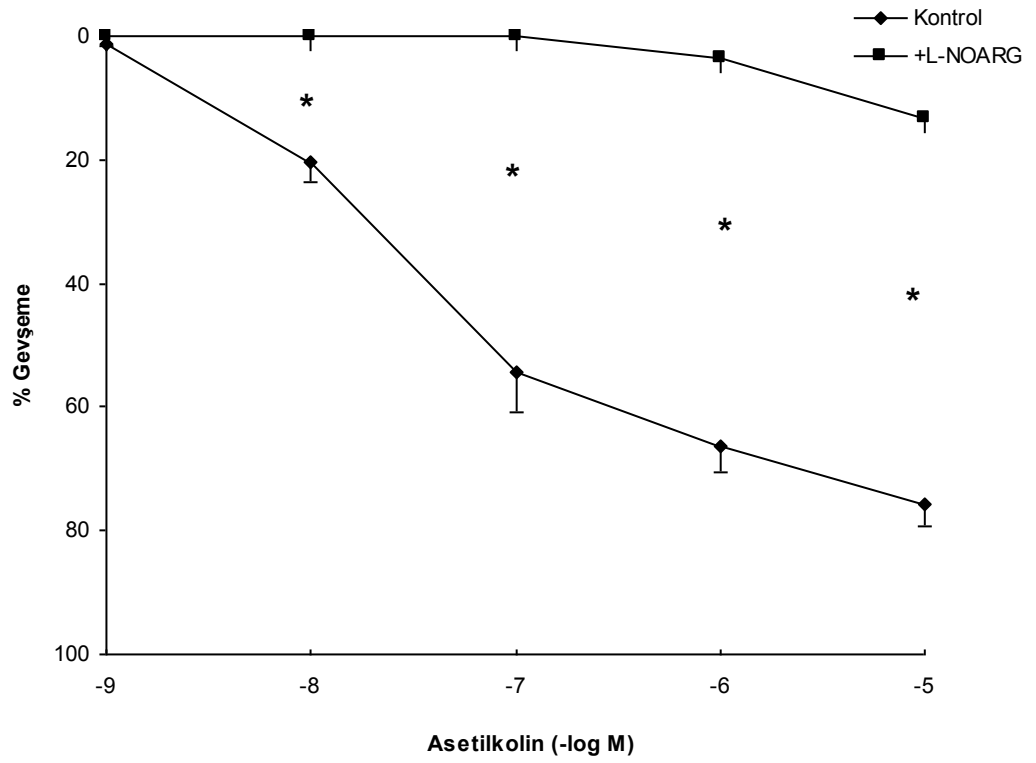
Asetilkolinin (10^{-9} - 10^{-5} M) kümülatif biçimde uygulanması endoteli sağlam kontrol, diyabetik ve aynı anda resveratrol içeren tavşanların aorta halkalarında konsantrasyon-bağımlı gevşeme yanıtları oluşturmuştur. L-Nitrik oksit arginin (L-NO ARG) (10^{-4} M) ile 30 dakikalık preinkübasyondan sonra asetilkolin gevşemelerinin büyük ölçüde ortadan kalktığı görülmektedir. Kontrol ve diyabetik tavşanların asetilkolin konsantrasyon-yanıt eğrileri karşılaştırıldığında, istatistik olarak anlamlı farklılıklar şekil 8 üzerinde gösterilmiş. Aynı anda resveratrol içeren diyabetik hayvanlarda asetilkolin konsantrasyon-yanıt eğrilerinin, diyabetik tavşanlardan farklı olduğu izlenmektedir (Şekil 9). Şekil 10, 11, 12,13 de L-NO ARG varlığında kontrol, diyabetik ve aynı anda resveratrol alan diyabetik gruplarının asetilkolin gevşemesi karşılaştırılmıştır. Şekil 14 de kontrol, resveratrol kontrol, diyabetik ve aynı anda resveratrol alan diyabetik tavşanların bazal NO oluşumuna bağlı gerilimleri gösterilmiştir. Şekil 15, 16, 17 ve 18 de kontrol, diyabetik ve aynı anda resveratrol içeren diyabetik tavşanlarda indometazin preinkübasyonunun etkileri karşılaştırılmıştır..



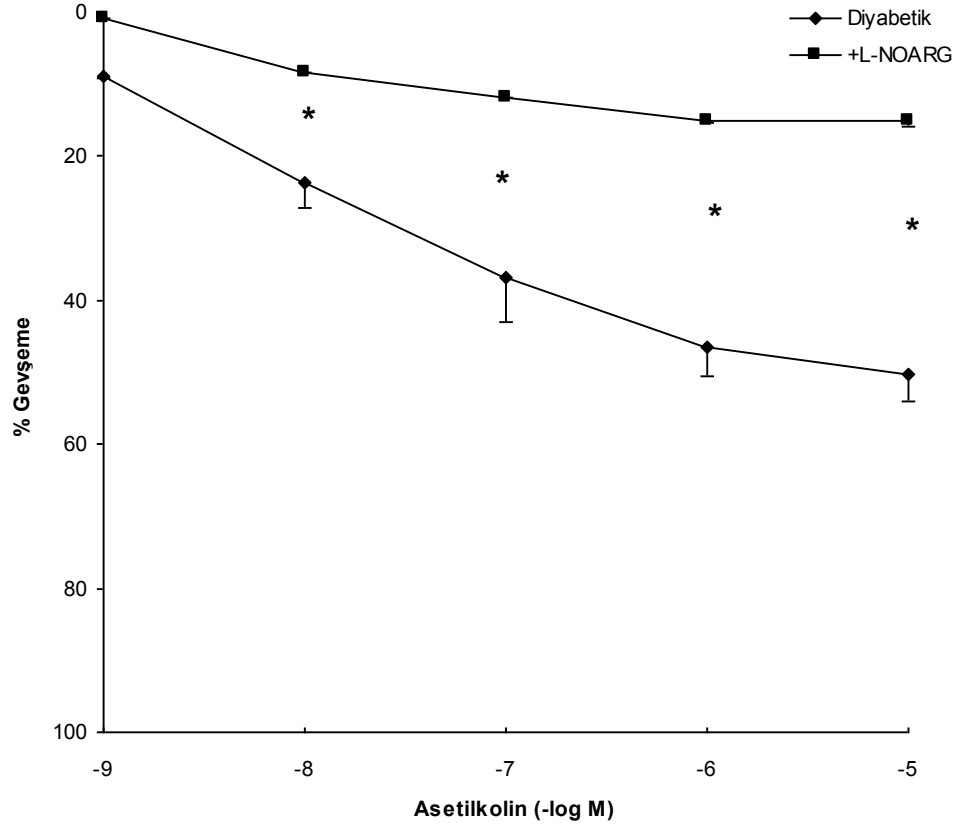
Şekil 8 : Kontrol ve diyabetik tavşanların endoteli sağlam aorta halkalarının 3×10^{-7} M fenilefrin ile prekontraksiyonundan sonra, asetilkolinin (10^{-9} - 10^{-4} M) kümülatif biçimde uygulanmasına oluşturduğu konsantrasyon-bağımlı gevşeme yanıtları. Sonuçlar, fenilefrin kasılmalarındaki yüzde inhibisyon olarak verilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ Standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. N=9-11



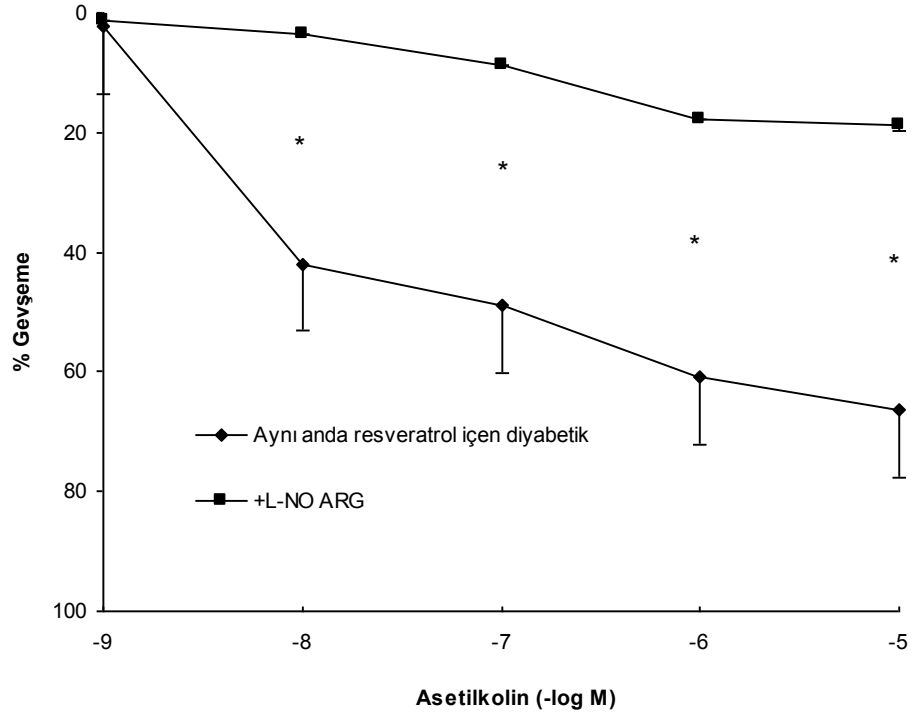
Şekil 9 : Resveratrol (50 mg/L, aynı anda resveratrol içen diyabetik) içen ve içmeyen diyabetik tavşanların endoteli sağlam aorta halkalarının fenilefrin ile prekontraksiyonundan sonra, asetilkolinin (10^{-9} - 10^{-5} M) kümülatif biçimde uygulanmasına oluşturduğu konsantrasyon-bağımlı gevşeme yanıtları. Sonuçlar, fenilefrin kasılmalarındaki yüzde inhibisyon olarak verilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ Standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. N=5-9



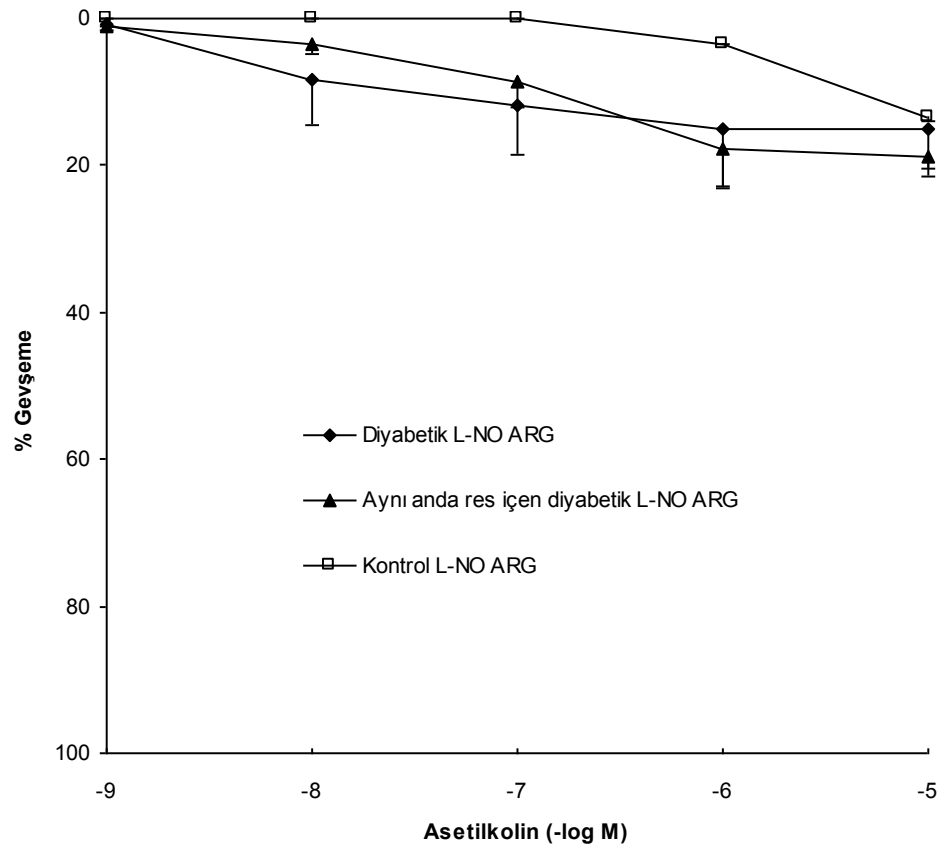
Sekil 10 : Kontrol tavşanların endoteli sağlam aorta halkalarının, 3×10^{-7} M fenilefrin ile prekontraksiyonundan sonra, asetilkolinin (10^{-9} - 10^{-4} M) kümülatif biçimde uygulanmasına oluşturduğu konsantrasyon-bağımlı gevşeme yanıtları ve 30 dakika L-NOARG (10^{-4} M) preinkübasyonundan sonraki asetilkolin yanıtlarının karşılaştırılması. Sonuçlar, fenilefrin kasılmalarındaki yüzde inhibisyon olarak verilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ Standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. N=4-8



Şekil 11: Diyabetik tavşanların endoteli sağlam aorta halkalarının, $3 \times 10^{-7} \text{M}$ fenilefrin ile prekontraksiyonundan sonra, asetilkolinin (10^{-9} - 10^{-4}M) kümülatif biçimde uygulanmasına oluşturduğu konsantrasyon-bağımlı gevşeme yanıtları ve 30 dakika L-NOARG (10^{-4}M) preinkübasyonundan sonraki asetilkolin yanıtlarının karşılaştırılması. Sonuçlar, fenilefrin kasılmalarındaki yüzde inhibisyon olarak verilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ Standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. N=4-8



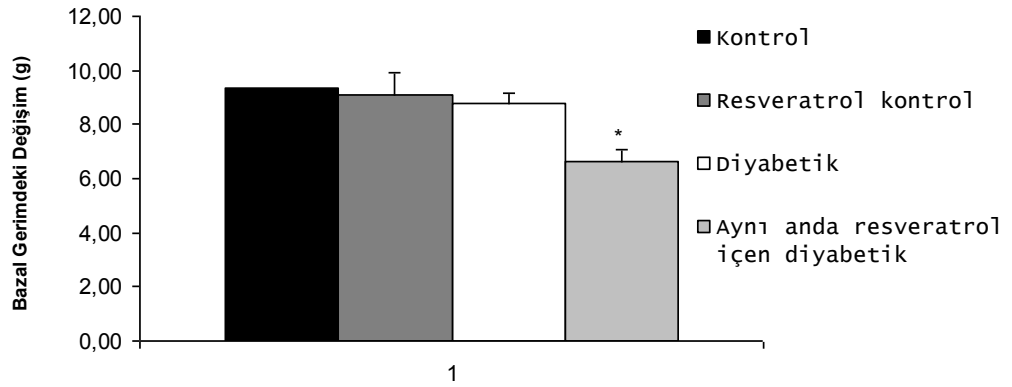
Şekil 12: Aynı anda resveratrol içen diyabetik tavşanların endoteli sağlam aorta halkalarının, $3 \times 10^{-7} \text{M}$ fenilefrin ile prekontraksiyonundan sonra, asetilkolinin (10^{-9} - 10^{-4}M) kümülatif biçimde uygulanmasına oluşturduğu konsantrasyon-bağımlı gevşeme yanıtları ve 30 dakika L-NOARG (10^{-4}M) preinkübasyonundan sonraki asetilkolin yanıtlarının karşılaştırılması. Sonuçlar, fenilefrin kasılmalarındaki yüzde inhibisyon olarak verilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ Standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. N=4-8



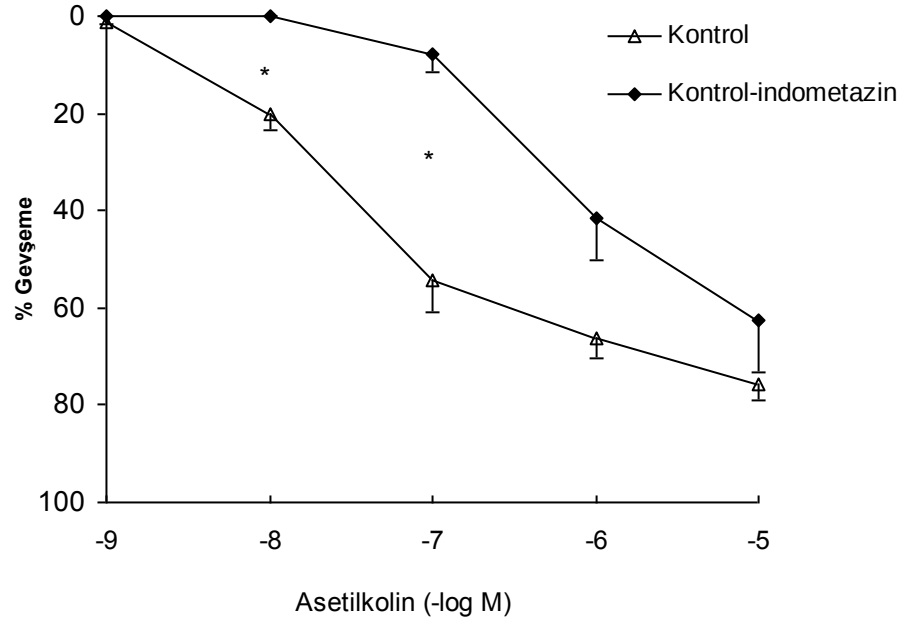
Şekil 13 : Aynı anda resveratrol (50 mg/L) içen ve içmeyen diyabetik tavşanlar ile kontrol tavşanların endoteli sağlam aorta halkalarının fenilefrin ile prekontraksiyonundan sonra, 30 dakika L-NOARG (10^{-4} M) preinkübasyonundan sonraki asetilkolinin (10^{-9} - 10^{-4} M) kümülatif biçimde uygulanmasına oluşturduğu konsantrasyon-bağımlı gevşeme yanıtları. Sonuçlar, fenilefrin kasılmalarındaki yüzde inhibisyon olarak verilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ Standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. N=4

Bazal Nitrik Oksit Oluşumu

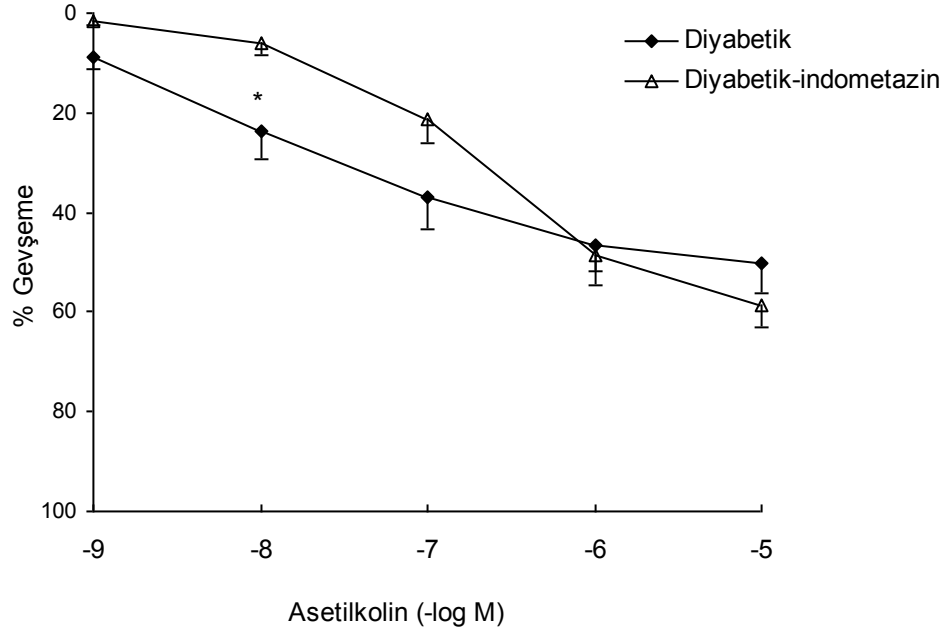
L-NOARG ile preinkübasyon tavşan aortalarındaki kontraktil tonusu artırmıştır. L-NOARG uygulamasından sonraki kontraksiyon değerleri şimdiye kadar çalışılan gruplar için Şekil 14 da gösterilmiştir. Sonuçlar gram kasılma (absolute tension) olarak verilmiştir.



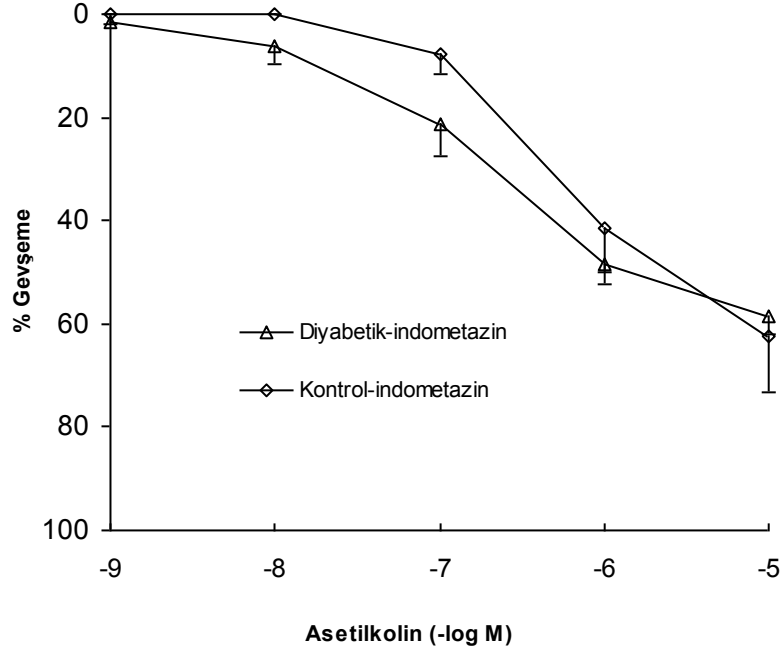
Şekil 14 : Tavşan aorta halkalarının L-NOARG (100 μ M), banyo ortamına 30 dakika önce eklenen, uygulaması sonrasında oluşturduğu maksimum kasılma yanıtları. Sonuçlar gram kasılma (absolute tension) olarak verilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ Standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. N=4



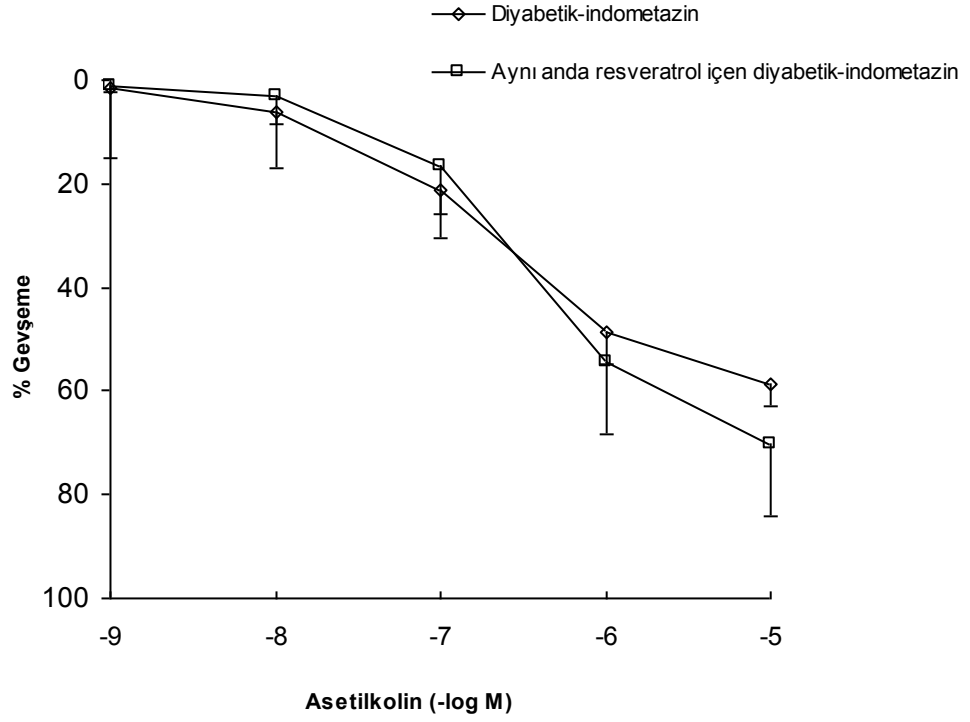
Şekil 15 : Kontrol tavşanlardan alınan endoteli sağlam aortalarının asetilkolin (10^{-9} - 10^{-5} M) ile elde edilen gevşeme yanıtlarının, 30 dakika indometazin (10^{-5} M) preinkübasyonundan sonra, asetilkolin (10^{-9} - 10^{-5} M) ile elde edilen gevşeme yanıtları ile, karşılaştırılması. Sonuçlar, fenilefrin kasılmalarındaki yüzde inhibisyon olarak verilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ Standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. N=4-11



Şekil 16 : Diyabetik tavşanlardan alınan endoteli sağlam aortalarının asetilkolin (10^{-9} - 10^{-5} M) ile elde edilen gevşeme yanıtlarının, 30 dakika indometazin (10^{-5} M) preinkübasyonundan sonra, asetilkolin (10^{-9} - 10^{-5} M) ile elde edilen gevşeme yanıtları ile, karşılaştırılması. Sonuçlar, fenilefrin kasılmalarındaki yüzde inhibisyon olarak verilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ Standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. N=6-9



Şekil 17 : Kontrol ve diyabetik tavşanlardan alınan endoteli sağlam aortaların 30 dakika indometazin (10^{-5} M) ile preinkübasyonundan sonra, asetilkolin (10^{-9} - 10^{-5} M) ile elde edilen gevşeme yanıtlarının, karşılaştırılması. Sonuçlar, fenilefrin kasılmalarındaki yüzde inhibisyon olarak verilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ Standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. N=4-6



Şekil 18 : Diyabetik ve aynı anda res içen diyabetik tavşanlardan alınan endoteli sağlam aortaların 30 dakika indometazin (10^{-5} M) ile preinkübasyonundan sonra, asetilkolin (10^{-9} - 10^{-5} M) ile elde edilen gevşeme yanıtlarının, karşılaştırılması. Sonuçlar, fenilefrin kasılmalarındaki yüzde inhibisyon olarak verilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ Standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. N=6-11

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada alloksan ile diyabet oluşturulmuş tavşanlarda, uzun süre resveratrol verilmesinin (5, 50 mg/L, 8 hafta) vazokonstriktör bileşik fenilefrin ile endotel bağımlı vazodilatör bileşik asetilkolin cevapları üzerine etkileri torasik aortada incelenmiştir. Bu çalışmanın bulguları, alloksan diyabetik tavşanlarda fenilefrinin vazokonstriktör etkisinin anlamlı olarak arttığını, fakat asetilkolinin endotel-bağımlı gevşeme cevaplarının ise azaldığını göstermektedir. 50 mg/L resveratrol tedavisinin diyabetik tavşanların arterlerinde artmış olan fenilefrin kasılmalarını kısmen düzelttiğini göstermektedir. Ayrıca, diyabetik tavşan arterlerinde azalmış olan asetilkolinin endotel-bağımlı gevşeme cevaplarının 50 mg/L resveratrol tedavisi ile azda olsa arttığı fakat bu artışın anlamlı olmadığı görülmüştür.

Tavşanlara 100 mg/kg alloksanın kulak veninden enjeksiyonundan sonra kan şekeri 485 ± 34 olarak ölçülmüştür. İçme sularında önceden 5, 50 mg/L, ve aynı anda 50 mg/L resveratrol içen tavşanların kan şekeri ise sırasıyla 422 ± 45 , 385 ± 29 ve 455 ± 71 olarak ölçülmüştür. Kontrol hayvanların kan şekeri değeri ise 102 ± 10 olarak ölçülmüştür. Bu veriler, alloksan enjeksiyonundan sonra kan şekeri değerlerinin diyabetik değerlerin üstüne çıktığını göstermektedir. Resveratrol içiminin, diyabetik hayvanların kan şekeri değerlerini normal değerlere getiremediği ve hala çok yüksek olarak seyrettiğini göstermektedir. Resveratrol içen kontrol hayvanlarda, kan şekeri değerinin hafifçe yükseldiği fakat bunun anlamlılık taşımadığı görülmektedir. Bu veriler Chen ve ark' nın³⁴ bulgularıyla kısmen doğrulanmaktadır. Söz konusu çalışmada, diyabetik sıçanlarda resveratrol uygulamasının kan glukoz ve insülin düzeyini değiştirmediği gösterilmişti. Fakat diyabetik sıçanlarda yapılan bir başka araştırmada resveratrolün insülin salınımını artırdığı ve kan glukoz düzeyini düşürdüğü gösterilmişti.⁵²

Deney gruplarındaki tavşanların içtikleri su miktarları karşılaştırıldığında ise, resveratrol içen kontrol ve diyabetik tavşanlardaki su tüketiminin yüksek olduğu dikkat çekmektedir. Diyabetik hayvanlardaki su tüketiminin kontrolden yüksek olması (160 ± 21 ve 585 ± 13) zaten beklenen bir durumdur. Resveratrol içen gruplardaki yükseklik, tavşanların resveratrol tadını beğendiği şeklinde yorumlanabilir.

Resveratrol içen gruplardaki su tüketimi yüksekliği, onların yem tüketiminde ve dolayısı ile kilo almalarında bir artışa neden olmuş mudur diye araştırdığımızda ise, gruplar arasında dikkat çekici bir farklılığın olmadığı görülmüştür. Bütün gruplardaki hayvanların deney başı ağırlıkları 1900–2100 g arasında olup deney sonu ağırlıkları Tablo 2' de gösterilmiştir.

Epidemiyolojik çalışmalar, günde 250-400 ml şarap içiminin kardiyovasküler hastalıklara yakalanma sıklığını azalttığını göstermektedir.²¹ Kırmızı şarabın endotel kaynaklı nitrik oksit oluşumunu artırdığı gösterilmiştir.⁵³ Sıçan ve tavşan aortalarında kırmızı şaraptan elde edilen ekstrelerinin endotel bağımlı ve nitrik oksit aracılı gevşemeler oluşturduğu gösterilmiştir.⁵⁴ Kırmızı şarap içinde bulunan polifenolik bileşik resveratrolün, sıçan ve kobaylardan çıkarılmış endoteli sağlam arterlerde³ ve insan internal meme arterinde³⁰ esas olarak nitrik oksit aracılı gevşemeler oluşturduğu gösterilmiştir. Dişi ve erkek sıçanlara 21 gün boyunca 50 mg/kg resveratrolün içme suyu içinde verilmesinden sonra, asetilkolin ve estrogenin endotel-bağımlı gevşeme cevaplarının arttığı gösterilmiştir.³² Ayrıca, bu çalışmada anjiotensinin vazokonstriktör etkisinin resveratrol içiminden sonra belirgin olarak baskılandığı görülmüştür. Resveratrolün bu olumlu etkilerinin, onun eNOS protein ekspresyonunu artırıcı ve süperoksit miktarını azaltıcı etkileri ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır.

Kontrol ve diyabetik tavşanların aorta halkalarında 10^{-9} - 10^{-4} M doz aralığında fenilefrin ile oluşturulan doz-cevap eğrileri karşılaştırıldığında diyabetiklerin fenilefrin kasılmalarında anlamlı artışlar olduğu görülmüştür.(Şekil 1) Daha önce, diyabet oluşturulmuş tavşan aortalarında fenilefrinin vazokonstriktör etkisinde benzeri artışların olduğu bildirilmiştir.^{36,37} Fenilefrinin diyabetik sıçanlarda artan vazokonstriktör etkisi, yüksek doz resveratrol (50 mg/kg) içen tavşanlarda kısmen düzelmiştir. Düşük doz resveratrol (5 mg/kg) içimi ise, fenilefrin cevaplarında herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır.

Maksimum fenilefrin kontraksiyonunun % 80-90'ını oluşturan fenilefrin dozu kontrol ve diyabetik hayvanlarda 3×10^{-7} M olarak bulunmuştur. Resveratrol içimi sonrasında fenilefrinin aynı yüzde prekontraksiyon oluşturan konsantrasyonunun değişmediği görülmüştür. Asetilkolinin (10^{-9} - 10^{-4} M) endotel-bağımlı gevşetici etkisi diyabetik tavşanların aortalarında çok belirgin ölçüde azalmıştır. Bu bulgular daha önceki bazı çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermektedir.^{36,38}. Diyabetik tavşanlarda azalmış olan asetilkolinin endotel-bağımlı gevşetici etkisi, 50 mg/kg resveratrol içiminden sonra azda olsa artmıştır, fakat bu artış anlamlı bulunmamıştır. Düşük doz resveratrol (5 mg/kg) içimi ise asetilkolinin bu etkisinde herhangi bir değişiklik oluşturmamıştır.

Bazal nitrik oksit düzeylerini belirlemek için bir grup aorta halkası 30 dakika boyunca 100 μ M L-NOARG (N-nitro-L-arginine) ile inkübe edilmiş ve oluşan prekontraksiyonlar ölçülmüştür. L-Arginin analogları ile NO oluşumunun inhibisyonu izole vasküler dokuda bazal endotel kaynaklı nitrik oksit oluşum kapasitesini belirlemek için kullanılmaktadır. Asetilkolinin oluşturduğu endotel bağımlı gevşeme cevapları nitrik oksit sentaz inhibitörü L-NOARG preinkübasyondan sonra, bütün gruplarda nerdeyse tümüyle ortadan kalkmıştır.

L-NOARG preinkübasyonundan sonra bazal gerimdeki artışlar şekil 14 te gösterilmiştir. Tablodaki veriler incelendiğinde bazal nitrik oksit oluşumunun gruplar arasında farklılık göstermediği görülmektedir. Bu bulgu, diyabet ve resveratrol içiminin bazal nitrik oksit oluşumunu etkilemediği şeklinde değerlendirilebilir.

Çalışmanın diğer bir grubunda prostaglandin sentaz inhibitörü indometazin (10^{-5} M) ile aortalar 30 dakikalık preinkübasyon işlemine alınmışlardır. Asetilkolinin endotel bağımlı gevşeme cevaplarında indometazinden sonra kontrol aortalarda çok belirgin bir şekilde azalırken, diyabetik aortalardaki azalma belirgin olmamıştır. İndometazinin kontrol ve diyabetik damarlarda asetilkolin gevşemesini nerdeyse eşitlemesi ilginç bulunmuştur. Bu bulgu Tesfamiriam ve arkadaşlarının⁵⁵ diyabetik tavşanlarda aldığı sonuçlar ile açıklanabilir. Bu bulguya dayanarak, indometazinin etkisi, diyabetik tavşanların aortalarının endotel tabakasından vazokonstriktör bir prostaglandinin (TxA_2 ya da $\text{PGH}_2\text{-PGG}_2$ salındığı şeklinde açıklanabilir. Resveratrol içen ve içmeyen diyabetik tavşanlarda indometazin etkisinde belirgin bir değişiklik olmadığı görülmüştür.

Bu çalışmanın sonuçları, 100 mg/kg alloksan ile diyabet yapılmış tavşanlarda fenilefrin kasılma cevaplarının arttığını, asetilkolinin endotel-bağımlı gevşeme cevaplarının azaldığını göstermektedir. Asetilkolin gevşemelerinin büyük ölçüde nitrik oksit oluşumu ile ilgili olduğu görülmüştür. Diyabetik tavşanlara 50 mg/kg resveratrol içirilmesi fenilefrin kontraksiyonlarını kısmen azalttığı, asetilkolin gevşemelerinde ise belirgin bir etkisi olmadığı bulunmuştur. 5 mg/kg resveratrol içiminin ise bu iki bileşiğin cevabını değiştirmedeği anlaşılmıştır. İndometazinin diyabetik tavşanların endotel tabakasından vazokonstriktör bir bileşiğin salınımını engelleyerek asetilkolin cevaplarını kontrol hayvanların ki ile eşitlediği saptanmıştır.

Bu çalışmanın sonuçları, diyabetik tavşanlara resveratrol içirilmesinin, diyabetik arterlerde değişmiş olan vazokonstriktör cevaplılığı kısmen normale döndürdüğünü fakat endotel-bağımlı vazodilatör cevabı artırmadığını göstermektedir.

6. ÖZET

Gelişmiş ve gelişmekte olan toplumlarda, diyabet giderek yaygınlaşan vasküler komplikasyonlarla seyreden metabolik bir hastalıktır. Diyabet, koroner kalp hastalığı ve ateroskleroza yakalanma riskini arttıran en önemli nedenlerden biri olarak görülmektedir.

Epidemiyolojik çalışmalar, orta derecede kırmızı şarap tüketimiyle diyabet de dahil kalp-damar hastalıklarından ölüm oranının belirgin bir şekilde azaldığını göstermektedir. Kırmızı şarabın biyoaktif maddelerinden olan resveratrol, damar endotel reaktivitesi ve nitrik oksit oluşumu ve antioksidan kapasiteyi artırıcı fakat oksidatif stresi azaltıcı etkiler taşımaktadır. Resveratrolün diyabet gelişimi ve onun sonucu ortaya çıkan vasküler komplikasyonlar üzerindeki etkisi henüz araştırılmamıştır.

Bu çalışmada resveratrolün kontrol tavşanlar, alloxan ile (100 mg/kg) diyabet yapılan tavşanlar, aynı anda yüksek doz 50 mg/kg resveratrol içen diyabetik tavşanlar ile önceden düşük doz (5 mg/kg) resveratrol ve yüksek doz resveratrol içirilen tavşanlar üzerinde asetilkolin gevşeme ve fenilefrin kasılma fonksiyonları üzerine olan etkisi incelenmiştir. Ayrıca 30 dakikalık indometazin ve L-Nitro Arjinin inkübasyonları ile gevşeme ve kasılmadaki değişiklikler kaydedilmiştir.

Çalışma sürecinde deney gruplarına ait kan-şeker ölçümleri içtikleri içme suyu ve resveratrol içeren içme suyu miktarları ile çalışma öncesi ağırlıkları kaydedilmiştir.

Yapılan in-vitro çalışmalar ve hazırlanan grafiklerde de belirtildiği üzere, aynı anda resveratrol içirilmiş diyabetik tavşanların asetilkoline olan duyarlılığı diyabetik tavşanlara göre daha fazla, fenilefrine olan duyarlılığı daha azdır. Bu sonuçlar eşğinde resveratrolün vasküler sistem üzerinde gevşetici ve kasılmayı engelleyici etkisi tespit edilmiştir. Ayrıca aynı deney düzeneklerinde indometazinin gevşemeye olan sinerjik etkisi, L-Nitro Argininin ise gevşemeyi büyük oranda inhibe ettiği görülmüştür.

7. SUMMARY

Diabetes mellitus is a metabolic disorder and is characterized by vascular complications which have become more prevalent in both developed and developing societies. Also diabetes mellitus has been regarded as one of the major factors contributing to the risk of coronary heart disease and atherosclerosis.

Epidemiological studies demonstrate that average consumption of red wine causes a prominent decrease in the mortality rate of cardiovascular diseases including diabetes mellitus. As one of the bioactive components of red wine, resveratrol attenuates oxidative stress and augments anti-oxidant potential by increasing nitric oxide formation and vascular endothelial reactivity. However the effects of resveratrol on development of diabetes mellitus and its vascular complications have not been investigated yet.

The present study investigates the effects of resveratrol on the acetylcholinic contraction and phenylephrine relaxation on control rabbits, which were made diabetic by alloxane (100 mg/kg), diabetic rabbits which took high dose (50 mg/kg) resveratrol simultaneously and rabbits which drank high dose resveratrol after taking a low dose (5 mg/kg). Also the alterations in contraction and relaxation functions pursued by 30-minute-long indomethacin and L-Nitro arginine incubations are recorded.

Moreover the following related to experiment groups are registered: blood glucose levels, weights preceding the study, amounts of drinking water with and without resveratrol.

As indicated by in-vitro studies and graphics, diabetic rabbits that consumed resveratrol have become more sensitive to acetylcholine and less sensitive to phenylephrine when compared to non-diabetic rabbits which took resveratrol simultaneously. These findings confirm that resveratrol causes relaxation of vascular system and inhibits its contraction. The same experimental studies also point out that indomethacin acts synergistically with resveratrol whereas L-Nitro-Arginine inhibits its relaxing effects on vascular system.

8. KAYNAKLAR

1. Bertelli AAE, Giovannini L, Stradi R, Bertelli A, Tillement JP. Plasma, urine and tissue levels of trans- and cis-resveratrol (3,4,5-trihydroxystilbene) after short-term and prolonged administration of red wine to rats; 1996 *Int J Tissue React* 18: 67–71.
2. Bradamante S, Barengi L, Villa A. Cardiovascular protective effects of resveratrol; 2004 *Cardiovasc Drug Reviews* 22: 169-188.
3. Chen CK, Pace-Asciak CR. Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta; 1996 *Gen Pharmacol* 27: 363–366.
4. Coskun B, Soylemez S, Parlar AI, Ulus AT, Katircioglu SF, Akar F. Effect of resveratrol on nitrate tolerance in isolated human internal mammary artery; 2006 *J Cardiovasc Pharmacol* 47: 437–445.
5. Das S, Alagappan VK, Bagchi D, Sharma HS, Maulik N, Das DK. Coordinated induction of iNOS–VEGF–KDR–eNOS after resveratrol consumption. A potential mechanism for resveratrol preconditioning of the heart; 2005 *Vasc Pharmacol* 42: 281–289.
6. Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol; 1993 *Lancet* 341: 1103–1104.
7. German JB, Walzem RL. The health benefits of wine; 2000 *Annu Rev Nutr* 20: 561–93.
8. Hung LM, Su MJ, Chu WK, Chiao CW, Chan WF, Chen JK. The protective effect of resveratrols on ischemia reperfusion injuries of rat hearts is correlated with antioxidant efficacy; 2002 *Br J Pharmacol* 135: 1627–1633.
9. Juan ME, Lamuela-Raventos RM, de la Torre-Boronat MC, Planas JM. Determination of trans-resveratrol in plasma by HPLC; 1999 *Anal Chem* 71: 747–750.
10. Kiziltepe U, Turan ND, Han H, Akar F. Resveratrol, A red wine polyphenol, protects spinal cord from ischemia-reperfusion injury; 2004 *J Vasc Surg* 40:138–145.
11. Martinez J, Moreno JJ. Effect of resveratrol, A natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production; 2000 *Biochem Pharmacol* 59: 865–870.

12. McNeill AM, Duckles SP, Krause DN. Relaxant effects of 17- α -estradiol in the rat artery are greater in females than males; 1996 *Eur J Pharmacol* 308: 305 -309.
13. Meng X, Maliakal P, Lu H, Lee MJ, Yang CS. Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice.; 2004 *J Agric Food Chem* 52: 935–942.
14. Naderali EK, Smith SL, Doyle PJ, Williams G. The mechanism of resveratrol-induced vasorelaxation differs in the mesenteric resistance arteries of lean and obese rats; 2001 *Clin Sci* 100:55–60.
15. Rakici O, Kiziltepe U, Coskun B, Aslamacı S, Akar F. Effects of resveratrol on vascular tone and endothelial function of human saphenous vein and internal mammary artery; 2005 *Int J Cardiol* 105: 209–215.
16. Rotondo S, Rajtar G, Manarini S, Celardo A, Rotilio D, de Gaetano G et al. Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function; 1998 *Br J Pharmacol* 123: 1691–1699.
17. Soleas GJ, Angelini M, Grass L, Diamandis EP, Goldberg DM. Absorption of trans-resveratrol in rats; 2001 *Methods Enzymol* 335: 145–154.
18. Vitrac X, Desmouliere A, Brouillaud B, Krisa S, Deffieux G, Barthe N et al. Distribution of [^{14}C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration; 2003 *Life Sci* 72: 2219–2233.
19. Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K et al. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase; 2002 *Circulation* 106: 1652–1658.
20. Frémont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci*. 2000 Jan 14;66(8):663-73.
21. Lorgeil, Mediterranean diet and the French paradoxTwo distinct biogeographic concepts for one consolidated scientific the theory on the role of nutrition in coronary heart disease; *Cardiovascular Research*; 54(3):503–15.

22. Basly JP, Marre-Fournier F, Le Bail JC, Habrioux G, Chulia AJ. Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)-resveratrol; 2000 Jan 21; Life Sci.;66(9):769-77.
23. Cos P, De Bruyne T, Apers S, Vanden Berghe D, Pieters L, Vlietinck AJ. Phytoestrogens: recent developments; 2003 Jul; Department of Pharmaceutical Sciences, University of Antwerp, Antwerp, Belgium 69(7):589-99
24. Akar F. Nitrik Oksit; 2000 TFD Farmakoloji; Gazi Kitabevi Ankara 221-227.
25. Shen M, Guo-Liang J, Yue-Min W, Heng M. Cardioprotective effect of resvaratrol pretreatment on myocardial ischemia–reperfusion induced injury in rats; 2006 Vascular Pharmacology 45:122–126
26. Chen CK, Pace-Asciak CR. Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta; 1996 Mar Gen Pharmacol; 27(2):36-36.
27. 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; 2002 Mol Pharmacol 61: 294–302.
28. Naderali EK, Doyle PJ, Williams G. Resveratrol induces vasorelaxation of mesenteric and uterine arteries from female guinea-pigs. 2000 May; Clin Sci (Lond) ;98(5):537-43.
29. American Diabetes Association : Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus Diabetes care 27. 2004 Suppl 1, s:5-14,
30. Rakici O, Kiziltepe U, Coskun B, Aslamacı S, Akar F. Effects of resveratrol on vascular tone and endothelial function of human saphenous vein and internal mammary artery; 2005 Int J Cardiol 105: 209–215.
31. Jian-Gang Z, Zhi-Rong W, Yuan-Zhu H, Ke-Jiang C, Joseph M. Effect of red wine and wine polyphenol resveratrol on endothelial function in hypercholesterolemic rabbits; 2003; Wu2 International Journal Of Molecular Medicine 11: 317-320.
32. Söylemez S. Dişi ve erkek sıçanlarda uzun süreli resveratrol tedavisinin endotel hücre reaktivitesi ve eNOS, iNOS ekspresyonları üzerindeki etkilerinin araştırılması; 2007 Doktora tezi. Gazi Üniversitesi Ankara.

33. Andrea C, Claudia M, Chiara B, Christian P, Paola S, Rosa M.G, Lina P, Potential pro-inflammatory action of resveratrol in vascular smooth muscle cells from normal and diabetic rats; 2006 *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 16: 322–329
34. Chen WP, Chi TC, Chuang LM, Su MJ. : Resveratrol enhances insulin secretion by blocking K(ATP) and K(V) channels of beta cells. *Eur J Pharmacol.* 2007 Jul 30;568 (1-3):269-77.
35. Markku L. Goldstein B.J, Müller D. Dunitz M.: Epidemiology and diagnosis of type 2 diabetes, *Textbook of Type 2 Diabetes*, Jyväskylä 2003
36. Pieper GM, Mei DA, Langenstroer P, O'Rourke ST. Bioassay of endothelium-derived relaxing factor in diabetic rat aorta. 1992 Sep *Am J Physiol* ; 263(3 Pt 2):H676-80.
37. Pieper GM, Siebeneich W, Olds CL, Felix CC, Del Soldato P. Vascular protective actions of a nitric oxide aspirin analog in both in vitro and in vivo models of diabetes mellitus, 2002 Jun, *Free Radic Biol Med.* 1;32(11):1143–56.
38. Zochodne DW, Verge VM, Cheng C, Höke A, Jolley C, Thomsen K, Rubin I, Lauritzen M. Nitric oxide synthase activity and expression in experimental diabetic neuropathy; 2000 Sep *J Neuropathol Exp Neurol.*;59(9):798–807
39. Horinaka S, Kobayashi N, Higashi T, Hara K, Hara S, Matsuoka H Nicorandil enhances cardiac endothelial nitric oxide synthase expression via activation of adenosine triphosphate-sensitive K channel in rat. 2001 Aug ;*J Cardiovasc Pharmacol.* 38(2):200–10.
40. Hink HU, Fukai T. Extracellular superoxide dismutase, uric acid, and atherosclerosis; 2002 *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*; 67:483-90
41. Pieper GM, Siebeneich W .Oral administration of the antioxidant, N-acetylcysteine, abrogates diabetes-induced endothelial dysfunction. 1998 Jul ;*J Cardiovasc Pharmacol.*;32(1):101–5.
42. Araujo MT, Barker LA, Cabral AM, Vasquez EC. Inhibition of nitric oxide synthase causes profound enhancement of the Bezold-Jarisch reflex; 1998 Jan ; *Am J Hypertens.*;11(1 Pt 1):66–72

43. Jung O, Marklund SL, Geiger H, Pedrazzini T, Busse R, Brandes RP. Extracellular superoxide dismutase is a major determinant of nitric oxide bioavailability: in vivo and ex vivo evidence from ecSOD-deficient mice;2003 Oct;Circ Res.3;93(7):622–9. Epub 2003 Aug 21
44. Tesfamariam B, Cohen RA. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose 1992 Aug; Am J Physiol.; 263(2 Pt 2): H321–6.
45. Taylor PD, Poston L. The effect of hyperglycaemia on function of rat isolated mesenteric resistance artery. 1994 Nov Br J Pharmacol. ; 113(3):801-8.
46. Tzong-Cherng C, Chen WP, Chi T-Li, Tzong-Fu K , Lee SS, Cheng TJ, Su MJ, Phosphatidylinositol-3-kinase is involved in the antihyperglycemic effect induced by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats : 2007 Life Sciences 80 1713–1720
47. Roberto M, Marcela V, Nicolás R, Montserrat C, Amira PZ, Norma R. : Chronic Administration of Resveratrol Prevents Biochemical Cardiovascular Changes in Fructose-Fed Rats Am J Hypertens 2005;18:864–870
48. Marfella R, Cacciapuoti F, Siniscalchi M, Sasso FC, Marchese F, Cinone F, Musacchio E, Marfella MA, Ruggiero L, Chiorazzo G, Liberti D, Chiorazzo G, Nicoletti GF, Saron C, D'Andrea F, Ammendola C, Verza M, Coppola L. : Red wine in diabetics with previous myocardial infarction R. Marfella et al. Effect of moderate red wine intake on cardiac prognosis after recent acute myocardial infarction of subjects with Type 2 diabetes mellitus; 2006 Diabet. Med. 23; 974–981
49. Bertelli, A, Bertelli, AA. E, Gozzini, A, Giovannini, L. Plasma and Tissue Resveratrol Concentrations and Pharmacological Activity, 1998 Drugs ex. Clin. Res, 24; 133-138.
50. Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ. : Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects; Clin Biochem. 2003 Feb;36(1):79–87.
51. Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE Jr, Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. Drug Metab Dispos. 2004 Dec;32(12):1377-82

52. Inkster ME, Cotter MA, Cameron NE. : Treatment with the xanthine oxidase inhibitor, allopurinol, improves nerve and vascular function in diabetic rats:2007 European Journal of Pharmacology 561; 63-71
53. Andriambeloson E, Magnier C, Haan-Archipoff G, Lobstein A, Anton R, Beretz A, Stoclet JC, Andriantsitohaina R.: Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. J Nutr.1998 Dec;128(12): 2324–33.
54. Andriambeloson E, Kleschyov AL, Muller B, Beretz A, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. Br J Pharmacol. 1997 Mar;120(6):1053-8.
55. Tesfamariam J. A. Jakubowski and R. A. Cohen. Contraction of diabetic rabbit aorta caused by endothelium-derived PGH₂-TxA₂ Am J Physiol Heart Circ Physiol.1989; 257: H1327-H1333
56. Belguendouz L, Fremont L, Linard A. Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins; 1997 May 9; Biochem Pharmacol;53(9):1347-55
57. Claudino M, Ceolin DS, Alberti S, Cestari TM, Spadella CT, Rubira-Bullen IR, Garlet GP, de Assis GF. Alloxan-induced diabetes triggers the development of periodontal disease in rats. : Plos One. 2007 Dec 19;2(12):e1320.
58. Take G, Karabay G, Yazıcı Ac, Erdoğan D. Dişi Sıçanlarda Streptozotosin İle Oluşturulmuş Diyabetin Kalp Kası Üzerine Etkisinin Ultrastrüktürel Düzeyde Gösterilmesi: Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2004 30 (3); 199–204,

9. ÖZGEÇMİŞ

ADI-SOYADI : Mehmet Bilgehan PEKTAŞ
DOĞUM YERİ : Bolvadin/AFYON
DOĞUM TARİHİ : 31.07.1983
T.C. KİMLİK NO : 25783002928

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde 2005 yılından itibaren yüksek lisans programı içerisindeyim. İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden 2005 yılında mezun oldum. Ortaokul ve lise dönemimi Ankara Fethiye Kemal Mumcu Anadolu Lisesi'nde geçirerek buradan 2001 yılında mezun oldum. İlköğrenimimi ise Ankara Çağrıbey İlköğretim Okulu'nda tamamladım.

Lisans döneminde fakülte öğrenci temsilciliği, sağlık bilimleri öğrenci temsilciliği ve öğrenci kulüpler birliği başkanlığı gibi görevler almakla birlikte, 2005 yılı Eczacılık Ödülleri kapsamında öğrenci teşvik kategorisinde 2.lik aldım. Yüksek lisans döneminde yurtiçinde Türk Farmakoloji Derneği'nin düzenlediği 17.Ulusal Farmakoloji Kongresi' ne, yurtdışında ise 7. Uluslararası Koroner Arter Hastalıkları Kongresi'ne katıldım.