

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

Dişi ve erkek sıçanlarda uzun süreli resveratrol tedavisinin endotel hücre reaktivitesi ve eNOS, iNOS ekspresyonları üzerindeki etkilerinin araştırılması

DOKTORA TEZİ

UZM. ECZ. SELEN SÖYLEMEZ

Tez Yöneticisi

Prof. Dr. Fatma AKAR

ANKARA

2007

KISALTMALAR

AT1 Reseptörü	Anjiyotensin tip 1 reseptörü
cDNA	Komplementer DNA
eNOS	Endotel kökenli nitrik oksit sentaz
ER	Estrojen Reseptörü
ET	Endotelin
FSH	Folikül stimüle edici hormon
HDL	Yüksek dansiteli lipoprotein
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
İMA	Internal meme arteri
KCI	Potasyum klorür
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
LH	Lüteinleştirici hormon
L-NAME	N(G)-Nitro-L-arjinin metil ester
L-NNA	L-N ^G -Nitroarjinin
L-NOARG	L-NG-Nitroarjinin
MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinaz
MS	Kütle spektroskopisi
mRNA	Haberci RNA
μg	Mikrogram
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
ng	Nanogram
NOS	Nitrik oksit sentaz

RT-PCR	Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SOD	Süperoksit Dismutaz
s.k.	Subkütan
SH	Standart hata
sGMP	Siklik guanozin monofosfat
U	Ünite
UV	Ultraviyole
VLDL	Çok düşük dansiteli lipoprotein

METİN İÇİNDE GEÇEN ŞEKİLLER VE TABLOLAR

SAYFA NO

ŞEKİL 1. UV varlığında <i>trans</i> -resveratrolün <i>cis</i> -resveratrole dönüşümü	8
ŞEKİL 2. DAD ve MS detektörleri kullanılarak elde edilen standart <i>t</i> -resveratrol kromatogramları	74
ŞEKİL 3. Resveratrol içen sıçanların karaciğer ekstraktlarında <i>t</i> -resveratrol taramasını gösteren kromatogram örneği	74
ŞEKİL 4. Erkek ve dişi sıçanların endotelli aortalarında, asetilkolinin oluşturduğu gevşeme cevapları üzerine uzun süre resveratrol uygulamasının etkisi	79
ŞEKİL 5. İzole organ banyosunda 20 dakikalık L-NOARG (100 µM) inkübasyonun, uzun süre resveratrol içen ve içmeyen erkek ve dişi sıçanların aortalarında oluşturduğu kasılma cevabı	81
ŞEKİL 6. Erkek ve dişi sıçan endotelli ve endotelsiz aortalarında estrogen doz-cevap eğrileri	83
ŞEKİL 7. Uzun süre resveratrol içen ve içmeyen erkek ve dişi sıçan endotelli aortalarında estrogen doz-cevap eğrileri üzerine etkisi	84

- ŞEKİL 8.** Estrojen reseptör antagonisti ICI 182,780'nin, uzun süre resveratrol içen ve içmeyen erkek sıçan endotelli aortalarında estrojenin oluşturduğu gevşeme cevapları üzerine etkisi. 85
- ŞEKİL 9.** Estrojen reseptör antagonisti ICI 182,780'nin, uzun süre resveratrol içen ve içmeyen erkek sıçan endotelli aortalarında estrojenin oluşturduğu gevşeme cevapları üzerine etkisi. 86
- ŞEKİL 10.** Erkek sıçan endotelli ve endotelsiz aortalarında HDL'nin oluşturduğu gevşeme cevapları 89
- ŞEKİL 11.** Dişi sıçan endotelli ve endotelsiz aortalarında HDL'nin oluşturduğu gevşeme cevapları. 90
- ŞEKİL 12 .** Uzun süre resveratrol içen (res-içen) ve içmeyen erkek ve dişi sıçanların endotelli aortalarında HDL doz-cevap eğrileri 91
- ŞEKİL 13.** Erkek ve dişi sıçan endotelli ve endotelsiz aortalarında anjiyotensin II doz-cevap eğrileri. 94
- ŞEKİL 14.** Uzun süre resveratrol içen (res-içen) ve içmeyen erkek ve dişi sıçan endotelli aortasında anjiyotensin II'nin oluşturduğu kasılma cevapları 95

- ŞEKİL 15.** Erkek ve dişi sıçan endotelli aortasında süperoksit ölçümü. Erkek ve dişi sıçan aortasında estrojen (Est, 10^{-6} M), asetilkolin (Ask, 10^{-6} M), HDL(0.01µg/ml) ve resveratrol (Res, 10^{-6} M) uygulamasının süperoksit oluşumuna etkisi. 98
- ŞEKİL 16.** Erkek sıçan endotelli (Kon+E) ve endotelsiz (Kon-E) aortalarında NADPH ve NADH ile süperoksit oluşumunun stimülasyonu 99
- ŞEKİL 17.** Dişi sıçan endotelli ve endotelsiz aortalarında NADPH ve NADH ile süperoksit oluşumunun stimülasyonu. 100
- ŞEKİL 18.** Erkek ve Dişi sıçan endotelli aortalarında angiotensin II varlığında süperoksit oluşumunun stimülasyonu 102
- ŞEKİL 19.** Kontrol ve resveratrol uygulanmış erkek ve dişi sıçan endotelli aortasında eNOS protein ekspresyonları 103
- ŞEKİL 20.** Kontrol ve uzun süreli resveratrol (Res) uygulanmış erkek ve dişi sıçan endotelli aortasında eNOS mRNA ekspresyonları 104

ŞEKİL 21. Dansitometrik Analiz

105

ŞEKİL 22 . Uzun süreli resveratrol içiminin erkek ve dişi sıçanların
plazma (A) ve aortasında (B) nitrit düzeylerine etkisi.

106

TABLO 1. Farklı ülkelerde üretilen kırmızı şaraplardaki t-resveratrol konsantrasyonları	10
TABLO 2. Erkek ve dişi sıçanlarda uzun süreli resveratrol uygulamasının vücut ağırlığı, kan lipid profili ve estradiol düzeyleri üzerine etkisi	75
TABLO 3. Uzun süreli resveratrol uygulamasının erkek ve dişi sıçanların plazma SOD, bakır ve çinko düzeyleri üzerine etkisi	76
TABLO 4. Uzun süreli resveratrol içen ve içmeyen dişi ve erkek sıçanların endotelli aortalarında asetilkolinin EC ₅₀ ve E _{maks} değerleri	80
TABLO 5. Uzun süre resveratrol içen ve içmeyen erkek ve dişi sıçan aortalarında estrogenin EC ₅₀ ve E _{maks} değerleri ve ICI 182,780 preinkubasyonunun bu değerlere etkisi.	87
TABLO 6. Uzun süre resveratrol içen ve içmeyen erkek ve dişi sıçan endotelli aortalarında HDL'nin EC ₅₀ (µg/ml) ve maksimum gevşeme (E _{maks}) değerleri	92
TABLO 7 . Uzun süre resveratrol içen ve içmeyen erkek ve dişi sıçanların endotelli aortalarında angiotensin II' nin EC ₅₀ ve E _{maks} değerleri	96
TABLO 8. RT-PCR deneylerinin Dansitometrik Analizi	105

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA NO</u>
I.GİRİŞ VE AMAÇ	1
II.GENEL BİLGİLER	3
II.A.1. Akdeniz Diyeti	3
II.A.2. Fransız Paradoksu	4
II.B. Resveratrol	6
II.B.1 Resveratrolün Ölçüm Yöntemleri	7
II.B.2. Şaraptaki Resveratrol Miktarı	9
II.B.3. Resveratrolün Farmakokinetiği ve Biyoyararlanımı	11
II.B.4. Resveratrolün Metabolizasyonu	12
II.B.5. Resveratrolün Biyolojik Aktivitesi	15
II.B.5.a. Resveratrolün Vasodilatör Etkisi	15
II.B.5.b. Resveratrolün Antioksidan Aktivitesi	21
II.B.5.c. Resveratrolün İskemi Reperfüzyon Hasarından Koruyucu Etkisi	23
II.B.5.d. Resveratrolün Trombosit Fonksiyonu Üzerine Etkileri	25
II.B.5.e. Resveratrolün Antikarsinojenik Etkisi	26
II.B.5.f. Hepatoprotektif Etki	27
II.B.5.g. Resveratrolün Lipid Profili Üzerine Etkisi	27
II.B.5.h. Resveratrolün Estrojen Reseptörleri Üzerine Etkileri	28
II.C. Diğer Fitoöstrojenik Etkili Bileşikler	29
II.D. Dişi Cinsiyet Hormonu Estrojen ve Biyolojik Etkileri	30

II.D.1. Estrojenlerin Biyosentezi	31
II.D.2. Estrojenlerin Transportu ve Metabolizması	33
II.D.3. Estrojen Reseptörleri	34
II.D.4. Estrojenin Etki Mekanizması	35
II.D.5. Estrojenin Vasküler Etkileri	36
II.D.5.1. Estrojenin Endotel Fonksiyonu Üzerindeki Nongenomik Etkileri	36
II.D.5.2. Estrojenin Genomik Etkileri	42
II.E. Damar Cevaplarındaki Cinsiyet Bağımlı Farklılıklar	44
II.F. Nitrik Oksit	49
II.F.1. Biyosentezi ve Salıverilmesi	49
II.F.2. NO'in inaktivasyonu	50
II.F.3. NO'in etki mekanizması	51
II.F.4. eNOS'un fizyolojik aktivasyonu	51
II.G. Serbest Radikaller	52
II.G.1. Endojen Serbest Radikal Kaynakları	53
II.G.1.a. NAD(P)H Oksidaz	53
II.G.1.b. NOS	54
II.G.2. Serbest Radikal Süpürücü Mekanizmalar	56
II.G.2.a. Enzimatik Antioksidanlar	56
II.G.2.a.i. SOD	56
II.G.2.a.ii. Katalaz	56
II.G.2.a.iii. Glutasyon peroksidaz	57

II.G.2.b. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	57
II.H. HDL	58
III. MATERYAL VE YÖNTEM	59
III.A.1. Kullanılan Deney Hayvanları	59
III.A.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Hazırlanmaları	60
III.A.2.a. İzole Organ Banyosu Deneylerinde ve Süperoksit Ölçümünde Kullanılan Kimyasallar	60
III.A.2.b. PCR Yönteminde Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri	60
III.A.2.c. Western Blotting Yönteminde Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri	60
III.B. ARAÇ VE GEREÇLER	61
III.B.1. Resveratrol Ölçümü	61
III.B.2. <i>In vitro</i> İzole Organ Banyosu Deneyleri	62
III.B.3. Süperoksit Ölçümü	62
III.B.4. RT-PCR Analizi	62
III.B.5. Western blotting yöntemi	62
III.B.6. Nitrit/Nitrat ölçümü	63
III.B.7. Estradiol Ölçümü	63
III.B.8. Lipit profili Ölçümü	63
III.C. YÖNTEMLER	63
III.C.1. Dişi ve Erkek Sıçanların Plazma ve Karaciğer Örneklerinde Resveratrol Analizi	63
III.C.2. Biyokimyasal Ölçümler	63

III.C.2.a. Resveratrol Uygulamasının Lipid Profili Üzerine Etkisi	63
III.C.2.b. Resveratrol Uygulamasının Plazma Estradiol Düzeyleri Üzerine Etkisi	65
III.C.2.c. Resveratrol Uygulamasının Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	65
III.C.2.d. Resveratrol Uygulamasının Serum Bakır ve Çinko Düzeyi Üzerine Etkisi	65
III.C.3. Sıçan Aorta Halkalarının Hazırlanışı	66
III.C.4. Biyoassay Deney Protokolü ve İlaç Uygulamaları	67
III.C.5 Sıçan Aortasında Süperoksit Düzeylerinin Ölçümü	68
III.C.6. Uzun Süreli Resveratrol Tedavisinin eNOS Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Belirlenmesi	69
III.C.7. Uzun Süreli Resveratrol Tedavisinin eNOS mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisinin Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyon Analizi (RT-PCR) ile Belirlenmesi	70
III.C.8. Resveratrol Uygulamasının Nitrit-Nitrat Ölçümü Üzerine Etkisi	71
IV. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	72
V. BULGULAR	73
V.1. Erkek ve Dişi Sıçanlara Uzun Süreli Resveratrol Uygulanmasından Sonra Plazma ve Karaciğer Örneklerinde Resveratrol Düzeylerinin Belirlenmesi	73

V.2. Biyokimyasal Ölçümler	75
V.2.A. Erkek ve Dişi Sıçanlara Uzun Süreli Resveratrol	
Uygulanmasının Vücut Ağırlığı, 17 β -estradiol Düzeyleri	
ve Lipid Profili Üzerine Etkisinin İncelenmesi	75
V.2.B. Erkek ve Dişi Sıçanlara Uzun Süreli Resveratrol	
Uygulanmasının Superoksit Dismutaz Aktivitesi, Plazma	
Bakır ve Çinko Düzeyi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi	76
V.3. <i>İn vitro</i> Damar Cevaplılığın İncelenmesi	77
V.3.A. Dişi ve Erkek Sıçanların Aorta Halkalarında Fenilefrinin	
Vazokonstriktör Etkisi ve Uzun Süreli Resveratrol Uygulanmasının	
Etkisi	77
V.3.B. Dişi ve Erkek Sıçanların Aorta Halkalarında Asetilkolinin	
Endotel-bağımlı Gevşeme Cevapları ve Uzun Süreli Resveratrol	
Uygulanmasının Etkisi	77
V.3.C. Dişi ve Erkek Sıçanların Aortalarında Estrojenin Endotel	
Bağımlı ve Bağımsız Gevşeme Cevapları ve Uzun Süreli	
Resveratrol Uygulanmasının Etkisi	82
V.3.D. Erkek ve Dişi Sıçan Aortalarında HDL'nin Endotel Bağımlı	
Gevşeme Cevapları ve Uzun Süreli Resveratrol Uygulamasının	
Etkisi	88
V.3.E. Erkek ve Dişi Sıçan Aortalarında Anjiyotensin II'nin	
Vazokonstriktör ve Uzun Süreli Resveratrol Tedavisinin Etkisi	92
V.4. Erkek ve Dişi Sıçan Aortalarında Süperoksit Düzeyleri ve	
Akut ve Uzun Süreli Resveratrol Uygulanmasının Etkisi	96

V.5. Erkek ve Dişi Sıçanlara Uzun Süreli Resveratrol Uygulanmasının eNOS Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisinin Western Blotting Yöntemi ile Belirlenmesi	103
V.6. Erkek ve Dişi Sıçanlara Uzun Süreli Resveratrol Uygulanmasının eNOS mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisinin Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyon Analizi (RT-PCR) ile Belirlenmesi	104
V.7. Erkek ve Dişi Sıçanlara Uzun Süreli Resveratrol Uygulanmasının Plazma ve Aorta Nitrit Düzeyleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi	105
VI. TARTIŞMA	107
VII. ÖZET	120
VIII. SUMMARY	125
IX. KAYNAKLAR	129
X. ÖZGEÇMİŞ	176

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Epidemiyolojik çalışmalar, kırmızı şarap tüketiminin yüksek olduğu toplumlarda kalp-damar hastalıkları riskinin düşük olduğunu göstermektedir. Bu ilişki, Fransız toplumunda çok iyi bir şekilde incelenmiştir. Fransızların diyetlerindeki doymuş yağ oranının yüksekliğine rağmen, kalp-damar hastalıklarına yakalanma oranının düşüklüğü “Fransız Paradoksu” olarak adlandırılmaktadır. Yapılan çalışmalar, bu olayın Fransızların yemeklerde kırmızı şarap tüketme alışkanlığından kaynaklandığını göstermektedir.

Kırmızı şarabın içindeki polifenolik bileşiklerden resveratrol, güçlü antioksidan, trombosit ve lökosit fonksiyonunu inhibe edici ve endotel reaktivitesini artırıcı özellikler taşımaktadır. Bu etkileriyle resveratrol, iyi bir antiaterosklerotik ve antihipertansif bileşik profili göstermektedir. Resveratrol, şu anda tıpta ilaç olarak kullanılmamaktadır fakat, onun biyolojik etkileriyle ilgili çalışmalar artan bir ivmeyle sürmektedir. Resveratrol hem estrogen benzeri hem de estrogen antagonisti etkiler göstermektedir, fakat dişilik hormonu estrogenle etkileşimi bilinmemektedir. Doğal estrogenler endotel hücre reaktivitesini artırıcı, vazodilatör ve antioksidan etkili bileşiklerdir. Estrogenlerin bu sayılan özellikleri, kadınların menopoş öncesi dönemde kalp-damar hastalığına yakalanma oranının düşük olmasını iyi bir şekilde açıklamaktadır. Menopoş sonrası dönemde, kadınlarda kalp-damar hastalığı riski erkeklerle eşitlenmektedir.

Bu çalışmada, kırmızı şarabın etkin maddesi resveratrolün dişi ve erkek sıçanlarda, endotel hücre reaktivitesini, endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) ve indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunu ve kan lipid profilini nasıl etkilediğinin araştırılması hedeflenmiştir. 3 hafta boyunca içme suları içinde 50 mg/l resveratrol alan dişi ve erkek sıçanlarda, 17 β -estradiol, asetilkoline ve HDL ye endotel reaktivitesinin ve eNOS ile iNOS ekspresyonunun değişip değişmediği araştırılmıştır. Literatürde, endotel hücre kültürlerinde resveratrolle 36-72 saatlik inkübasyonunun eNOS ekspresyonu ve NOS aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir, fakat uzun süreli resveratrol tedavisinin intakt hayvanların damarlarında eNOS, iNOS ekspresyonunu etkileyip-etkilemediği ve estrogen ile asetilkoline endotel hücre reaktivitesini değiştirip değiştirmediği araştırılmamıştır. Yine bu çalışmada, hem dişi hem erkek sıçanlar kullanarak resveratrol tedavisi süresince, endojen estrogen oluşumunun değişip-değişmediği de incelenmiştir. Ayrıca, resveratrol tedavisi süresince kan lipitlerinden LDL (düşük dansiteli lipoprotein), HDL (yüksek dansiteli lipoprotein) ve kolesterol miktarlarının ne şekilde değiştiği de incelenmiştir.

Bu çalışmanın sonuçları, toplumumuzda yüksek olan kalp-damar hastalığı riskinin düşürülmesine alternatif bir tedavi yaklaşımı getirebilir. Türk toplumunda şarap tüketme alışkanlığı düşüktür. Kırmızı şarabın etkin maddesi olan resveratrol alkolsüz olarak saflaştırılabilir ve koruyucu tıpta kullanılabilir. Halen Batı toplumlarında resveratrol besin destekleyicisi olarak kullanılmaktadır. Resveratrolün yararlı biyolojik etkilerinin ortaya çıkmasıyla kullanım oranı giderek yaygınlaşmaktadır. Türk toplumunda en yüksek ölüm nedeni (%50'ye yakın) olan kalp-

damar hastalıklarından korunmada beslenme şeklinin iyileştirilmesinin önemli bir koruma sağlayacağı öne sürülmektedir. Bu çalışma, resveratrolün biyolojik etkilerinin aydınlatılmasına önemli katkılar sağlayacaktır. Böylece, tıpta neredeyse Türk toplumunun genel hastalığı olarak bilinen koroner kalp hastalıklarının önlenmesinde kullanılabilecek bir ajanın yararlı biyolojik etkilerinin aydınlatılmasında önemli bulgular elde edilmiş olacaktır.

II. GENEL BİLGİLER

II.A.1. Akdeniz Diyeti

Akdeniz bölgesinde yaşayan insanların kronik hastalıklara yakalanma insidanslarının düşük ve ortalama yaşam sürelerinin oldukça uzun olması araştırmacıların ilgisini çekmiş ve yapılan bir takım deneysel çalışmalarla da bunun bölgenin diyetel alışkanlıklarına bağlı olduğu kanıtlanmıştır²²⁶. Temellerini Girit, Yunanistan ve Güney İtalya halkının yemek alışkanlıklarından alan Akdeniz diyetinin kalp krizlerini önleyebildiği ve bazı kanser türlerinin oluşum riskini azaltabildiği uzun yıllar süren çalışmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır. İlk kez 1950-60'lı yıllarda Amerikalıların da içinde olduğu 7 ülkeden 12000 erkeğin yaşam tarzları ve beslenme alışkanlıkları ile ilgili yapılan araştırmada Akdeniz diyeti ilgi çekmeye başlamıştır. Bu araştırma Girit ve Yunanistan'ın bazı bölgelerinde yaşayan erkeklerde koroner kalp hastalığı görülme sıklığının oldukça düşük olduğunu göstermiştir. Buna göre Yunanlı erkeklerde koroner kalp hastalığına bağlı erken ölümler Amerikalı erkeklere göre % 90

daha az oranda görülmektedir²¹⁷. Yapılan başka çalışmada da Akdeniz diyeti ile beslenen koroner kalp hastalarında, ikinci kez kalp krizi görülme riskinin % 70 oranında azaldığı gösterilmiştir⁸⁹.

Yüksek oranda meyve, sebze, rafine edilmemiş doğal tahıllar, ekmek, patates, ceviz, balık ve az yağlı süt ürünleri Akdeniz beslenmesinin temelini oluşturmaktadır. ‘‘Akdeniz Diyeti’’ terimi ile geleneksel olarak zeytin ekiminin yapıldığı İtalya, Yunanistan, İspanya ve Portekiz’in bazı bölgeleri, Güney Fransa’nın bazı bölgeleri, özellikle Fas ve Tunus gibi Kuzey Afrika’nın bazı bölgeleri, Türkiye’nin bazı bölgeleri, bazı Balkan ülkeleri, Lübnan, İsrail ve Suriye gibi Ortadoğu ülkelerinde görülen beslenme tarzı ifade edilmektedir²²⁶.

II.A.2. Fransız Paradoksu

Bazı toplumlarda birtakım hastalıkların çok daha az görülmesi araştırmacıları toplumların beslenme alışkanlıklarını incelemeye sevk etmiştir. Bol yağlı ve kırmızı etten zengin beslenen Fransız toplumu yine oldukça yağlı, fast-food tarzı gıdalarla beslenen Amerikan halkına kıyasla çok daha fazla tereyağı, domuz yağı gibi katı yağlar tüketmektedir²²⁴. Fransız toplumunun ortalama arteriyel kan basıncı ve kan kolesterol düzeyleri Amerikan toplumuna göre daha yüksektir. Bütün bunlara rağmen Amerikan toplumunda kardiyovasküler hastalıklardan ölümlere Fransız toplumundan 2,5 kat daha fazla rastlanmaktadır²²⁰. Ayrıca Fransızlar Amerikan

toplumunda rastlanan kalp krizlerinin ancak % 30'u kadar kalp krizi insidansına sahiptirler. Bu anormal durum “Fransız Paradoksu” olarak adlandırılmaktadır. İki toplum beslenme profili açısından kıyaslandığında aralarındaki en dikkat çekici farklılığın Fransızların çok fazla kırmızı şarap tüketmesi olduğu görülmektedir.

Fransa’da şarap tüketimi ABD’den 7.6, İngiltere ve Kuzey Avrupa ülkelerinden ise 3-13 kat daha fazladır ⁴⁶. Fransız mutfağının yağ ve kırmızı ete bağımlı olmasına rağmen Fransız halkında gözlenen kardiyovasküler morbidite ve mortalite insidanslarındaki dikkat çekici düşüklük Fransızların yemeklerle birlikte tükettikleri kırmızı şaraba bağlanmış ve çalışmaların kırmızı şarap üzerinde yoğunlaşmasına sebep olmuştur. Özellikle kırmızı şarabın kalp hastalıklarına karşı koruyucu olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir ^{88,152}. Tavşanlarda yapılan bir çalışmada bira, beyaz şarap, viski gibi alkollü içeceklerin arasında sadece kırmızı şarabın ateroskleroz gelişimini azaltmakta oldukça etkili olduğu gösterilmiştir ¹²⁰. Renaud ve de Lorgeril alkollü içecek tüketiminin en yararlı olanının kırmızı şarap tüketimi olduğunu göstermişlerdir ¹⁷⁸.

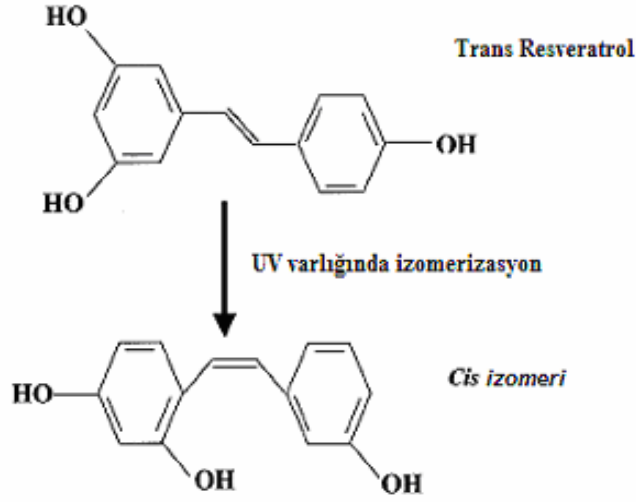
II.B. Resveratrol

Bitkisel kaynaklı çeşitli yiyecek ve içecekler bitkiler tarafından hasara ya da fungal ataklara karşı sentezlenen birtakım non-flavonoid yapıda fenolik bileşikler içermektedirler. Bunlar arasında resveratrol; stilben fitoaleksinlerin ana aktif bileşiği olarak belirlenmiştir. Resveratrol (3,4',5-trihidroksistilben, $C_{14}H_{12}O_3$, M.A: 228,25 gram) kimyasal olarak flavonoid yapıda, polifenolik, steroid olmayan bir bileşik olup estrogen benzeri biyolojik aktiviteye sahiptir. Arichi ve ark., *Polygonum Cuspidatum* adlı bitkinin kurutulmuş köklerinin geleneksel Japon ve Çin tıbbında “Kojo-kon” adı verilen drog olarak kullanıldığını belirtmiştir. Kojo-kon “Itadori” olarak da adlandırılmış ve mantar hastalıkları, inflamasyon, kalp, karaciğer ve damar hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır ve bütün bu yararlı etkilerden *Polygonum Cuspidatum*'un primer aktif bileşeni olan resveratrolün sorumlu olduğu gösterilmiştir⁶. Resveratrol, *Polygonum Cuspidatum*'dan başka üzüm, yer fıstığı ve ananasda da bulunmaktadır. *Trans*-resveratrol ilk olarak 1976 yılında Langcake ve Pryce tarafından asma yapraklarında (*Vitis vinifera*) tespit edilmiştir ve bileşiğin fungal enfeksiyona (*Botrytis cinerea*) veya ultraviyole (UV) ışığa maruziyete cevap olarak yaprak dokuları tarafından sentezlendiği gösterilmiştir¹²⁶. Bitkiler ayrıca resveratrolün glukozid formunu da sentezlemektedir. Resveratrol-3-o-β-D-glukozid, piceid olarak adlandırılmaktadır.

II.B.1. Resveratrolün Ölçüm Yöntemleri

Resveratrolün yararlı birçok farmakolojik etkilerinin tespit edilmesinin ardından araştırmacılar resveratrolün çeşitli bitki ekstraktları, şarap, serum ve dokuda analiz edilebilmesi için analitik yöntemler geliştirmişlerdir. Geliştirilmiş olan bu metodların çoğu Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve UV absorbanı üzerine dayanmaktadır^{184,239}. Bunların dışında florimetrik ve elektrokimyasal yöntemler, kapiller elektroforezi, gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi yöntemleri kullanılarak da resveratrolün analizi yapılabilmektedir²³⁹. Şarapta resveratrol analizi için en sık kullanılan yöntemler HPLC-kütle spektroskopisi veya gaz kromatografisidir. Resveratrol (3,4',5-trihidroksistilben), *cis*- ve *trans*- izomerleri şeklinde bulunmaktadır¹⁶⁸. Resveratrol izomerlerinin maksimum UV absorbanlarının farklı olmasına dayanılarak ayrımları gerçekleştirilmektedir. HPLC metodunda genellikle C₁₈ ters faz kolonu kullanılmakta ve *trans*-resveratrol 307 nm'de *cis*-resveratrol ise 280 nm'de ölçülmektedir¹⁹⁷.

Resveratrolün doğal kaynaklardan elde edilmesi hem zaman açısından kayba hem de maddenin daha düşük miktarlarda elde edilmesine neden olmaktadır. Araştırmalar molekülün kimyasal yolla sentezi üzerine yoğunlaşmış ve *trans*-resveratrol elde edilmiştir. *Trans*-resveratrolün UV irradyasyonu ile *cis*- formu elde edilmektedir¹⁹⁷ (Şekil 1). Yapılan çalışmalar, *trans*-resveratrolün ışıktan korunduğu takdirde stabilitesini koruduğunu göstermektedir²¹⁶.



Şekil 1. UV varlığında *trans*-resveratrolün *cis*-resveratrole dönüşümü

Resveratrolün *trans*- izomerinin biyolojik aktivitesinin *cis*- izomerine göre daha yüksek olduğu saptanmıştır^{13,161}. Fakat üzüm ekstralarında *cis*- izomeri bulunmamaktadır^{102,126,180,197,208,203}. *Trans*-resveratrol yapı olarak dietilstilbestere ve 17 β -estradiol'e benzemekte olup miks estrogenik, agonist/antagonist, özelliklere sahiptir^{27, 42}.

Üzümde elde edilen kırmızı şarapların beyaz şaraplara göre daha yüksek oranda resveratrol içerdiği saptanmıştır. Kırmızı şaraplarda resveratrol miktarı, şarabın elde edilmesi sırasında üzümün kabuklarının da kullanılması ve maserasyon süresinin uzun olmasından dolayı artmaktadır⁶⁵.

II.B.2. Şaraptaki Resveratrol Miktarı

Resveratrolün kırmızı şaraptaki varlığı ilk olarak Siemann ve Creasy tarafından 1992 yılında gösterilmiştir¹⁹⁷. Bu araştırmacılar resveratrolün kırmızı şarabın biyolojik olarak aktif bileşeni olabileceğini öne sürmüşlerdir. O zamandan günümüze kadar resveratrolün özellikleri yaygın bir şekilde araştırılmaya devam etmektedir. Şarapların resveratrol içeriği çeşitlilik göstermektedir. Üzümün cinsi, yetiştiği bölge, coğrafi özellikler, şarabın tipi, Botrytis enfeksiyonuna bağlı olarak resveratrol içeriğinde farklılıklar gözlenmektedir. Resveratrol üzümün etli kısmı değil kabuğu tarafından sentez edildiği için kabuklarla temasın olduğu fermentasyon süresi şaraptaki resveratrol miktarı için belirleyicidir¹⁰². Bu yüzden de daha kısa maserasyon süresine sahip beyaz şaraplar daha düşük konsantrasyonlarda resveratrol içermektedir¹⁹⁷.

Tablo 1. Farklı ülkelerde üretilen kırmızı şaraplardaki t-resveratrol konsantrasyonları

Ülke	Şarap	t-Resveratrol konsantrasyonu (mg/l)
Amerika ⁶⁵	Chardonnay California Cabernet Sauvignon	0.1 3 0.09
Fransa ⁶⁵	Bordeaux Pinot noir Chardonnay blanc	0.3-0.6 0.4-0.2 1.84
İspanya ^{124,125,164}	Trempanillo-Pinot noir Merlot Pinot noir Grenache	1.3-5.1 7.74 5.13 2.43
İtalya ^{127,138}	Recioto-Amarone Pinot noir Alto Adigo Valpolicella	0.05-0.8 7.15 5.44 2.42
Macaristan ⁴⁷	Blauburger	3.10
Portekiz ¹⁷⁵	Alentejo region	2.64
Türkiye ⁵²	Doluca KAV Boğazkere Öküzgözü 2002 Pamukkale Öküzgözü 2002 Kavaklıdere Cabernet Sauvignon	0.23 0.24 0.18

II.B.3. Resveratrolün Farmakokinetiği ve Biyoyararlanımı

Sıçanlarda yapılan çalışmalarda oral olarak verilen resveratrolün barsaklardan hızla absorbe edilip sistemik dolaşıma girdiği yaklaşık 15-30 dakika sonra plazmada en yüksek konsantrasyona ulaştığı, kalp ve karaciğere yüksek afinite gösterdiği^{20,21} ve yarı ömrü yaklaşık 1,5 saat olan glukuronidlere metabolize edildiği gösterilmiştir¹³⁶. Sıçan perfüze ince barsaklarında yapılan bir çalışmada resveratrolün biyoyararlanımı % 20.5 olarak bulunmuştur². Vitrac ve ark., fare dokularında [¹⁴C]

işaretleli *trans*-resveratrolün oral uygulanmasından sonra dağılımını incelemişler ve en yüksek radyoaktivitenin karaciğerde olduğunu göstermişlerdir²²⁷. Kaldas ve ark.'nın yaptığı bir başka çalışmada da resveratrolün Caco-2 hücrelerinde yüksek oranda akümüle olduğu gösterilmiş ve barsak hücresinin resveratrolün majör biyolojik hedef dokusu olabileceği ileri sürülmüştür¹⁰⁷. Bertelli ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada da sıçanlara gastrik entübasyonla 86 µg/kg resveratrol uygulanmış ve resveratrolün kan ve çeşitli dokulardaki miktarları ölçülmüştür. Bu çalışmanın sonucunda plazmada 20.2 ng/ml, karaciğerde 20.7 ng/g, kalpte 2.2 ng/g ve böbrekte 20 ng/g konsantrasyonlarında resveratrol bulunduğu saptanmıştır. Yine aynı çalışmada 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 gösterilmiştir²⁰.

Sağlıklı gönüllülerde yapılan bir çalışmada resveratrol 25 mg/70kg (360 µg/kg) dozunda üzüm suyunda, sebze suyunda ve şarapta çözülerek (bu doz normal şarap içimiyle alınabilecek resveratrolün 20 katı) gönüllülere uygulanmıştır⁷³. Çalışmada gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi yöntemi kullanılmış ve alımdan 30 dk sonra resveratrolün plazma doruk konsantrasyonu 40nM ve total resveratrol ve konjugatlarının plazma doruk konsantrasyonu 2µM olarak bulunmuştur. Şaraptaki ortalama resveratrol miktarı yaklaşık 5mg/l'dir. Ortalama şarap tüketimi göz önüne alınacak olursa (70 kg birey/250 ml=1 kadeh) insanlarda şarapla alınan resveratrol miktarı yaklaşık 18/µg/kg/gün olmaktadır. Walle ve ark.'nın 6 sağlıklı gönüllü üzerinde yaptığı bir çalışmada da [¹⁴C] işaretleli 25 mg resveratrolün oral ve 0.2 mg i.v. olarak

verilmesinden sonra resveratrol ve metabolitlerinin plazmadaki doruk düzeyleri 2µM olarak ve değişmemiş resveratrol plazma konsantrasyonu ise <5ng/ml olarak bulunmuştur²²⁹.

II.B.4. Resveratrolün Metabolizasyonu

Sıçanlarda yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre oral alınan resveratrolün plazmadan eliminasyon yarı ömrünün 12-15 dakika olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalarda resveratrol 2 mg/kg¹⁰⁵ ve 50 mg/kg dozlarında sıçanlara¹³⁶, 20 mg/kg dozunda farelere⁷ intragastik olarak verilmiş ve plazmada ulaştıkları doruk konsantrasyon değerleri sırasıyla 0.5, 1.2, 6.6 µM olarak bulunmuştur. Sıçan ve farelerde yapılan çalışmalarda resveratrolün iyi bir şekilde absorbe edildiği ve karaciğer ve barsak epitel hücrelerinde hızla glukuronid ve sülfat konjugatlarına dönüştürüldüğü gösterilmiştir^{2,204,227,242}. Sıçanlarda işaretli resveratrolün oral olarak uygulanmasıyla dozun %50-75'i absorbe olmaktadır. Resveratrol glukuronidin plazmada ulaştığı doruk konsantrasyon düzeyi 105 µM olarak bulunmuş ve resveratrolün yoğun bir biçimde enterohepatik sirkülasyona maruz kaldığı gösterilmiştir²⁰⁴. Perfüze sıçan ince barsaklarında resveratrolün % 16.8'i resveratrol glukuronide, % 3.4'ü resveratrol sulfata dönüşmüş ve % 0.3'ü serbest resveratrol olarak bulunmuştur². Sıçan izole ince barsaklarında 200 µM resveratrol perfüzyonununundan sonra jejunum ve ileumda resveratrolün büyük oranda glukuronid konjugatına dönüştüğü ve sistemik dolaşıma katıldığı gösterilmiştir¹¹³. Resveratrolün insan, rodent karaciğer ve barsak hücrelerinde

glukuronid ve sülfat konjugatlarına dönüştüğü gösterilmiştir²⁴². Bütün bu çalışmalar dikkate alındığında resveratrol sıçan ve farelerde gastrointestinal yoldan yüksek miktarlarda absorbe edilmekte, karaciğer ve barsakta konjugasyon ile metabolize edilmektedir. Sıçanlarda 50 mg/kg gibi yüksek oral dozun uygulanmasından sonra metabolize olmamış resveratrolün doruk konsantrasyonu 10 µM'ın altına düşmekte ve eliminasyonu oldukça hızlı olmaktadır. Aksine resveratrolün konjugatları esas moleküle göre daha yüksek plazma düzeyine ulaşmaktadırlar¹³⁶.

Meng ve ark.'nın yaptıkları bir çalışma 30-50 yaş arasındaki erkek gönüllüler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bir gruba 0.03 mg/kg , 0.5 mg/kg veya 1 mg/kg viskide çözünmüş resveratrol içirilmiştir. Diğer bir gruba da 0.16 mg/100 ml resveratrol içeren üzüm suyundan 200, 400, 600, 1200 ml verilmiştir ve idrar örnekleri toplanmıştır. LC-MS/MS analizi ile idrarda resveratrolün bulunduğu gösterilmiştir. 0.03 mg/kg dozunda ilk 2-3 saat içinde resveratrolün büyük kısmının itrah edildiği 1 mg/kg dozunda resveratrol uygulamasında ise resveratrolün itrahının 7-10 saat arasında gerçekleştiği gösterilmiştir¹⁴³.

Resveratrolün suda çözünürlüğü oldukça düşüktür bu yüzden serumda yüksek konsantrasyonlarda bulunabilmesi için ya konjuge olmalı ya da proteinlere bağlanmalıdır¹⁵. Albumin plazmada resveratrolü taşıyan moleküllerden biridir¹⁰¹. Plazmada resveratrolün lipoproteinlerle de etkileştiği gösterilmiştir¹⁶.

Resveratrolün toksik etkilerini araştırmak için, Sprague-Dawley sıçanlara 20 mg/kg dozda resveratrol oral olarak 28 gün boyunca verilmiş ve hematolojik, biyokimyasal ölçümler ve organlarda histopatolojik ölçümler yapılmıştır. Hepatik toksistenin göstergesi olan ALT ve AST enzim düzeyleri ve ölçülen diğer hematolojik, biyokimyasal ve histopatolojik parametreler resveratrol alımından etkilenmemiştir ¹⁰⁶.

II.B.5. Resveratrolün Biyolojik Aktivitesi

II.B.5.a. Resveratrolün Vazodilatör Etkisi

Fitzpatrick ve ark, 1 μ M fenilefrin ile prekontrakte edilen erkek Sprague-Dawley sıçan izole aortalarında 1/1000 dilüsyonunda uygulanan kırmızı şarap ekstrelerinin gevşeme oluşturduğunu göstermişlerdir. Endotelsiz dokuda ise gevşeme gözlenmemiştir. NOS inhibitörleri L-NMMA ve L-NNA ile üzüm kabuğu ekstrelerinin oluşturduğu gevşemeler ortadan kalkmış ve L-arjinin ile tekrar gevşeme meydana gelmiştir. Bu endotel bağımlı farklılık etkide NO'nin rolünü düşündürmüştür⁵⁸. Andriambeloson ve ark., erkek Wistar sıçan endotelli ve endotelsiz aortalarında kırmızı şarap ekstrelerinin etkisini incelemişlerdir. Sırasıyla 0.3 ve 0.1 μ M noradrenalinle kastırılan endotelli dokularda 10 mg/l konsantrasyondaki şarap ekstresiyle gevşeme gözlenirken endotelsiz dokularda ise 1000 kat daha yüksek konsantrasyonda gevşeme gözlenmiştir. Endotelli dokularda gevşeme cevabı 300 μ M L-NAME ile ortadan kalkarken endotelsiz dokularda L-NAME herhangi bir etki oluşturmamıştır ³.

Polifenoller içerisinde resveratrolün etkili bir vasküler düz kas gevşetici olduğu düşünülmektedir. Endoteli sağlam sıçan aortasında yapılan bir çalışmada resveratrolün noradrenalin ve fenilefrin ile oluşan kasılmaları inhibe ettiği gösterilmiştir. Noradrenalin ile kastırılan endotelli aortalarda resveratrol 3×10^{-5} M ve daha yüksek konsantrasyonlarda kasılmaları anlamlı şekilde azaltmış ancak $1 \mu\text{M}$ L-NNA ile inkübasyon yapıldığında resveratrolün bu kasılmayı azaltıcı etkisi ortadan kalkmıştır. 10^{-5} M fenilefrin ile prekontrakte edilen dokularda ise resveratrol 10^{-5} M ve üzerindeki konsantrasyonlarda gevşeme oluşturmuş ve bu gevşeme $1 \mu\text{M}$ L-NNA ile ortadan kalkmıştır. 6×10^{-5} M'dan daha yüksek konsantrasyonlarda ise resveratrolün endotelsiz dokularda da gevşeme oluşturduğu ve bu gevşemenin L-NNA inkübasyonundan etkilenmediği gösterilmiştir³⁸. Dişi kobay mezenterik ve uterus arterlerinde yapılan bir çalışmada, $5-70 \mu\text{M}$ resveratrolün, noradrenalin ($10 \mu\text{M}$) veya KCI (125 mM) ile prekontrakte edilen dokularda konsantrasyon bağımlı gevşemeleri indüklediği gösterilmiştir. $10 \mu\text{M}$ L-NAME ile uterus arterinde gevşemeler anlamlı olarak azalmış, $50 \mu\text{M}$ indometazin ise resveratrolle oluşan gevşemeleri bloke etmemiş fakat noradrenalin ile kastırılan uterus arterlerinde resveratrolün gevşetici etkisini arttırmıştır. Resveratrolün rezistans arterlerdeki etkisinin kondüktans arterlerdekinden daha büyük olduğu, etkisinde NO in rol oynayabileceği ama prostanooidlerin rolünün olmadığı ve östrus döneminin resveratrolün oluşturduğu gevşemeleri etkilemediği gösterilmiştir¹⁵⁰. Obez ve normal sıçan mezenterik artelerinde yapılan bir çalışmada, $8 \mu\text{M}$ noradrenalin veya $125 \mu\text{M}$ KCI ile kastırılan normal ve obez sıçanların endoteli sağlam aortalarında resveratrol ($5-35 \mu\text{M}$) konsantrasyon bağımlı gevşeme meydana

getirmiştir. 100-300 μM L-NAME ile normal sıçanların endoteli sağlam aortasında resveratrolün oluşturduğu gevşemeler kısmen inhibe olurken, obez sıçanların endoteli sağlam aortasında L-NAME resveratrolün oluşturduğu gevşemeyi etkilememiştir. Endotelin tahrip edilmesi de obez sıçan aortasında resveratrolün oluşturduğu gevşemeyi ortadan kaldırmamıştır. Obez sıçanlarda resveratrolün oluşturduğu gevşemeler endotelden ve NO'den bağımsız olarak gerçekleşmektedir¹⁵¹. Jager ve ark., 10^{-5} M histamin ile prekontrakte edilen domuz koroner arterlerinde resveratrolün ($\text{EC}_{50}=4.5$ μM) vazodilatör etkisini göstermişlerdir⁹⁹. Li ve ark., resveratrolün insan umbilikal ven endotel hücre kültürlerinde ($\text{EC}_{50}=20$ μM) Ca^{+2} ile aktive olan K^{+} akımları üzerinde stimülan etkileri olduğunu bildirmişlerdir¹³². Daha sonra Orallo ve ark., resveratrolün Wistar sıçan aortasında vazodilatör etkisinin endotel bağımlılığını incelemiştir. Bu çalışmada resveratrolün 10^{-6}M konsantrasyon ve üzerinde gevşeme oluşturduğu, endotelsiz dokuda ise gevşeme oluşturmadığı gösterilmiştir. 100 μM L-NOARG ile gevşemeler tamamen ortadan kalkmıştır. Resveratrolün endotel bağımlı gevşetici etkisinin, vasküler NADH/NADPH oksidaz inhibisyonu ile bazal hücre süperoksit radikal oluşumunu ve NO biyotransformasyonunu azaltması sonucu olduğu ileri sürülmüştür¹⁶⁰. İnsan safen ven ve internal meme arterinde (İMA) yapılan bir çalışmada 70 μM resveratrol ile noradrenalin kasılmalarının anlamlı şekilde azaldığı ve endotel kazınması ve 10^{-4} M L-NOARG ile İMA'da resveratrolün oluşturduğu gevşemenin tamamen, safen ven de ise kısmen ortadan kalktığı gösterilmiştir. 10^{-5} M indometazin ise hem İMA hem de safen vende resveratrolün oluşturduğu gevşemeleri etkilememiştir. 20 μM resveratrol inkübasyonu ile asetilkolin gevşemeleri her iki dokuda anlamlı şekilde artmıştır. 10^{-4} M L-NOARG ile asetilkolin gevşemeleri

tamamen ortadan kalkmıştır. Resveratrolün safen vende kısmen, İMA da ise büyük ölçüde endotel bağımlı ve NO aracılıklı vazodilatasyon oluşturduğu ve resveratrolün endotel işlevini artırdığı gösterilmiştir¹⁷⁴. Bu çalışmalarda resveratrolün endotel bağımlı gevşetici etkisinin nitrik oksit aracılıklı olduğu saptanmıştır.

İzole domuz koroner arterlerinde resveratrolün vazodilatör etki mekanizmasını incelemeye yönelik yapılan bir çalışmada 30 mM KCI ile prekontrakte edilen dişi ve erkek endotelli ve endotelsiz domuz koroner arterlerinde 1-100 μ M resveratrolün etkisi 100 μ M L-NNA, 10 μ M tamoksifen (estrogen reseptör antagonisti), 10 μ M sodyum ortovanadat (tirozin fosfataz inhibitörü), 10 μ M indometazin (siklooksijenaz inhibitörü), 10 μ M propranolol (β -adrenoseptör antagonisti), veya 10 μ M sikloheksimidin (protein sentez inhibitörü) 20 dakika preinkübasyonundan sonra incelenmiştir. Resveratrolün endotelli dokuda oluşturduğu gevşetici etki endotelsiz dokuya göre daha yüksek bulunmuştur. L-NNA inkübasyonu ile de resveratrolün oluşturduğu gevşemeler azalmıştır. 10 μ M indometazin ve 10 μ M propranolol inkübasyonu resveratrolün oluşturduğu gevşemeleri etkilememiştir. Vazodilatör prostanooidlerin ve β -adrenoseptörlerin domuz izole koroner arterlerinde resveratrolün gevşetici etkisinde rol almadığı gösterilmiştir. Tirozin fosfataz inhibitörü olan 10 μ M sodyum orto vanadatın preinkübasyonu sonucu resveratrolle oluşan gevşemenin kısmen azaldığı gösterilmiş ve bu azalma sodyum orto vanadatın tirozin fosforilasyon bağımlı mekanizmalar yoluyla eNOS aktivitesini azaltabilme yeteneğine bağlanmıştır. 10 μ M tamoksifen veya 10 μ M sikloheksimid preinkübasyonu da resveratrolün vazodilatör etkisini etkilememiştir. Bu da, resveratrolün akut vasodilatör etkisinde estrogen

reseptörlerinin rol almadığını ve bu gevşetici etkinin genomik mekanizmalardan bağımsız olarak gerçekleşmesine bağlanmıştır¹³³. Yine bu çalışmada resveratrol doz bağımlı olarak (1-50 μ M) KCI kontraksiyonlarını inhibe etmiştir. 30 μ M resveratrol inkübasyonu ise kalsiyum doz cevap eğrisini sağa kaydırmış ve maksimum kasılma cevabını azaltmıştır. Bu verilerden resveratrolün kalsiyum antagonisti özelliğe sahip olduğu ve voltaj bağımlı kalsiyum kanallarından ekstraselüler kalsiyum geçişini inhibe edebileceği sonucu çıkarılabilir¹³³. Sıçan aortasında yapılan bir başka çalışmada resveratrolün vasküler tonüs üzerindeki etkisi incelenmiştir. 0.1 mM resveratrol sıçan endotelsiz aortasında (10-60 mM) KCI ile stimüle edilen kontraksiyonları inhibe etmiştir. Aynı şekilde, 0.1-100 μ M CaCl_2 ile oluşan kontraksiyonlar da 0.1 mM resveratrol ile inhibe olmuştur. Kalp kapağı endotelinde de resveratrolün kalsiyum üzerine etkisi incelenmiştir. Kalp kapağı endotelinde 10 μ M asetilkolin, kalsiyum düzeylerinde belli bir artış meydana getirmiş fakat, 0.1 mM resveratrol inkübasyonu ile kalsiyum düzeyleri anlamlı olarak yükselmiştir. Resveratrolün endotel bağımlı gevşetici etkisinin, endotel hücrelerinde $[\text{Ca}^{+2}]_i$ düzeylerindeki artışa bağlı olduğu, fakat, vasküler düz kas kontraksiyonundaki direkt inhibisyon yapıcı etkisinin Ca^{+2} duyarlılığındaki azalmaya bağlı olarak gerçekleşebileceği belirtilmiştir³². Koyun koroner arterlerinde yapılan bir çalışmada resveratrolün konsantrasyon bağımlı (10^{-8} - 10^{-4} M, EC_{50} : 3 μ M) olarak cGMP oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir⁵⁴. cGMP oluşumundaki bu artışın fosfodiesteraz enzimi ile ilişkisi incelenmiş ama IBMX, zaprinast gibi fosfodiesteraz enzim inhibitörlerinin resveratrolün cGMP düzeylerini arttırmasında bir rolü olmadığı gösterilmiştir. Resveratrolün guanil siklaz enzimini stimüle ederek cGMP düzeylerini arttırdığı ve böylece resveratrolün endotel bağımsız gevşetici etkisinde rol

oynayabileceği ileri sürülmüştür. cGMP artışı ile Ca^{+2} duyarlılığındaki azalma arasında ilişki kurulabilir. cGMP/cGMP bağımlı protein kinaz mekanizması ile intraselüler kalsiyum düzeylerinde azalma, miyozin hafif zincir kinaz fosforilasyonunun inhibisyonu, potasyumun hücre dışına atılmasında ve membran repolarizasyonunda artış yollarıyla damarlarda gevşeme meydana gelmektedir⁵⁴. Novakovic ve ark., 1 μM fenilefrin ile kastırılan sıçan endotelsiz aortasında ve 10 μM fenilefrin ile kastırılan endotelsiz İMA'da resveratrolün 1-100 μM konsantrasyon aralığında doz bağımlı gevşeme oluşturduğu (Emaks: $100 \pm 1\%$, EC_{50} : 5.30; Emaks $83 \pm 1\%$, EC_{50} : 4.38) ve bu gevşemede voltaj bağımlı potasyum kanallarının rol oynadığını göstermişlerdir^{157,158}.

Endotelin, kardiyovasküler bozuklukların endojen mediyatörleri arasında yer almaktadır. İnsanlarda ve hayvanlarda yapılan çalışmalarda endotelin düzeyinin kardiyovasküler hastalıklarda arttığı ve endotelin reseptör blokörlerinin kullanılmasının bu hastalık komplikasyonlarını azalttığı gösterilmiştir²³⁴. Domuz koroner arter düz kas hücrelerinde, resveratrolün (IC_{50} : 37 μM) MAPK aktivitesini inhibe ettiği ve endotelin-1'in stimulan etkilerini bloke ederek koroner arter düz kasına nükleer translokasyonunu önlediği gösterilmiştir⁵³. Oksidatif stres endotelin-1 oluşumunu ve otokrin endotelin-1 aktivitesini vasküler düz kas hücrelerinde arttırmaktadır. Bu etki 100 μM resveratrol ile inhibe edilmektedir¹⁸⁵. Hiperkolesterolemik tavşanlarda, 3mg/kg/gün 12 hafta boyunca uygulanan resveratrol tedavisinin plazma endotelin-1 düzeylerini düşürdüğü ve plazma NO düzeylerini artırdığı gösterilmiştir²⁴⁶. Resveratrol 2-4 mg/kg miktarlarda intragastrik olarak 5 hafta boyunca verildiğinde endotel kazınması sonucu ortaya çıkan intimal hiperplaziyi belirgin olarak zayıflatmaktadır. Aynı çalışmada kültüre edilmiş

tavşan damar düz kas hücrelerinde DNA sentezinin, resveratrolle doz bağımlı olarak inhibe edildiği gösterilmiştir²⁴⁵.

İnsan umbilikal ven endotel hücrelerinde, 2 dakikalık resveratrol inkübasyonun akut olarak NOS aktivitesini artırdığı gösterilmiştir²³⁰. Yalnız bu akut etkinin mekanizması bilinmemektedir. Sığır pulmoner arter endotel hücre kültürlerinde 50-100 µM resveratrolün eNOS ekspresyonunu 3 kat artırdığı bulunmuştur⁹² ama 10 µM dozunda bir etki gözlenmemiştir. Resveratrolün konsantrasyon bağımlı olarak insan umbilikal ven endotel hücre kültürlerinde 24-72 saat inkübasyonla eNOS mRNA ekspresyonunu 2.8 kata kadar artırdığı gösterilmiştir²³⁰. eNOS protein ekspresyonu ve eNOS kökenli NO oluşumu da paralel olarak artmıştır. Leikert ve ark., insan umbilikal ven endotel hücre kültürlerinde 20 saat boyunca kırmızı şarap polifenollerinin inkübasyonu ile konsantrasyon bağımlı olarak (100-600 µg/ml), NO düzeylerinde ve eNOS protein düzeylerinde artış olduğunu göstermişlerdir¹²⁹. eNOS düzeyleriyle birlikte endotel kaynaklı NO salıverilmesinin artışının, resveratrolün veya polifenollerin uzun dönem kardiyovasküler koruyucu etkilerinin nedeni olabileceği ileri sürülmüştür. Wallerath ve ark., insan umbilikal ven endotel hücre kültürlerinde yaptıkları bir çalışmada, kırmızı şarabın içindeki çeşitli polifenolik bileşiklerin de eNOS ekspresyonuna katkıda bulunduklarını fakat, en büyük etkinin resveratrole ait olduğunu göstermişlerdir²³¹.

Tsai ve ark., makrofajlarda, resveratrolün iNOS mRNA ekspresyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir²¹⁸. Sıçan makrofaj hücrelerinde 60 µM resveratrol ile

iNOS mRNA ekspresyonunun inhibe olduğu gösterilmiştir³⁴. 7 gün boyunca 2.5 mg/kg resveratrolle beslenmiş sıçan kalplerinde iNOS ve eNOS ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir⁵⁰.

Resveratrol, NO ile birçok ortak fizyolojik özellik göstermektedir. Örneğin, hem resveratrol hem de NO antiinflamatuvar ve antiplatelet aktiviteye sahiptir^{29,100} ve damarlar üzerinde vazodilatör etki gösterir^{38,160,150,174}. NO gibi resveratrol de peroksil radikallerinin güçlü bir süpürücüsüdür^{49, 176}. NO ve resveratrol *in vivo* potent antioksidan aktivite gösterirler ve lipid peroksidasyonunu önleyebilirler. Resveratrolün NO'nin biyoyararlanımını artırması ve ikisinin de ortak fizyolojik fonksiyonları paylaşması resveratrolün koruyucu etkilerini NO aracılığı ile gösterdiğini düşündürmektedir³⁶.

II.B.5.b. Resveratrolün Antioksidan Aktivitesi

Frankel ve ark., kırmızı şarapta bulunan polifenolik bileşiklerin LDL'nin oksidasyonunu engellediğini göstermiştir⁶². LDL proteinlerinin yapısındaki doymamış yağ asitlerinin (PUFA) oksidasyonunun aterosklerozda major rol oynadığına inanılmaktadır. Oksidasyon LDL nin protein kısmını (apo B) etkilemekte ve apoB/E reseptör sistemi tarafından katabolizmasını bozmaktadır¹⁵. Fenolik bileşiklerden zengin gıdaların aterosklerozda koruyucu rolünün onların antioksidan özelliğine bağlı olduğu ileri sürülmüştür¹⁷⁹. İnsan LDL sine eklenen *trans*-resveratrolün bakırla katalizlenen oksidasyonu önlediği gösterilmiştir. 10 µmol/L resveratrol konsantrasyonunun LDL

peroksidasyonunu kırmızı şarabın polifenolik eksraktına göre daha güçlü şekilde inhibe ettiği bildirilmiştir⁶³.

Kırmızı şarabın polifenolik ekstraktlarından resveratrol, epikateşin ve kersetinin karşılaştırıldığı bir çalışmada resveratrolün epikateşin ve kersetinden daha güçlü bir şekilde LDL peroksidasyonunu önlediği gösterilmiştir⁶³. Resveratrolün LDL oksidasyonunu önleyici etkisinin, esas olarak bakırla şelasyon sonucu ortaya çıkan serbest radikal süpürücü etkiden kaynaklandığı anlaşılmıştır¹⁵. Enzimatik olmayan ve NADPH bağımlı peroksidasyonun, resveratrol ile kersetinden üç kat daha düşük konsantrasyonlarda %50 oranında inhibe edildiği gösterilmiştir²⁵. *Trans*-resveratrolün vitamin C ve vitamin E ile kombinasyonu, okside lipoproteinlerle oluşturulan hücre ölümünü, bu antioksidanların tek başlarına kullanılmalarından çok daha etkin bir şekilde önlemektedir³⁷. Resveratrol içeren üzüm çekirdeği ekstrelerinin glial hücreleri oksidatif strese karşı koruduğu gösterilmiştir¹⁸³. Orallo ve ark., sıçan aorta homojenatlarında 1-10 µM resveratrolün 100 µM NADH/NADPH oksidaz ile stimüle olan süperoksit oluşumunu ortadan kaldırdığını ve böylelikle, NO'in inaktive olmasını önlediğini fakat hipoksantin/ksantin oksidaz sistemini etkilemediğini göstermişlerdir. Sıçan aortasında resveratrolün endotel-bağımlı gevşetici etkisi onun, vasküler dokularda süperoksit oluşumunun ana kaynaklarından biri olan vasküler NAD(P)H oksidaz üzerindeki inhibitör etkisine bağlanmıştır¹⁶⁰. Ayrıca nitrat toleransı oluşturulmuş insan IMA dokusunda 1-10 µM resveratrol bazal veya NAD(P)H ile stimüle olan süperoksit oluşumunu neredeyse tamamen ortadan kaldırmıştır⁴³.

II.B.5.c. Resveratrolün İskemi Reperfüzyon Hasarından Koruyucu

Etkisi

Erkek sıçanlarda yapılan çalışmalarda alkolsüz kırmızı şarap ekstresinin ve resveratrolün kalbi iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruduğu gösterilmiştir¹⁹¹. 25 mg/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 sürülmüştür²⁸. Hung ve ark., 10 μ M resveratrolün Langendorf perfüze sıçan kalplerinde süperoksit oluşumunu ve infarkt alanını azalttığını göstermişlerdir⁹⁵. Başka bir çalışmada da izole perfüze sıçan kalplerinde 10 μ M resveratrolün infarkt alanını küçülttüğü, MDA düzeylerini düşürdüğü, oksidatif hasarı önleyerek kalbi iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruduğu gösterilmiştir¹⁷⁶.

15 dakika 10 μ M resveratrolle perfüze edilen fare kalplerinde, 25 dakikalık iskemiye izleyen 2 saatlik reperfüzyonu izleyen süreçte, resveratrolün iNOS ekspresyonunu indüklediği ve bu artışa paralel olarak reperfüzyona bağlı iskemik alanı küçülttüğü saptanmıştır. Kalpte resveratrolün ön koşullayıcı etkisinde iNOS' un önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür⁹⁸. İzole sıçan kalplerinde yapılan bir başka çalışmada da 30 dakikalık iskemiye izleyen 2 saatlik reperfüzyon periyodundan önce kalpler 15 dakika 10 μ M resveratrol veya 10 μ M resveratrol ve 100 μ M L-NAME veya 10 μ M resveratrol ve 100 μ M iNOS blokörü olan aminoguanidin ile perfüze edilmiştir. 10 μ M resveratrol ile perfüze edilen kalplerde, iskemi sonrası dolum basıncı ve aortik akış gibi parametrelerle ölçülen ventriküler fonksiyonun iyileştiği, miyokardiyal infarkt alanının

küçüldüğü ve resveratrolün oluşturduğu bu olumlu, kalbi koruyucu etkilerin L-NAME ve aminoguanidin varlığında tamamen ortadan kalktığı gösterilmiştir. Resveratrolle perfüze edilen kalplerde 30 dakika reperfüzyondan itibaren 60 dakika ve 120 dakika reperfüzyondan sonra iNOS mRNA ekspresyonu anlamlı şekilde artmış ve aminoguanidin preinkübasyonu yapıldığında iNOS mRNA ekspresyonlarındaki artış kaybolmuştur. Bu çalışmayla resveratrolün kalpte önkoşullayıcı etkisinde nitrik oksidin rol oynadığı gösterilmiştir⁸⁶. Bu çalışmalardan farklı olarak, erkek Sprague Dawley sıçanlara 0.5 veya 1 mg/kg i.p. resveratrol enjekte edildikten 60 dakika sonra koroner arter oklüzyonu ve ardından reperfüzyon yapıldığı bir çalışmada, kontrol hayvanlarda oklüzyon ve reperfüzyondan sonra iNOS protein ekspresyonunun arttığı fakat, oklüzyon öncesi resveratrol infüzyonu yapıldığında iNOS indüksiyonunun ortadan kalktığı gösterilmiştir. Kontrol hayvanlarında, oklüzyon öncesi ve sonrasında eNOS ve nNOS ekspresyonlarında bir farklılık gözlenmediği fakat, resveratrol uygulanan hayvanlarda oklüzyon sonrasında eNOS ve nNOS protein ekspresyonlarında anlamlı artış olduğu gösterilmiştir. Ayrıca resveratrolün iNOS mRNA ekspresyonunu azalttığı, eNOS mRNA ekspresyonunu etkilemediği gösterilmiş ve iNOS ekspresyonu üzerindeki etkisinin transkripsiyonel seviyede eNOS üzerine etkisinin de protein düzeyinde olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, resveratrol uygulanan hayvanlarda iskemiyle indüklenen aritmilerin şiddeti ve sıklığı azalmış ve L-NAME verildiğinde bu etki ortadan kalkmamıştır. Oluşan bu antiaritmik etkinin, nitrik oksitten bağımsız mekanizmalarla muhtemelen de serbest radikal süpürücü etkiden kaynaklanabileceği gösterilmiştir⁹⁶. Tavşanlarda iskemi öncesinde 10 mg/kg resveratrol infüzyonu¹¹⁷ ve 100 µg/kg resveratrol inkübasyonu¹⁰⁸ yapıldığında, resveratrolün spinal kordu iskemi-reperfüzyon

hasarından koruduğu gösterilmiştir. Bu yararlı etki iskemik spinal kord dokusunda oksidatif stresin azalmasına¹¹⁷ ve nötrofil göçünde azalmaya bağlı olarak gerçekleşmektedir¹⁰⁸. Erkek Wistar sıçanlara 0.23 µg/kg dozda verilen resveratrolün sıçanlarda renal iskemi reperfüzyon hasarı sonucu ortaya çıkan mortaliteyi %50'ye varan ölçülerde azalttığı gösterilmiştir⁷¹. Erkek Wistar sıçanlarda 21 gün boyunca 20 mg/kg i.p. *trans*-resveratrol tedavisinin ise serebral arter oklüzyonu sonucu ortaya çıkan fokal iskemi alanını, MDA ve glutasyon düzeyindeki düşmeye paralel olarak azalttığı saptanmıştır²⁰⁰.

II.B.5.d. Resveratrolün Trombosit Fonksiyonu Üzerine Etkileri

Sıçan polimorfonükleer lökositlerinde, resveratrolün 10^{-6} - 10^{-3} M konsantrasyonlarda arakidonik asitten tromboxan A₂ (TxA₂) oluşumunu önlediği gösterilmiştir¹¹⁶. Mikromolar konsantrasyonlarda *trans*-resveratrolün arakidonik asitin ve kollajenin oluşturduğu trombosit agregasyonunu % 50'ye varan oranlarda azalttığı saptanmıştır⁶⁵. Trombositten zengin insan plazmasında, trombosit agregasyonunun *trans*-resveratrol ile doz bağımlı olarak inhibe edildiği gösterilmiştir¹⁶². Aynı araştırmada resveratrolün tromboxan B₂ (TxB₂) ve 12-HETE oluşumunu da inhibe ettiği gösterilmiştir. 24 sağlıklı erkek birey üzerinde yapılan bir araştırmada 4 hafta süreyle 4 mg/L resveratrol içeren üzüm suyu tüketiminin, trombositlerin trombinle indüklenen agregasyona direncini arttırdığı ve TxA₂ oluşumunu azalttığı saptanmıştır¹⁶³.

II.B.5.e. Resveratrolün Antikarsinojenik Etkisi

Resveratrol tüketimi ile göğüs kanseri riskinde azalma olduğu çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir^{131,199}. Aksine, insan meme adenokarsinoma hücreleri kullanılarak yapılan bir başka çalışmada⁶⁹ 3-10 µmol/L konsantrasyonlarda resveratrolün estrogen reseptör bağımlı meme kanser hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığı saptanmıştır. Aynı hücre tiplerinin kullanıldığı bir diğer çalışmada da, resveratrolün 20-160 µmol/L konsantrasyonlarda hücre proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir¹⁴⁴. Resveratrolün kalp damar sistemi üzerindeki olumlu etkileri, onun estrogen benzeri biyolojik aktiviteleriyle iyi bir şekilde ilişkilendirilmektedir. Jang ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada 25µM resveratrol uygulanan farelerde cilt tümörlerinin sayısı % 98 oranında azalmış ve tümörlü fare sayısı da % 88 oranında azalmıştır. Resveratrolün antitümör etkisinin ribonükleotid redüktaz, DNA polimeraz, protein kinaz C, siklooksijenaz-2 aktivitelerinin inhibisyonu, karsinogenezin inhibisyonu, apoptotik hücre aktivasyonuna bağlı olabileceği bildirilmiştir¹⁰⁰. 23 mg/l resveratrolün 10 gün boyunca farelere içme suyu içerisinde veya oral olarak 20 mg/kg dozunda günde iki kez uygulanması sonucunda kanserli hücrelerin büyümesi engellenmiştir⁷. İnsan plasenta mikrozomlarında kırmızı şarap ekstraktlarının aromataz enzimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Meme dokusunda, aromataz enziminin aşırı miktarda eksprese olduğu, dişi transgenik farelerin 3 hafta boyunca gavajla oral olarak 100 µl kırmızı şarap ekstraktlarıyla beslenmesi sonucu, hiperplazinin ortadan kalktığı, aromatazın aşırı eksprese olmasına bağlı olarak gerçekleşen neoplastik değişikliklerin azaldığı

gösterilmiştir⁵⁵. Göğüs kanseri hücre dizisi MCF-7 aro hücrelerinde yapılan bir çalışmada 12.5-25 μ M resveratrolün aromataz enzimini inhibe ettiği gösterilmiştir²³².

II.B.5.f. Hepatoprotektif Etki

Bertelli ve ark., resveratrolün akut 26 μ g veya oral olarak günlük 13 μ g dozunun 15 günden daha uzun süre verilmesiyle bileşiğin hızla kan dolaşımına girdiği ve plazmada ve karaciğerde anlamlı konsantrasyonlarda bulunduğunu göstermiştir¹⁹. Hiperlipidemi oluşturan diyetle beslenen sıçanlarda resveratrol ve piceid triaçilgliserol ve kolesterolün hepatik akümülyasyonunu inhibe etmişlerdir⁶. Bununla birlikte stilbenlerin peroksidize yağla beslenen sıçanlarda karaciğer hasarını önlediği gösterilmiştir¹¹⁵.

II.B.5.g. Resveratrolün Lipid Profili Üzerine Etkisi

Diyet içinde 20 gün boyunca 50-100 mg/l resveratrol desteğinin LDL ve VLDL (çok düşük dansiteli lipoprotein) düzeylerini düşürdüğü ve bunun feçes içinde safra asitlerinin atılımındaki artışa paralel seyrettiği saptanmıştır¹⁴⁵. Erkek hamsterlarda yapılan bir çalışmada kırmızı şarabın ateroskleroza inhibe ettiği gösterilmiştir²²⁴. Hepatomalı sıçanlara 20 gün boyunca 50 ppm resveratrol uygulanmasının serum lipid peroksid düzeylerini ve doz bağımlı olarak serum trigliserit, VLDL, LDL kolesterol

düzeylerini düşürdüğü gösterilmiştir. Bu da resveratrolün hipolipidemik etkisi olduğunu göstermektedir¹⁴⁵.

II.B.5.h. Resveratrolün Estrojen Reseptörleri Üzerine Etkileri

Trans-resveratrol yapıcı dietilstilbesterol (DES)'e benzemektedir. Resveratrolün estrojen reseptörlerinden hem ER α hem de ER β 'ya eşit olarak bağlandığı saptanmıştır²⁷. Genistein ve coumesterol gibi diğer fitoöstrojenler ise ER α 'ya ER β 'ya göre daha yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Resveratrol tek başına verildiğinde estrojen reseptör bağımlı transkripsiyonel olayları zayıf bir şekilde indüklemekte fakat 17 β -estradiol ile birlikte verildiğinde tam tersine transkripsiyonel olayları inhibe etmektedir²¹⁹. 17 β -estradiol, insanlar da dahil olmak üzere birçok türde ana fizyolojik estrojen olup steroid halkasının 3 numaralı pozisyonunda bir fenolik grup ve 17. pozisyonunda bir sekonder alkol grubu içermektedir⁴². Gehm ve ark., resveratrolün dokulara göre değişen derecelerde estrojen reseptör agonistik aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir⁶⁹. Resveratrol, estrojen reseptörlerine bağlanıp onları aktive edebildiği için fitoöstrojen olarak tanımlanmıştır⁶⁹. Resveratrol hem ER α hem de ER β 'ya bağlanmaktadır ama ER β agonist aktivitesi ER α agonist aktivitesinden daha yüksektir. ER β reseptöründen zengin dokular, resveratrolün agonist aktivitesine daha duyarlıdır fakat, genel olarak bütün fitoöstrojenik aktiviteli bileşiklerin potansi 17 β -estradiole göre 100 kez daha düşüktür²⁷. Şarap ekstralarının estrojenik aktivite gösterdiği ve ER α aracılığıyla etki oluşturdıkları gösterilmiştir¹¹⁸. Meme kanseri

hücrelerinde yapılan bir çalışmada estrojen varlığında resveratrolün antiestrogenik etki oluşturduğu estrojen yokluğunda ise estrojenik/antiestrogenik etkiler oluşturduğu gösterilmiştir²³. Ishikawa hücrelerinde yapılan bir çalışmada resveratrolün antiestrogenik etki oluşturduğu gösterilmiştir²⁴.

II.C. Diğer Fitoöstrojenik Etkili Bileşikler

Fitoöstrojenler, polifenolik non-steroidal bitki bileşikler olup estrojen benzeri biyolojik aktiviteye sahiptirler. Kimyasal yapıları göz önüne alınacak olursa fitoöstrojenler 4 ana gruba ayrılabilir. İzoflavonoidler, flavonoidler, stilbenler, lignanlar. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, fitöstrojenler açısından zengin diyetin estrojenle ilişkili durumlarda; menopozal semptomlar¹¹, estrojenle ilişkili hastalıklar; prostat⁵¹, göğüs kanseri¹³⁰, osteoporoz¹⁷² ve kardiyovasküler hastalıklarda¹² yararlı olabileceği öne sürülmüştür. Overleri çıkarılmış sıçan arterlerinde yapılan bir çalışmada, fitoöstrojenik bir bileşik olan genisteinin endotel-bağımlı gevşemeleri iyileştirdiği gösterilmiştir²¹⁰. 7 gün boyunca 0.2 mg/kg daidzein enjeksiyonu yapılan erkek sıçanlarda asetilkolin bağımlı gevşemelerin, nitrit ve cGMP düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Daidzein eNOS ekspresyonunu değiştirmemiş fakat, caveolin-1 ekspresyonunun azaltmış ve calmodulin ekspresyonunu arttırmış ve böylelikle eNOS aktivitesinin arttığı bildirilmiştir²³⁸.

II.D. Dişi Cinsiyet Hormonu Estrojen ve Biyolojik Etkileri

Dişi seks hormonu olan estrojen sadece dişi üreme sisteminde değil organizmada kemik ve lipid metabolizması, kardiyovasküler sistem fonksiyonlarının düzenlenmesi gibi birçok farklı yolda fonksiyon göstermektedir. Estrojen, iki reseptörü aracılığıyla etkilerini oluşturmaktadır. Bu reseptörler ER α ve ER β olarak adlandırılmaktadır⁴⁴. İnsan estrojenleri içerisinde estradiol, biyolojik olarak en aktif hormondur. Estrone ve estriol, estrojen reseptörlerine afinitelerinin düşük olması ve estrojen reseptörleri ile yaptıkları komplekslerin hedef hücredeki estrojen-yanıt elemanına da düşük afinite göstermeleri yüzünden estradiole göre daha az aktif moleküllerdir⁴⁴.

II.D.1. Estrojenlerin Biyosentezi

17 β -estradiol, estrone ve estriol kolesterolden köken alan 18 karbonlu steroid yapıda bileşiklerdir. Estrojenlerin sentezi bütün steroid hormonların prekürsörü olan kolesterolden başlar. Kolesterol, lipoprotein reseptörlerine bağlandıktan sonra steroidojenik hücreler tarafından alınır, depolanır ve steroid sentez bölgelerine iletilir. Karbon atomunun 27 den 18'e düşürülmesiyle farklı steroidler oluşmaktadır. Estrojen sentezinde en son basamak aromatzasyondur. Bu reaksiyon p450 aromatz monooksijenaz enzim kompleksi tarafından katalizlenir. Ardı ardına 3 hidroksilasyon reaksiyonuyla androstenodion ve testosterondan estron ve estradiol oluşmaktadır.

Çeşitli bitki bileşikleri estrogenlere yapısal ve fonksiyonel benzerlikler göstermektedir ve bunlar fitoestrogenler olarak adlandırılmaktadırlar⁸¹.

Estrojenler kimyasal yapıları bakımından üç gruba ayrılırlar.

Doğal estrogenler: estradiol, estron, estriol

Sentetik estrogenler: etinil estradiol, mestranol

Steroid yapıda olmayan sentetik estrogenler: Dietilstilbestrol

Kadınlarda estrogenin primer kaynağı, overlerdeki teka ve granüloza hücreleridir. Teka hücrelerinden salgılanan androjen, granüloza hücrelerine difüze olmakta ve burada aromatisasyonla estrogenlere dönüşmektedir. Son zamanlarda ise, her iki hücre tipinin hem androjen hem de estrogen oluşturabildiği gösterilmiştir⁹⁰. Estron ve estriol karaciğerde estradiolden elde edilmektedir. Adrenal kortekste dehidroepiandrosterondan oluşan androstenedion, kas, yağ dokusu, karaciğer, böbrek, akciğer gibi periferik dokularda aromatisasyonla estrona ve estradiole dönüşmektedir. Aromataz enzimi over ve plasenta haricinde kadınlarda yağ dokusunda stroma hücrelerinde, erkeklerde Leydig ve Sertoli hücrelerinde, erkek ve kadında karaciğer, cilt, çizgili kaslar ve beyinin çeşitli bölgelerinde bulunmaktadır⁸¹. Hamilelikte estradiol plasentada sinsisyoblastlarda, 16 α -hidrosiepiandrosteronodionun aromatisasyonu ile oluşmaktadır. 16 α -hidrosiepiandrosteronodion, hem fötüs karaciğerinde üretilen hem de fötüs adrenal bezinde dehidroepiandrosteronsülfattan oluşan 16 α -hidrosiepiandrostenodion sülfattan köken almaktadır. Fötüs adrenal bezi, karaciğeri ve plasenta “steroid biyosentezinin fötöplasental ünitesi” olarak adlandırılmaktadır.

Menopoz dönemi sonrası kadınlarda adipoz doku ve meme bezinde estrogen sentezlenmektedir¹²³. Testislerde Leydig hücrelerinde de testosteron ve androstenediondan az miktarda estrogen oluşmaktadır. Menopoz öncesi dönemde vücutta oluşan estrogenin % 25'i over dışı, % 75'i ise over kaynaklıdır. Menopoz sonrası dönemdeki kadınlarda estrogenin ana kaynağı adrenal korteksten salgılanan androstenediondan oluşan estrondur⁸¹.

Estradiolün overlerden salgılanması hipofizden periyodik olarak salgılanan gonadotropinler (FSH ve LH) tarafından düzenlenir. Bu salgılanma 28 günlük bir siklus göstermektedir¹⁰.

Menstrüel siklus boyunca estradiol üretimi değişkenlik göstermektedir. Estradiolün günlük salgılanan miktarı salgılanma hızının en yüksek olduğu siklus ortası dönemde günde 200-400 µg ve luteal dönemdeki maksimum değeri günde 150-300 µg'dır. Menstrüasyon öncesi dönemde estradiol üretimi ve serum konsantrasyonları oldukça düşük, menopoz sonrası dönemde ise 20 pg/ml'den düşük olmaktadır. Estradiolün çoğu da testosteronun ekstragonadal dönüşümüyle oluşmaktadır. Bu dönemdeki kadınlarda ana estrogen estrone'dur⁸¹. Ovülasyon öncesi dönemde en yüksek serum konsantrasyonlarına ulaşılır. Ovülasyonun hemen öncesinde serum estradiol konsantrasyonu 250-500 pg/ml'ye ulaşır. Estron salgılanma hızı estradiole benzer. Plazmada estron düzeyi estradiole yakındır. Estrojenler, Seks Hormonu Bağlayan Globulin (SHBG)'e yüksek afiniteyle bağlanırken albumine daha düşük afiniteyle bağlanırlar. Albuminin SHBG'ye göre estrogen bağlama kapasitesi daha düşüktür⁸¹.

Estradiol ve metabolitleri konjügasyonla inaktif duruma getirilir. Bu konjüгатların bir kısmı safraya itrah edilir safra içinde ince barsağı gelen konjüгатlar enterohepatik siklusa katılır. Konjüгатların kalan kısmı böbreklerden idrar içinde atılır. İdrarla bir günde atılan estrogen miktarı siklus sırasında 20-80 µg arasındadır⁸⁰.

II.D.2.Estrogenlerin Transportu ve Metabolizması

Overlerde sentezlenen estrogenler, kan dolaşımına salıverilir ve hedef dokulara taşınır. Estradiol dolaşımında bir β-globulin olan SHBG'ye reversibl olarak bağlanmakta, albumine ise ona göre daha düşük afinite ile bağlı bulunmaktadır. Geriye kalan %2-3 estradiol serbest halde bulunmaktadır. Hedef dokularına ulaşmadan önce bağlı bulundukları proteinlerden ayrılırlar. Estrogenler, endokrin etkilerinin yanında periferik dokularda sentezlenip otokrin, parakrin olarak da etki göstermektedir¹²³. Estrogenler sülfatasyon veya glukuronidasyon ile metabolize edilmektedir. Oluşan konjugatların bir kısmı safraya itrah edilir. Safra içinde barsağı gelen konjugatlar burada hidroliz edilerek geri emilir ve enterohepatik dolaşıma katılır. Konjugatların diğer kısmı böbreklerden idrarla atılır⁸⁰.

II.D.3. Estrojen Reseptörleri

Estrojen reseptörleri, yaklaşık 150 tanımlanmış üyesi bulunan steroid/tiroid hormon reseptör ailesinin bir üyesidir. Estrojen reseptörleri, estrojenin bağlanmasıyla aktive olurlar estrojen yokluğunda ise büyüme faktörleri tarafından aktive edilirler. Estrojen reseptörlerinin varlığı fare aortası, sıçan aortası, uterus ve kuyruk arteri, tavşan uterus arteri, domuz aorta endotel hücreleri, primat koroner ve karotid arteri ve insan koroner, uterus arteri, umbilikal ven endotel hücrelerinde gösterilmiştir¹⁵⁹. Keşfedilen ilk ER alt tipi olan klasik estrojen reseptörü ER α (595 aa) ilk olarak 1986'da klonlanmış, ER β (530 aa) ise daha sonra keşfedilmiştir. Bu iki reseptör tipi yapıca değişiklik göstermekte ve bunları kodlayan genler farklı kromozamlar üzerinde bulunmaktadır⁸⁰. Estrojenin etkilerini ER α ve ER β 'ya bağlanarak oluşturduğu yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir^{122, 165}.

Estrojen reseptörlerinin çeşitli fonksiyonel bölgeleri bulunmaktadır. Bunlar A'dan F'ye doğru dizilen 6 farklı bölgeden oluşmaktadır. A ve B bölgesi uzunluk ve içerik bakımından iki reseptör arasında farklılık göstermekte ve direkt transaktivasyon fonksiyonuna sahiptir. C bölgesi iki çinko uzantıya sahiptir ve DNA bağlanma bölgesidir. D bölgesi çekirdek lokalizasyon sinyali içerir, E bölgesi görece olarak daha geniş ve fonksiyonel açıdan oldukça komplekstir. Ligand bağlanma bölgeleri, farklı aminoasitlerden oluşur ve reseptör dimerizasyon bölgeleri, koaktivatör, korepressör ile etkileşen bölümler içerir. F bölgesi ise ligandların agonist/antagonistik etkilerini düzenleyen bölümdür. ER α ve ER β sadece C ve E bölgelerinde benzerlik

göstermektedirler. İnsan ER β , ER α ile karşılaştırıldığında DNA bağlayan bölgede yüksek derecede benzerlik (%96) ve ligand bağlayan bölgede orta derecede (%58) benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Her iki reseptör de estradiole yüksek afinite ile bağlanmakta ama ER β ($K_d=0.5-0.6$ nM) ER α ($K_d=0.2$ nM)'ya göre daha düşük afinite göstermektedir⁸⁰.

Ligandlar bu iki reseptöre farklı afiniteyle bağlanmaktadır. Kısa etki süreli 17 α -estradiol ve biyolojik aktivite açısından daha zayıf olan estrone ER α 'ya daha yüksek afinite gösterirken fitoestrogenler genistein ve coumesterol ER β 'ya daha yüksek afinite ile bağlanırlar. Selektif estrogen reseptör modölatörü raloksifen, ER α 'ya daha yüksek afinite ile bağlanır⁸⁰.

ER α ve ER β doku dağılımı açısından da farklılık gösterirler. ER α ve ER β mRNA ölçümleri sonucu bu iki reseptörün farklı doku dağılımlarına sahip olduğu gösterilmiştir. ER α erkek ve kadında vasküler endotel ve düz kas hücrelerinde ve miyokardiyal hücrelerde tanımlanmıştır. ER α , vasküler düz kas ve endotel hücrelerinde PGI₂, eNOS gibi spesifik hedef genleri aktive etmektedir. ER β ise ER α 'dan yapıcı ve fonksiyonel olarak farklıdır¹⁴¹.

II.D.4. Estrojenin Etki Mekanizması

Estrojen hücreye difüze olduğunda reseptörüne bağlanır ve estrogen-reseptör kompleksi oluşturur. Bu kompleks daha sonra hücre çekirdeğinde spesifik

DNA sekanslarına bağlanır ve çeşitli transkripsiyonel olaylar meydana gelir¹⁶⁹. Estrojen, bunun dışında çeşitli koaktivatörlere de bağlanabilir. Bu bağlanmayı sitozolik bir protein olan caveolin-1, reseptörle direkt etkileşerek stimüle eder. Estrojenlerin bazı etkileri hücre yüzeyinde yer alan ER aracılığı ile gerçekleşir. Estrojen bu reseptörlerle etkileştiğinde, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) aktivasyonuna cGMP üretiminin stimülasyonuna ve NO salıverilmesine yol açar. Konfokal mikroskobu kullanılarak yapılan çeşitli çalışmalarda endotel hücrelerinin yüzeylerinde estrojen için reseptör taşıdığı gösterilmiştir. Estrojenle membran ER lerinin aktivasyonu sonucu hızlı bir şekilde sinyal yolları aktive olur¹⁸⁷.

II.D.5. Estrojenin Vasküler Etkileri

II.D.5.1. Estrojenin Endotel Fonksiyonu Üzerindeki Nongenomik Etkileri

Estrojenler, transkripsiyonel mekanizmalarla açıklanamayan, kısa süre içinde meydana gelen ve hücre membranları üzerinde direkt estrojenik etkinin sonucu olarak gerçekleşen etkiler oluşturmaktadırlar. Estrojen reseptörünün hücre yüzeyi formu bu olaya aracılık etmektedir. Her ne kadar bu reseptörler henüz tam olarak karakterize edilememiş olsa da, intraselüler estrojen reseptörlerine benzedikleri düşünülmektedir. Bu kısa süre içinde gerçekleşen etkiler sayesinde koroner arterler kısa süre içinde gevşemekte, estradiol pankreatik beta hücrelerinde hızlı insülinotropik etkiler

oluşturmakta, sinir hücrelerinde büyüme hormonu ilişkili sinyal yolları hızlı aktive olmaktadır. Estrojen hücre yüzey reseptörleri ve MAPK sinyal kaskadı arasında direkt bir link bulunmaktadır¹⁰⁹. Bu hızlı ve nongenomik etkiler endotel bağımlı ve endotel bağımsız gevşemeleri içermektedir.

Estrojen ve NO salıverilmesi arasındaki direkt ilişki, hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir^{93,182}. Erkek sıçan aortasında yapılan bir çalışmada estrojenin endotel bağımlı vazodilatasyon oluşturduğu gösterilmiştir³¹. Estrojen *ex vivo* olarak koroner vazodilatasyon yapmakta, *in vivo* olarak kolesterolle beslenmiş overleri çıkarılmış primat ve diğer hayvanlarda vazodilatasyon oluşturmaktadır^{57,142}. Postmenopozal dönemdeki kadınlarda koroner ve brakial arterleri dilate etmektedir^{41,70}. Estradiolün oluşturduğu gevşemelerin, L-NAME varlığında ortadan kalktığı gösterilmiştir³¹. Estrojenin oluşturduğu vazodilatör etkinin, estrojen reseptörleri aracılığı ile gerçekleşebileceği düşünülmüş ve estrojen reseptör antagonistleri ile bu etkinin ortadan kalktığı gösterilmiştir³³. Bucci ve ark. nın yaptığı bir çalışmada, erkek izole sıçan aortasında estrojenin oluşturduğu vazodilatör etki estrojen reseptör antagonisti ICI 182,780 ile kısmen antagonize edilmektedir³¹. ER α , eNOS'u tirozin kinaz yolağı veya MAPK yolağı ile direkt olarak aktive edebilmektedir³⁹. *In vitro* endotel hücre kültürlerinde yapılan bir çalışmada, estrojenin eNOS aktivasyonu yaptığı ve ısı-şok proteini ve eNOS etkileşmesini stimüle ettiği gösterilmiştir³³. Bu hızlı etkiler için gen ekspresyonu gerekmemekte fakat, estrojen reseptörleri ile etkileşebilecek ısı-şok 90 proteini gibi eNOS bağlanıp aktive eden proteinler gerekli olabilmektedir.

Russell ve ark. nın yaptığı bir çalışmada eNOS'un estrogen reseptör aracılıklı hızlı aktivasyonunda hsp 90'ın varlığı göstermiştir¹⁸⁶.

Suprafizyolojik konsantrasyonlarda estrogen, hücre membranları veya L-tipi kalsiyum kanalları üzerine etki ederek ekstraselüler Ca^{+2} 'un vasküler düz kas hücrelerine geçişini engeller^{64,103}. Fizyolojik konsantrasyonlarda ise, estrogen kalsiyumla aktive olan potasyum kanallarının açılmasını sağlayarak NO-sGMP bağımlı yollarla stimüle ederek düz kası gevşetir²³⁶. Bucci ve ark. nın yaptığı bir çalışmada, izole sıçan aortasında kalsiyumla aktive olan potasyum kanal blokörü; tetraetilamonyum (TEA) varlığında vazodilatör cevapta herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir³¹.

İzole perfüze tavşan kalplerinde 17β -estradiolün 10^{-9} - 10^{-5} M konsantrasyonlarında, doz bağımlı olarak koroner perfüzyon basıncını, NO salınımına neden olarak azalttığı gösterilmiştir¹³⁵. Nechmad ve ark., erkek internal meme arterinde estrogenin etkisini incelemişlerdir. Endotelli ve endotelsiz dokular noradrenalin ile prekontrakte edilmiş ve 17β -estradiolün 10^{-8} - 10^{-5} M aralığında etkisi incelenmiştir. 17β -estradiol, endotelli dokuda doz bağımlı gevşeme meydana getirmiştir ve 10^{-5} M konsantrasyonda % 80 gevşeme cevabı alınmıştır. L-NAME ile gevşemeler ortadan kalkmış, endotelsiz dokuda ise gevşeme gözlenmemiştir. 17β -estradiolün vazodilatör etkisinin endotel bağımlı olduğu belirtilmiştir¹⁵³. Shaw ve ark., dişi ve erkek Wistar sıçan mezenterik arterlerinde 17β -estradiolün etkisini araştırmışlardır. 60 mM KCl ve U46619 ile prekontrakte edilen endotelli dokularda 3-30 μ M 17β -estradiol uygulanmış

ve 30 μ M konsantrasyonda maksimum gevşeme cevabı alınmıştır (%50-60)¹⁹⁴. Teoh ve ark., erkek Sprague-Dawley endotelli fenilefrin ile prekontrakte edilmiş sıçan aortasında 10^{-9} M- 10^{-4} M 17β -estradiol ve 17α -estradiolün etkisini araştırmışlardır. Estrojenin vazodilatör etkisinin endotel bağımlı olarak oluştuğunu göstermişlerdir. 1 μ M fenilefrinle prekontrakte edilen sıçan torasik aortasında da, 17β -estradiolün (10^{-6} M ve daha yüksek konsantrasyonlarda) etkin vazodilatasyon oluşturabildiği bildirilmiştir. Fakat, aynı çalışmada 1 nM gibi çok düşük konsantrasyonlarda 17β -estradiolün, asetilkolinin endotel bağımlı gevşetici etkisini arttırdığı gösterilmiştir²¹³. Jiang ve ark., KCI ve $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilmiş tavşan koroner arterlerinde, 1-10 μ M konsantrasyonda 17β -estradiolün gevşeme oluşturduğunu göstermişlerdir¹⁰³. Teoh ve ark., U46619 ile prekontrakte edilen endotelli domuz koroner arterlerinde, 17β -estradiolün oldukça yüksek konsantrasyonlarda (10^{-6} M- 10^{-4} M) vazodilatör etki oluşturduğunu göstermişlerdir²¹². Florian ve ark., dişi Sprague Dawley sıçan endotelli aortasında, 17β -estradiolün 10^{-5} M'da bile ancak % 10 civarında gevşeme oluşturduğunu göstermişlerdir⁶¹.

Crews ve ark., kısırlaştırılmış erkek domuzlara ait endotelsiz koroner arter şeritlerinde, 17β -estradiolün belirgin gevşeme oluşturduğunu göstermişlerdir. 10^{-7} M- 10^{-4} M doz aralığında gerçekleştirilen çalışmada, 10^{-4} M konsantrasyonda estrojenin, % 90 oranında gevşeme cevabı oluşturduğu ve etkinin, voltaj bağımlı kalsiyum kanalları aracılığıyla kalsiyum girişinin inhibisyonu sonucu olduğu gösterilmiştir⁴⁵. Mügge ve ark., kadın ve erkek koroner arterlerinde yaptıkları çalışmada 3×10^{-11} - 3×10^{-3} M aralığında 17β -estradiolün vazodilatör etkisini incelemişlerdir. Endotelli ve

endotelsiz dokuda maksimum gevşemenin aynı olduğunu göstermişlerdir. Sonuç olarak $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilmiş insan koroner arterlerinde, 17β -estradiolün endotel bağımsız gevşetici etki oluşturduğunu ve bu etkide cAMP ve cGMP düzeylerinde artışın rol oynadığını göstermişlerdir¹⁴⁹. 30 nM U46619 ile prekontrakte edilen izole domuz koroner arter halkalarında, 17β -estradiol'ün 10^{-6}M ve daha yüksek (fizyolojik olmayan) konsantrasyonlarda vazodilatasyon oluşturduğu gösterilmiştir. 1 nM gibi düşük doz 17β -estradiol inkübasyonu ile SNP, kromakalim gibi ajanlara karşı vazodilatör cevabın arttığı ve 17β -estradiol inkübasyonunun endotel bağımsız gevşemeleri arttırdığı belirtilmiştir²¹². Daha sonra yaptıkları bir araştırmada da izole domuz koroner arterlerinde, 1nM estradiolün oluşturduğu gevşemelerin genomik sinyal yollarından bağımsız olarak gerçekleştiğini ve cAMP kaskadının bu etkide rol oynayabileceğini belirtmişlerdir²¹⁴.

Spontan hipertansif sıçanlar ve normotensif sıçanlarda 17β -estradiol ve progesteronun etkisinin karşılaştırıldığı bir başka çalışmada normotansif erkek Wistar Kyoto sıçan endotelli ve endotelsiz aortasında 17β -estradiolün etkisi incelenmiştir. Dokular, norepinefrinle prekontrakte edilmiş, endotelli dokuda maksimum gevşeme 10^{-6}M konsantrasyonda % 60 olarak gözlenmiştir. Endotelsiz dokuda gözlenen gevşeme cevabının ise 10^{-6}M konsantrasyonda daha yüksek (% 100) olduğu bulunmuştur²²¹. Endotelin-1 ile prekontrakte edilmiş tavşan erkek ve dişi endotelli/endotelsiz koroner arterlerinde 17β -estradiolün etkisinin incelendiği bir çalışmada endotelli ve endotelsiz dokuda 10^{-5}M konsantrasyonda % 90-80 gevşeme gözlenmiştir. Estradiolün vazodilatör etkisinin endotelden bağımsız olarak gerçekleştiği gösterilmiştir¹⁰⁴.

Ma ve ark'nın yaptığı bir çalışmada dişi tavşan aortası Bay K8644 ile prekontrakte edilmiş ve 10^{-9} - 10^{-5} M aralığında estrogenin etkisi incelemiştir. 10^{-5} M estradiol konsantrasyonunda endotelli dokuda % 68 endotelsiz dokuda ise % 59 oranında gevşeme gözlenmiştir. 10^{-4} M L-NAME, endotelli dokularda gevşemeleri ortadan kaldırırken endotelsiz dokularda herhangi bir etki oluşturmamıştır. Estradiolün hem endotel bağımlı (NO aracılıklı ve L-NAME ile ortadan kalkan) hem de yüksek konsantrasyonlarda endotelden bağımsız olarak (aortik düz kasta direkt gevşeme yaparak) gevşeme oluşturduğu gösterilmiştir¹³⁵. Erkek sıçan aortası ve mezenterik arterlerinde 17β -estradiolün ve progesteronun farmakolojik konsantrasyonlarda ($>10^{-6}$ M) hem endotel bağımlı hem endotel bağımsız vazodilatör etki gösterdiği saptanmıştır³⁵. Bucci ve ark., nın yaptıkları bir çalışmada, erkek Wistar sıçan aortasında 10^{-8} - 3×10^{-5} M aralığında 17β -estradiolün etkisi araştırılmıştır. 17β -estradiol, endotelli dokuda 3×10^{-5} M konsantrasyonda maksimum % 75 gevşeme oluştururken endotelsiz dokuda ise maksimum % 10 gevşeme oluşturmuştur. 17β -estradiolün gevşetici etkisinin büyük oranda endotel bağımlı olduğu gösterilmiştir³¹. Andersen ve ark., overleri çıkarılmış dişi Sprague-Dawley sıçanlarda 17β -estradiol-3-benzoatın etkisini araştırmışlardır. Endotelli ve endotelsiz aortalar fenilefrinle prekontrakte edilmiş ve 10^{-8} M - 10^{-3} M doz aralığında 17β -estradiolün etkisi araştırılmıştır. 17β -estradiolün akut (5, 10 μ M) ve uzun dönemde (100 μ g/kg s.k., 7 gün) açığa çıkan etkilerinin farklı mekanizmalarla gerçekleştiği, uzun dönemde açığa çıkan etkinin endotel bağımlı ve NO salıverilmesinde artış ile ilişkili olduğu; akut etkinin ise 5 dakika içerisinde açığa çıktığını ve endotelden bağımsız olarak muhtemelen, vasküler düz kas hücresine kalsiyum girişinin engellenmesiyle meydana geldiği gösterilmiştir¹.

Sığır aortik endotel hücrelerinde ve f3tal kuzu pulmoner arterlerinde, 5 dakikalık 17 β -estradiol inkubasyonunun, nongenomik tarzda akut olarak eNOS aktivasyonunu arttırdığı g3sterilmiştir^{39,114}. Smolders ve ark.nın Wistar sıçan arteriollerinde yaptıkları çalışmada, 10⁻¹⁰-10⁻⁴ M 17 β -estradiol doz bağımlı gevşemeler oluşturmuştur. Endotelsiz dokuda endotelli dokuya g3re daha az gevşeme g3zlenmiş ve L-NNA varlığında gevşemeler anlamlı 3l3de azalmıştır. Sıçan arteriollerinde 17 β -estradiol endotel aracılıklı, doz bağımlı ve hızla oluşan gevşetici etkisinin yanında endotelden bağımsız olarak da gevşeme oluşturabilmektedir. 17 β -estradiol ile oluşan bu vazodilat3r cevap dişi sıçanlarda erkek sıçanlara g3re daha belirgindir²⁰². Selles ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, dişi Wistar sıçanlarda ³H-sitr3llin tekniği ile NO miktarı 3l3lm3ř ve sıçan aortasında 10⁻¹⁰-10⁻⁸ M 17 β -estradiol'3n 3 dakika inkubasyonu ile doz bağımlı olarak sitr3llin miktarının anlamlı 3l3de arttığı g3sterilmiřtir¹⁹².

II.D.5.2. Estrojenin Genomik Etkileri

Estrojenin genomik etkileri, nongenomik etkilerine g3re daha uzun s3rede açığa çıkmaktadır. Estrojen h3creye dif3ze olduğunda resept3r3ne bağlanır ve estrojen-resept3r kompleksi oluşturur. Bu kompleks daha sonra h3cre çekirdeğine ulaşır. Bu estrojen- resept3r kompleksi, “estrojen-yanıt elemanı” olarak da adlandırılan spesifik DNA sekanslarına bağlanır ve dakikalarca veya saatlerce s3rebilen çeşitli transkripsiyonel olayları başlatır. ER aracılığı ile gerçekleşen bu olaylarda, PGI₂ ve eNOS gibi çeşitli gen ekspresyonlarının arttığı saptanmıřtır¹⁶⁹.

Glaser ve ark., insan umbilikal ven endotel hücre kültürlerinde 24 saat boyunca uygulanan 1-200 ng/ml 17β -estradiolün eNOS aktivitesini ve NO salıverilmesini arttırdığını göstermişlerdir. ER antagonisti ICI 164,384 varlığında, NO salıverilmesindeki artışın ortadan kalktığı ve 17β -estradiolün kalsiyum mobilizasyonuna yol açmadan ER aracılığıyla eNOS aktivitesini ve NO salıverilmesini arttırdığı gösterilmiştir⁷². Erkek sıçanlarda yapılan bir çalışmada, Lewis türü sıçanlara Brown-Norway türü sıçanlara 1, 3, 7, 14, 21 gün boyunca $20\mu\text{g/kg/gün}$ subkütan olarak ozmotik pompa aracılığı ile estradiol sipiyonat uygulanmış ve aortalarda immünohistokimyasal olarak eNOS ve iNOS ekspresyonları ölçülmüştür. Estradiol tedavisi uygulanan hayvanlarda, eNOS ekspresyonu artarken, iNOS ekspresyonu ise anlamlı derecede azalmıştır¹⁸⁸. İnsan aorta endotel hücre kültürlerinde, 2-20 ng/ml konsantrasyonlarında 8-48 saat boyunca uygulanan 17β -estradiolün nitrit/nitrat düzeylerini ve eNOS ekspresyonlarını arttırdığı gösterilmiştir⁹¹. İnsan endotel hücrelerinde yapılan bir çalışmada, 24 saat boyunca 10^{-6} M 17β -estradiol uygulanması sonucu EDRF miktarı ve eNOS mRNA ekspresyonunun kontrol hücrelere göre anlamlı derecede arttığı ve ICI 182,780 varlığında eNOS ekspresyonundaki artışın ortadan kalktığı gösterilmiştir¹⁷³. 4 hafta boyunca 17β -estradiol implantı uygulanan overleri çıkarılmış dişi farelerin serebral damarlarında yapılan çalışmada, eNOS mRNA düzeylerinin arttığı ve eNOS protein düzeyinin de % 47 oranında arttığı gösterilmiştir²⁰⁷. Tamura ve ark. overleri çıkarılmış ve 5 gün boyunca 10 μg estradiol ve/veya 1 mg progesterone ile beslenmiş dişi sıçan aortalarında, kontrol hayvanlarda overiektomi sonucu gözlenen iNOS artışının estradiol veya estradiol ve progesteron

tedavisi ile ortadan kalktığını göstermişlerdir. Overlerin çıkarılmasının eNOS ekspresyonunu etkilemediği fakat iNOS ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir²¹¹.

Overleri çıkarılmış ve 7 gün boyunca subkütan 20µg/24 saat 17β-estradiol uygulanmış dişi sıçanların pulmoner arter ve aortalarında, asetilkolin (10^{-10} - 10^{-4} M) ile oluşan gevşeme cevaplarının arttığı, 17β-estradiolün endotel bağımlı vazodilatör etkisi olduğu ve 17β-estradiol uygulanması ile eNOS ekspresyonun arttığı saptanmıştır⁷⁵.

Kolesterolden zengin diyetle beslenen overleri çıkarılmış domuzlarda, 16 haftalık 17β-estradiol tedavisinin koroner arterlerdeki endotel fonksiyon bozukluğunu düzelttiği ve LDL'nin oksidasyonunu önlediği bildirilmiştir¹¹¹. 15 gün süreyle 80 µg/kg/gün estrogen tedavisinin, fare aortasında asetilkolin ile indüklenen endotel bağımlı cevapları arttırmadığı fakat, bazal NO salınımını arttırdığı saptanmıştır⁴⁸.

II.E. Damar Cevaplarındaki Cinsiyet Bağımlı Farklılıklar

Kadınlarda, kalp damar hastalıklarına yakalanma riski, erkeklere göre daha düşük seyretmektedir. Menapoz sonrası dönemde ise, kadınlar ve erkekler arasındaki bu fark ortadan kalkmaktadır. Bu durum, estrogen yetersizliği ile açıklanmakta ve estrogen replasman tedavisi ile azalmaktadır²²³. Menapoz öncesi dönemdeki kadınlarda, kalp damar hastalıklarına karşı izlenen direncin, dişilik hormonu estrogenin endotel fonksiyonunu arttırıcı, nitrik oksit sentezini indükleyici, HDL

düzeyini yükseltici ve LDL oksidasyonunu önleyici etkilerine bağlı olduğu ortaya konulmuştur¹²¹.

Menopoz sonrası kadınlarda estrogen uygulamasının endotel bağımlı koroner vazodilatasyonu iyileştirdiği gösterilmiş ve bu etki NO'e bağlanmıştır⁴¹. Dişi sıçan aortalarında asetilkolinle oluşan gevşeme cevapları, erkek sıçan aortasından daha yüksek bulunmuştur^{110,237}. Başka bir çalışmada, asetilkolinin oluşturduğu gevşemelerin dişi tavşan aortasında erkek tavşan aortasından daha yüksek olduğu gösterilmiştir¹⁹⁰. Asetilkolin bağımlı nitrit salıverilmesinin dişi tavşan aortalarında, erkek tavşan aortasından daha yüksek olduğu bulunmuştur^{87, 190}. Bu farklılığın, dişi aortasından estrogen etkisiyle daha fazla NO salıverilmesi sonucu olduğu belirtilmiştir. Sıçan mezenterik arter yatağında asetilkolinle stimüle olan NO ve endotel bağımlı hiperpolarize edici faktör (EDHF) salıverilmesi dişi ve erkek arasında farklılık göstermekte ve dişi arterlerinde EDHF nin vazodilatör etkiye katkısının daha fazla olduğu gösterilmiştir¹³⁹. Erkek ve dişi Sprague-Dawley sıçanların mezenterik arterlerinde yapılan bir başka çalışmada da, dişi sıçanların mezenterik arterlerinde asetilkolinle oluşan gevşeme cevapları erkek sıçanlardan daha yüksek bulunmuştur. Bu farklılık, dişi sıçan mezenterik arterlerinden erkek sıçan mezenterik arterlerine göre daha fazla EDHF salıverilmesine bağlanmıştır²³⁷. Erkeklerle kıyaslandığında dişiler daha fazla akışa bağımlı vazodilatasyon göstermekte ve estrogen tedavisi bu etkiyi arttırmaktadır⁹³. Mekanik stress ve asetilkolinle erkek sıçanların kuyruk arterinden salıverilen primer vazodilatörün NO olduğu; dişi sıçanların kuyruk arterindeki gevşemede ise hem NO hem de EDHF 'nin rolü olduğu gösterilmiştir¹⁶⁶.

Erkek ve dişi sıçanların izole perfüze kuyruk arterlerinde yapılan bir çalışmada, 10^{-7} ve 10^{-5} M 17β -estradiol inkübasyonunun, noradrenalin ile oluşan kasılma cevabını dişi sıçanda azalttığı fakat, erkek sıçanda etkilemediği ve endotel kaldırıldığında 17β -estradiolün gevşetici etkisinin ortadan kalktığı gösterilmiştir¹⁴⁰. Erkek ve dişi sıçanların izole perfüze kuyruk arterlerinde yapılan bir başka çalışmada da, 17β -estradiolün adrenerjik sinir stimülasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Sinir stimülasyonu sonucu oluşan kasılma cevabı, erkek sıçanlarda dişilere göre daha yüksek bulunmuştur. 17β -estradiol (3×10^{-5} M) inkübasyonu, dişi ve erkek sıçanların kuyruk arterinde oluşan vazokonstriktör cevapları dişide daha fazla olmak üzere azaltmıştır. 17β -estradiolün adrenerjik sinir stimülasyonu sonucu oluşan kasılma cevabı üzerine inhibitör etkisi gonadotektomiden etkilenmemiştir⁶⁸.

Erkek sıçanların mezenterik arter ve aortasında, 17β -estradiolün dişilerden daha güçlü gevşeme oluşturduğu gösterilmiştir. Bu farklılığın erkek sıçanlardaki yüksek testosteron düzeyiyle ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür²¹⁵. Bir başka çalışmada da estrogenin, erkek sıçan mezenterik arterlerinde, pro-estrus ve di-estrus dönemindeki dişilerin arterine göre daha güçlü vazodilatasyon oluşturduğu gösterilmiştir. Dişinin menstrüel siklus evrelerindeki estrogen düzeyindeki dalgalanmanın, bu farklılığın nedeni olabileceği bildirilmiştir¹⁹⁴. Tersine, çeşitli çalışmalarda dişi sıçan arterlerinin, erkek arterlerine göre estrojene daha duyarlı olduğu gösterilmiştir^{68,128,140}. Smolders ve ark.nın Wistar sıçan arteriyollerinde yaptıkları bir

çalışmada, 17 β -estradiol ile oluşan vazodilatör cevabın, dişi sıçanlarda erkeklerden daha belirgin olduğu gösterilmiştir²⁰².

Erkek ve dişi Sprague-Dawley sıçan aortalarında SOD, asetilkolin ve iloprost ile oluşan gevşeme ve L-NAME ile meydana gelen kasılma cevapları, dişi sıçanlarda erkeklere göre daha yüksek bulunmuştur¹⁷⁰. 17 β -estradiolle oluşan akut vazodilatör cevapların erkek sıçan endotelsiz aortasında, dişi sıçan endotelsiz aortasından daha yüksek bulunduğu gösterilmiştir⁴⁵. Dişi ve erkek sıçan böbreklerinin eNOS mRNA ve eNOS protein düzeylerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada dişilerde bu parametrelerin düzeyinin erkeklerden % 80 oranında daha yüksek olduğu saptanmıştır¹⁷⁷.

Tep-areenan ve ark., dişi ve erkek sıçan mezenterik arter ve torasik aortasında 17 β -estradiol'ün etkisini incelemişlerdir. 17 β -estradiol (10 pM-1mM) doz aralığında mezenterik arter ve aortada konsantrasyon bağımlı gevşeme meydana getirmiştir. Erkek sıçan mezenterik arter ve aortasında 17 β -estradiolün daha potent olduğu gösterilmiştir. 17 β -estradiolün meydana getirdiği akut gevşemenin büyük oranda endotelden ve NO'den bağımsız yollarla gerçekleştiği gösterilmiştir. 17 β -estradiolün oluşturduğu gevşemelerin K⁺ kanal blokörleri tetraetilamonyum, 4-aminopiridin, karibdotoksin gibi K⁺ kanal blokörleri ile inhibe edildiği gösterilmiştir²¹⁵. Erkek ve dişi sıçan endotelsiz aortasında, 45 mM KCl ile prekontraksiyondan sonra 17 β -estradiol (0.3-30 μ M) uygulamasının gevşeme oluşturduğu fakat, dişi-erkek

arasında 17 β -estradiol'ün oluşturduğu gevsme cevabının karakteristiği açısından bir fark olmadığı gsterilmiştir. Ca⁺²'nin hücreye girişinin inhibe olmasının, 17 β -estradiol'ün vazodilatör etkisine katkıda bulunabileceği ileri srlmřtr⁶⁴. Salom ve ark., dişi ve erkek, endotelli ve endotelsiz tavşan karotid artelerinde KCI ile prekontraksiyondan sonra, 10-100 μ M 17 β -estradiol'n etkisini incelemişlerdir. 10⁻⁴ M konsantrasyonda 17 β -estradiol yaklaşık %25 gevsme meydana getirmiştir. Estrojenin endotel bağımsız gevsme oluşturduğunu ve bu gevsmelerde cinsiyet farkının bulunmadığını gstermişlerdir. Ayrıca estrojen reseptör antagonisti ICI 182,780'nin (1 μ M) ve protein sentez inhibitörü sikloheksimidin (1 μ M) gevsmeleri etkilemediğini estrojen reseptörleri ve protein sentezinin 17 β -estradiol n akut etkisinde rol oynamadığını gstermişlerdir. Gevsnetici etkinin vasküler düz kasa ekstraselüler ortamdan Ca⁺² girişinde azalmaya bağlı olarak meydana geldiği fakat K⁺'un hücre dışına çıkışının gevsnetici etkide rol oynamadığı gsterilmiřtir¹⁸⁹.

Dişi ve erkek Sprague Dawley sıçanlarda yapılan bir çalışmada endotelli ve endotelsiz aortalar KCI ile prekontrakte edilmiştir. Endotelli dişi aortasında 17 β -estradiol ile 10⁻⁷ M konsantrasyonda % 65 gevsme, endotelli erkek aortasında ise % 50 oranında gevsme gözlenmiştir. Endotelsiz dişi ve erkek aortasında ise 17 β -estradiol % 20 civarında gevsme meydana getirmiştir. Estrojenin endotel bağımlı vazodilatör etkisinin yanında endotelden bağımsız direkt vazodilatör etkisinin de bulunduğu bildirilmiřtir¹²⁸.

II.F. Nitrik Oksit

Alfred Nobel'in 1867'de nitrogliserinin patlayıcı olarak kullanımı ve üretimi ile ilgili öncü çalışmaları dinamitin keşfi ile sonuçlanmıştır. Tıpta nitrogliserin, nitrovazodilatör prototipi olarak bilinmekte ve patlayıcı olarak kullanımından çok angina tedavisi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Alfred Nobel'in ölümünden 100 yıl sonra Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülü nitrogliserinin etkin molekülü nitrik oksidin keşfi ve biyolojik etkilerini açıklayan çalışmalarından dolayı Robert Furchgot, Ferid Murad ve Louis Ignarro'ya verilmiştir¹⁹⁵.

İnorganik serbest bir radikal olan NO, vasküler tonüsün düzenlenmesinden sorumlu endotel kökenli endojen bir mediyatör olarak tanımlanmıştır⁶⁶ ve daha sonra NO'in çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik olaylardan sorumlu bir sinyal molekülü olduğu anlaşılmıştır. NOS enziminin 3 izoformu tarafından L-arjininden sentezlenen NO'nun vasküler düz kas tonusunu kontrol ettiği, platelet ve inflamatuvar hücre adezyon ve aktivasyonunu inhibe ettiği, non-adrenerjik non-kolinerjik sinapslarda transmitter olduğu artık bilinmektedir¹⁴⁸.

II.F.1. Biyosentezi ve Salıverilmesi

NO, NOS enzimi tarafından oluşturulmaktadır. NOS'un birbirine yapısal olarak çok benzeyen 3 izoformu bulunmaktadır. Ca^{+2} bağımlı olan iki izoform konstitutif olarak eksprese edilmekte olup nNOS (sinir hücrelerinde eksprese edilir) ve

eNOS (endotel hücrelerinde, kardiyak monositlerde ve plateletlerde eksprese edilir) olarak adlandırılmaktadır. İndüklenebilir, Ca^{+2} bağımsız NOS ise iNOS olarak adlandırılır ve monosit ve makrofajları da içeren birçok hücrede bulunur. iNOS ekspresyonu çeşitli sitokinler tarafından indüksiyonla gerçekleşmektedir. İnflamatuvar ajanlarla ve sitokinlerin varlığında iNOS gen ekspresyonu upregüle olur ve NO üretimi yüksek düzeylere çıkar³⁴.

NO, L-arjininin guanidino grubundaki nitrojenin 5 elektronlu oksidasyon reaksiyonu ile meydana gelmektedir. Reaksiyonda arjinin, moleküler oksijen ve NADPH (Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) substrattır. Tetrahidrobiopterin, flavin adenin dinükleotid ve flavin adenin mononükleotidler de kofaktör olarak reaksiyona katılırlar²⁴⁴. Reaksiyon oksijen ve NADPH bağımlıdır, NOS enziminin katalize ettiği reaksiyon sonucunda NO yanında L-sitrüllin de açığa çıkmaktadır³⁴.

II.F.2. NO'in İnaktivasyonu

NO süperoksit ile birleşerek peroksinitrit oluşturmaktadır. NO moleküler oksijenle reaksiyona girerek nitrit oluşturmakta ve daha sonra hemoglobin gibi hemoproteinler varlığında nitrata okside olmaktadır. NO'in yarı ömrü 3-5 sn'dir. NO tiyol içeren proteinlerle (ör. albumin ve doku plazminojen aktivatörü) de etkileşerek S-nitroso tiyollerini oluşturur¹⁹³.

II.F.3. NO'in Etki Mekanizması

NO'nun etkilerinin çoğuna aracılık eden klasik yolak, solubl guanilat siklaz aktivasyonu¹⁴⁸ ve de GTP'nin ikincil haberci molekül 3',5'-siklik guanozin monofosfatlara (cGMP) dönüşümüdür⁹⁷. Fakat yapılan çalışmalarda, çeşitli sistemlerde NO'in cGMP'den bağımsız yollarla (platelet agregasyonunun inhibisyonu, inflamatuvar hücre apoptozisinin düzenlenmesi gibi) da etki oluşturabileceği gösterilmiştir¹⁹³.

eNOS, endotel kökenli gevşetici faktör oluşturan NOS izoformudur⁶⁷. Hayvan ve insanlarda yapılan çalışmalarda NOS inhibitörlerinin kan veya perfüzyon basıncını arttırdığı, vasküler rezistansı arttırdığı ve kan akışını hem in vitro ve hem de in vivo azalttığını göstermişlerdir¹⁹³.

II.F.4. eNOS'un Fizyolojik Aktivasyonu

Endotel hücreleri intraselüler Ca^{++} 'u mobilize eden otokoidlere cevap olarak NO salıverirler. Salıverilen Ca^{++} kalmoduline bağlanır. Ca^{++} -kalmodulin kompleksi NO sentezini uyaran enzimin kalmodulin bölgesine bağlanır. NO salıverilmesi için shear stres fizyolojik uyarandır. Endotel hücrelerinin shear strese maruz kalması sonucu NO salıverilmesinde artış gözlenir. In vitro artan shear strese karşı vasküler yatakta dilatasyon meydana gelirken azalan shear stres

vazokonstriksiyonu tetikler. Shear stres ile indüklenen NO salıverilmesi ve vazodilatasyon NOS inhibitörleri ile bloke edilebilir¹⁹³.

II.G. Serbest Radikaller

Dış yörüngelerinde eşlenmemiş bir çift elektron içeren moleküller serbest radikaller olarak adlandırılmaktadır. Eşlenmemiş elektron içerdikleri için stabil değildirler bu yüzden yarı ömürleri kısa olup oldukça reaktif ürünlerdir. Serbest radikaller, anyonik, katyonik veya nötral olabilir.

Oksidatif stres, hücrelerin aşırı derecede oksijene veya reaktif oksijen türevleri de denilen oksijenin kimyasal türevlerine maruziyetini ifade etmektedir. Reaktif oksijen türevlerine aşırı maruziyet sonucu vasküler hasar, ateroskleroz, diyabet, nöronal bozukluklar ve iskemi-reperfüzyon hasarı gibi bir takım patolojiler oluşmaktadır. Vasküler fonksiyon oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki dengeyle düzenlenmektedir. Hücreler, moleküler oksijeni suya indirgeyerek enerji üretirler. Bu işlem sırasında süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksinitrit ($OONO^-$), hipokloröz asit ($HOCl$) ve hidroksil radikali ($OH^\cdot$) gibi reaktif türevler açığa çıkmaktadır. Homeostatik koşullarda bu moleküller, hücre fonksiyonlarını düzenleyici olarak rol oynamaktadırlar¹⁸.

Biyolojik açıdan oksijen en önemli serbest radikallerden biridir. Moleküler oksijen dış yörüngesinde 2 adet eşlenmemiş elektrona sahiptir bu yüzden

oldukça reaktiftir. Oksijen hücreler tarafından alındığında mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemleriyle 4 elektron alarak suya indirgenmektedir. Oksijenin indirgendiği bu reaksiyonun ara basamaklarında sırasıyla süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve OH^- radikali oluşmaktadır¹⁸.

II.G.1. Endojen Serbest Radikal Kaynakları

II.G.1.a. NAD(P)H Oksidaz

Endotel ve vasküler kaynaklı $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'in ana enzimatik kaynağıdır. gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox}, p22^{phox} gibi altüniteleri bulunmaktadır. NAD(P)H oksidaz-1 protein düzeyleri vasküler hücrelerde az miktarda bulunmasına rağmen PDGF ve angiotensin II gibi uyarılarla indüklenebilmektedir. Büyüme faktörleri, sitokinler, shear stres gibi faktörler enzimin aktivitesini düzenler. H_2O_2 ve lipid peroksitleri NAD(P)H oksidaz aktivitesini stimüle eder ve reaktif oksijen türevlerinin aşırı artışına neden olabilir. Diyabetik ve aterosklerotik arterlerde yapılan çalışmalarda, bu enzimin alt ünitelerinin düzeylerinde süperoksit düzeyleriyle ilişkili olarak artış olduğu gösterilmiştir^{83,206}. Sonuç olarak, vasküler hastalıklarda artmış NAD(P)H oksidaz aktivasyonunda proteinin kendisinin veya alt ünitelerinin gen ekspresyonlarındaki artışlar önemlidir. Anjiyotensin II, altünite ekspresyonlarında artış yaparak NAD(P)H oksidaz aktivitesini arttırmaktadır¹⁴⁷.

Vasküler düz kas ve endotel hücrelerinde fizyolojik ve patolojik durumlardaki oksidatif strese katkıda bulunan farklı NAD(P)H izoformları

tanımlanmıştır³⁰ Sıçan aorta vasküler düz kas hücre kültürlerinde yapılan bir çalışmada, 4-6 saat 100 nM anjiyotensin II inkübasyonu sonucunda lusigenin ile ölçülen NAD(P)H oksidaz aktivitesinde ve süperoksit oluşumunda anlamlı artış olduğu gösterilmiştir ve bu artış spesifik NAD(P)H oksidaz inhibitörü difenileniodonium (DPI) ile ortadan kalkmıştır. NAD(P)H oksidazın vasküler yatakta süperoksitin ana kaynağı olabileceği bildirilmiştir⁷⁸. NAD(P)H oksidaz inhibitörü apocynin uygulanan sıçan izole arterlerinde, insan internal meme arteri ve safen vende NAD(P)H oksidaz aracılıklı süperoksit oluşumunun inhibe olduğu, endotel bağımlı gevşemelerin arttığı ve NO üretiminin arttığı gösterilmiştir⁸⁴. Domuz koroner arter endotel hücrelerinin, anjiyotensin II ile estrogen varlığında ve yokluğunda stimüle edildiği bir çalışmada, anjiyotensin II'nin oksidatif strese katkıda bulunan NAD(P)H oksidaz ekspresyonunu stimüle ettiği ve 1nM estrogenin bu etkiyi ortadan kaldırdığı gösterilmiştir⁷⁶.

İnsan umbilikal ven endotel hücre kültürlerinde yapılan bir çalışmada, 1-100 nM 17 β -estradiolün NADPH oksidazın alt ünitesi olan gp91phox ekspresyonunu konsantrasyon ve zaman bağımlı olarak azalttığını ve bu etkinin estrogen reseptör antagonisti ICI 182,780 ve tamoksifen ile ortadan kalktığı gösterilmiştir²²⁸.

II.G.1.b. NOS

Vasküler yatakta normal koşullarda eNOS tarafından sentezlenen NO, vasküler tonüsün düzenlenmesinden sorumludur. Normal fizyolojik koşullarda hücrede, NOS L-arjininden NO oluşumuna yol açmaktadır. L-Arjinin ve tetrahidrobiopterin

(BH₄) düzeylerinin azalması gibi bazı durumlarda NOS, NO'den çok O₂⁻ oluşturmaktadır. Bu fenomen “NOS uncoupling” olarak adlandırılır. Bu durumda NOS'ın redüktaz bölgesinden oksidaz bölgesine giden elektronlar L-arjinin yerine moleküler oksijene yönelirler. Eksojen BH₄ verilmesi bu durumu ortadan kaldırmaktadır¹⁸¹. Yeterli BH₄ içermeyen ve eNOS uncoupling araştırmaları için kullanılan bEnd.3 hücrelerinde yapılan bir çalışmada eNOS stimülasyonu yapılmış ve buna bağlı olarak ROS üretiminin arttığı bu etkinin BH₄ ve L-NAME verilmesi ile ortadan kalktığı gösterilmiştir²². Spontan hipertansif sıçan aortasında yapılan bir çalışmada, eNOS ekspresyonlarında artış olduğu gösterilmiştir fakat, bunun yanında NO salıverilmesinin azaldığı ve süperoksit oluşumunun da arttığı gözlenmiştir. Bu durum, eNOS uncouplinge bağlanmış ve spontan hipertansif sıçanlarda gözlenen hipertansiyon ve vasküler komplikasyonlara katkıda bulunduğu gösterilmiştir.

NO radikali O₂⁻ ile reaksiyona girerek sitotoksik peroksinitrit adlı bileşiği oluşturmaktadır. Peroksinitrit LDL'yi direkt okside etmekte ve hücrelerde kalıcı hasar oluşturmaktadır¹⁸.

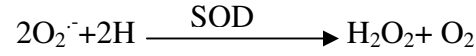
II.G.2. Serbest Radikal Süpürücü Mekanizmalar

Organizmanın serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı çeşitli koruyucu mekanizmaları bulunmaktadır.

II.G.2.a. Enzimatik Antioksidanlar

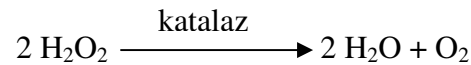
II.G.2.a.i. SOD

Cu,Zn-SOD olarak da adlandırılır. Cu^{+2} , katalitik aktiviteyi sağlarken Zn^{+2} kimyasal yapıyı stabilize eder. O_2^- radikalini H_2O_2 'ye dönüştürür. H_2O_2 ile reaksiyona girecek O_2^- radikalini ortadan kaldırır ve $\cdot\text{OH}$ radikali oluşur¹⁸.



II.G.2.a.ii. Katalaz

Hücrede, peroksizom adlı organelde bulunmaktadır. H_2O_2 'i su ve oksijene dönüştürür. Bir molekül katalaz, bir dakikada yaklaşık 6 milyon molekül H_2O_2 'i su ve oksijene dönüştürebilmektedir



II.G.2.a.iii. Glutasyon Peroksidaz

Selenyum bağımlı ve selenyum bağımsız olmak üzere 2 tipi bulunmaktadır. Sitozol ve mitokondride SOD'un oluşturduğu H_2O_2 'yi ortadan kaldırır²²².

II.G.2.b. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Flavonoidler antioksidan kapasiteye sahip bileşiklerdir. Kırmızı şarap ve üzüm suyunda resveratrol, kersetin, kateşin, mirsetin, kemferol, tannik asit gibi flavonoidler bulunmaktadır. Kersetin, güçlü bir antioksidan olup *in vitro* olarak aortada gevşeme yaptığı gösterilmiştir. Kateşinler de şarabın dışında sebze, meyve ve çayda bulunan güçlü antioksidanlardır. Flavonoidler, direkt radikal süpürücü özellik gösterebildikleri gibi endojen antioksidanların fonksiyonunu da artırır. Flavonoidler, serbest radikalın reaktif kısmı ile etkileşerek onu daha stabil hale dönüştürürler. Epikateşin ve rutin de güçlü radikal süpürücü özelliğe sahiptir⁸⁵. Rutin ayrıca ksantin oksidazı da inhibe etmektedir. Flavonoidler, radikal süpürücü özellikleri sayesinde *in vitro* LDL oksidasyonunu önlemektedir¹¹². Flavonoidler dışında C vitamini, E vitamini, karotenler gibi daha bir çok enzimatik olmayan antioksidan bileşikler bulunmaktadır¹⁵⁵.

II.H. HDL

Kardiyovasküler hastalık gelişiminde HDL ve estradiol önemli role sahiptir¹⁴¹. Dişi Wistar sıçan aortalarında yapılan bir çalışmada, 10^{-6} M fenilefrinle kastırılan torasik aortalarda 0.5 ng/ml HDL ile gevşeme gözlenmiştir. HDL nin oluşturduğu bu etkinin L-NAME ile ortadan kalktığı ve eNOS geni çıkarılmış sıçanlarda HDL nin gevşetici etki oluşturmadığı gösterilmiştir. İnsan umbilikal ven endotel hücre kültürlerinde de 0.5 ng/ml HDL'nin NO salıverilmesini stimüle ettiği gösterilmiştir¹⁵⁶. Dişi farelerin fenilefrin ile prekontrakte edilen torasik aortalarında HDL (10-25 µg/ml) gevşeme oluşturmuştur. Endotel tahrip edildiğinde veya L-NAME uygulandığında HDL'nin gevşetici etkisi ortadan kalkmıştır. HDL'nin eNOS aktivasyonunu ve damar gevşemelerini SR-BI (scavenger reseptör tip 1) bağımlı olarak arttırabildiği gösterilmiştir. HDL'nin gevşetici etkisinin endotel bağımlı olduğu bildirilmiştir²⁴³.

HDL, periferdeki kolesterolü karaciğere taşıyarak kan kolesterol düzeyini düşürmektedir. HDL, karaciğerde SR-BI reseptörüne bağlanarak sterolü hepatositlere aktarır. SR-BI ayrıca endotel hücrelerde eksprese edilir ve caveolada lokalize olur¹³⁴. Dişi farelerden ve kadınlardan izole edilen HDL'nin femoral arter şeritlerinde gevşeme oluşturduğu fakat erkeklerden izole edilen HDL nin böyle bir etki oluşturmadığı gösterilmiştir. 30 nM serotonin ile prekontrakte edilen femoral arter şeritlerinde, dişilerden elde edilen HDL'nin 0.01-1 µg/ml doz aralığında endotel

bağımlı gevşeme oluşturduğu gösterilmiştir. Fakat, erkeklerden elde edilen HDL gevşeme meydana getirmemiştir⁷⁴.

III. MATERYAL VE YÖNTEM

III.A.1. Kullanılan Deney Hayvanları

Deneylede 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyodunda senkronize edilmiş 200-250 g ağırlığında dişi ve erkek Wistar-albino sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Satış Merkezinden alınmıştır. Sıçanlar, erkek (kontrol), erkek resveratrol içen (resveratrol tedavisi, resveratrol uygulaması), dişi (kontrol), dişi resveratrol içen olmak üzere dört ana gruba ayrılmıştır. Hayvanlar standart sıçan yemi ile beslenmişlerdir. İçme suyu olarak kontrol gruplarına çeşme suyu, diğer iki gruba ise 50 mg/L konsantrasyonda resveratrol ilave edilmiş çeşme suyu 21 gün boyunca içirilmiştir. Resveratrolün ışıktan bozunmasını önlemek için şişeler alüminyum folyo ile sarılarak ışık geçirmesi engellenmiştir.

Çalışmalar Gazi Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu İzni alınarak gerçekleştirilmiştir.

III.A.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Hazırlanmaları

III.A.2.a. İzole Organ Banyosu Deneylerinde ve Süperoksit Ölçümünde Kullanılan Kimyasallar

17 β -estradiol (Serva), ICI 182,780 (Tocris), HDL (ICN Biochemicals), Lusigenin (Fluka) hariç bütün kimyasal maddeler Sigma firmasından satın alınmıştır. 17 β -estradiol, ICI 182,780 Alkolde çözülüp distile su ile dilüe edilmiştir

III.A.2.b. PCR Yönteminde Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri

RNeasy Fibrous tissue Mini kit (Qiagen). Random hexamer primer, deionize su, 5x reaction buffer, 10 mM dNTP mix, RNase inhibitor, Reverse transcriptase, Primer eNOS-F, Primer eNOS-R, Tag Polimeraz, dNTP mix, Accutag LP Buffer, PCR water, GADPH (Fermentas). Etanol, Merkaptotanol, DMSO (Merck). PCR tüpü (Sigma).

III.A.2.c. Western Blotting Yönteminde Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri

Tris, Primer antibody-eNOS, Primer antibody-iNOS, Sekonder antibody (Sigma), Merkaptotanol (Merck).

Hazırlanan stok çözeltiler derin dondurucuda saklanmış, kullanılacakları zaman Krebs çözeltisi ile seyreltilerek kullanılmıştır. Etanol ile hazırlanan çözeltilerde etanol hacmi 20 µl'yi geçmeyen miktarlarda organ banyosuna ilave edilmiştir. Kullanılan miktardaki alkolün dokuların kasılma ve gevşeme cevaplarını etkilemediği ön deneylerde belirlenmiştir.

Deneylerde Kullanılan Krebs Çözeltisinin Bileşimi (mM):

NaCl :118, KCl :4.73, KH₂PO₄: 1.2, MgSO₄: 1.2, CaCl₂: 2.5, NaHCO₃: 25, Glukoz: 11, EDTA: 0.026.

III.B. ARAÇ VE GEREÇLER

III.B.1. Resveratrol ölçümü

Homojenizatör (Ultra Turrax Ika T18 Basic)

HPLC cihazı (Agilent 1100 series , Waldbronn, Germany)

III.B.2. *In vitro* İzole Organ Banyosu Deneyleri

Çift cidarlı izole organ banyosu (Çalışkan Cam)

Gerim ileticisi (Powerlab AD Instruments)

Amplifier (Powerlab AD Instruments)

Bilgisayar kontrollü özel kaydedici sistem (Powerlab AD Instruments)

Sirkülasyonlu su banyosu (Grant)

%95 O₂ ve %5 CO₂ içeren gaz karışım tüpü

III.B.3. Süperoksit Ölçümü

Beta Sayacı (Wallac1450 Microbeta TRILUX liquid scintillation counter)

Elisa plate (96 kuyucuklu)

III.B.4. PCR yöntemi için

Cam-cam homojenizatör

Buz makinası

Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems)

Masaüstü Santrifüj (Biofuge fresco heraeus instruments)

Etüv (Fisher Scientific ISO temp incubator 6500)

Otoklav (Priorclave,Tactrol-2 Psimiclic 40)

III.B.5. Western blotting yöntemi için

Blotting unit (Hoefer marka)

Elektroforez ünitesi (Hoefer marka)

Semi-dry blotting unit (Biorad marka)

Çalkalayıcı (Hoefer marka)

Etüv (Fisher marka)

III.B.6. Nitrit Ölçümü

Roche Nitrit/Nitrat Kolorimetrik Ölçüm Kiti (fotometrik endpoint 1746081)

Cayman Doku Nitrit/Nitrat Kiti (760871)

III.B.7. Estradiol Ölçümü

Sıçan plazma estradiol kiti (Access ESTRADIOL, Beckman Coulter TM, USA)

III.B.8. Lipit profili Ölçümü

Olympus marka lipit ölçüm kitleri (OLYMPUS, USA)

III.C. YÖNTEMLER

III.C.1. Dişi ve Erkek Sıçanların Plazma ve Karaciğer Örneklerinde Resveratrol Analizi

Dişi ve erkek sıçanlardan alınan kan ve karaciğer örneklerinde resveratrol analizi Soleas ve ark.'nın tanımladığı yöntemle yapılmıştır²⁰⁵. Buna göre, soğuk Krebs solüsyonu içerisinde temizlenen karaciğer dokusundan 1 g lık parça alınıp 5 hacim % 95 (v/v) etanol içinde homojenizatör yardımıyla 3 dakika süreyle homojenize edilmiştir. Homojenizasyonun ardından homojenat 4°C, 1500 g'de 15

dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Supernatan ayrıldıktan sonra, kalan kısım aynı hacim etanol eklenerek tekrar santrifüj edilmiştir. 3 kere tekrarlanan ekstraksiyon işleminin ardından, supernatanlar toplanarak toplam hacim belirlenmiştir. Kan örneklerinde de benzeri ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. Dokulardan elde edilen supernatan örneklerinde *trans*-resveratrol analizi, hem HPLC cihazında DAD (Diiodo array dedektörü) kullanılarak hem de LC/APCI-MS (kütle spektroskopisi) ile gerçekleştirilmiştir. Analitik ayrışma ACE 5 C18, 4.6x250 mm kolonda 0.01 mM asetonitril, 0.01 mM asetik asitin % 0.2'lik formik asitteki çözeltisi ve metanolden oluşan mobil fazda, 25°C'de 320 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir

III.C.2. Biyokimyasal Ölçümler

III.C.2.a. Uzun Süreli Resveratrol Uygulamasının Lipid Profili Üzerine Etkisi

Dişi ve erkek sıçanlardan intrakardiyak olarak alınan 2 cc kan örneği 20 dakika 3000 g'de santrifüj edilmiştir. Ayrılan plazma kısmı, pastör pipeti ile alınarak ayrı bir ependorf tüpe koyulmuş ve -70 derecede dondurulmuştur. Total kolesterol, HDL kolesterol, LDL-kolesterol, VLDL-kolesterol ve trigliserit düzeyleri uygun enzimatik analiz kitleri kullanılarak Ufuk Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarlarında ölçülmüştür.

III.C.2.b. Uzun Süreli Resveratrol Uygulamasının Plazma Estradiol Düzeyleri Üzerine Etkisi

Deney günü dişi ve erkek sıçanlardan intrakardiyak olarak alınan kan örnekleri 20 dakika 3000 g’de santrifüj edilmiştir. Ayrılan plazma kısmı pastör pipeti ile alınarak ayrı bir ependorf tüpe koyulmuş ve –70 derecede dondurulmuştur. 0.5 cc plazma örneği kullanılarak 17 β –estradiol düzeyi, uygun elektrokemilüminesans kiti ile ticari firma tarafından tanımlanan yöntemle göre ölçülmüştür.

III.C.2.c. Uzun Süreli Resveratrol Uygulamasının Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

SOD ölçümü, Yi ve ark’nın tanımladığı yöntemle göre yapılmıştır²⁴¹. Sıçan kanlarından elde edilen plazma örnekleri 5000g’de +4°C’de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatant kloroform-etanol karışımıyla 1/1 oranında karıştırılmış ve +4 °C’de 5000g ‘de 2 saat santrifüj edilmiştir. Total SOD için her tüpe 2,850 ml reaktif karışımı, 100 μ l numune ve 50 μ l ksantin oksidaz koyulup 25°C’de 20 dakika inkübe edildikten sonra, 0.8 mM CuCl₂’den 1 cc eklenmiş ve 560 nm’de spektrofotometrik SOD ölçümü yapılmıştır.

III.C.2.d. Uzun Süreli Resveratrol Uygulamasının Serum Bakır ve Çinko Düzeyi Üzerine Etkisi

Serum bakır ve çinko düzeyleri Piper Higgins'in tanımladığı yöntemle göre ölçülmüştür¹⁷¹. Serum örnekleri trikloroasetik asit ile muamele edilmiş ve proteinlerinden ayrılmış ve ardından santrifüj edilmiştir. Elde edilen supernatanın bakır için 324.7 nm ve çinko için 237.4 nm de absorbansları ölçülerek bakır-çinko düzeyi saptanmıştır.

III.C.3. Sıçan Aorta Halkalarının Hazırlanışı

Sıçanlar, CO₂ uygulanarak sakrifiye edilmişlerdir. Toraks ve abdomen hızla açılarak intrakardiyak olarak 2-3 cc kan örneği alınmıştır. Daha sonra torasik aorta izole edilerek soğuk Krebs çözeltisi içeren petri kabına alınmıştır. Petri kabına alınan torasik aorta çevre dokularından temizlendikten sonra 3-4 mm'lik halkalar halinde kesilmiştir. Bazı hayvanların torasik aortasından 3 cm lik bir parça sıvı azot içine alınarak PCR ve Western blotting yöntemleri için kullanılmak üzere -70°C de saklanmıştır. Bazı aorta halkalarında endotel tabakası forseps ucu kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Aorta halkaları, paslanmaz çelikten yapılmış L tipi doku kancaları arasına yerleştirilerek izometrik gerim ölçümü için 10 ml lik izole organ banyosuna asılmışlardır. Preparatlar, %95 O₂ ve %5 CO₂ karışımı ile havalandırılan 37°C'deki Krebs çözeltisi içinde 1 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 (gerim ölçer) yardımıyla bilgisayara kaydedilmiştir.

III.C.4. Biyoassay Deney Protokolü ve İlaç Uygulamaları

İzole organ banyosundaki aorta halkaları, dengelenme periyodu sonunda 40 mM KCl ile kastırılmıştır. KCl uygulaması üç kez tekrarlanmış ve benzer kasılma cevabı gösteren dokularda deney protokolü uygulamasına geçilmiştir. 10^{-6} M fenilefrin ile kastırılan dokulara, 10^{-6} M asetilkolin uygulanarak endotel bütünlüğü kontrol edilmiştir. Asetilkolin uygulanması sonrasında gevşeme cevabı göstermeyen veya % 15'in altında gevşeme cevabı gösteren dokular endotelsiz kabul edilmişlerdir. Hem erkek hem dişi, resveratrol içen ve içmeyen sıçanların aorta halkalarında (endotelli ve endotelsiz), fenilefrinin 10^{-9} - 10^{-4} M doz aralığında uygulanarak doz-cevap eğrisi oluşturulmuş ve fenilefrinin, submaksimal (% 80-90) kontraksiyon oluşturduğu konsantrasyonları saptanmıştır. Resveratrol içen ve içmeyen sıçanlardan izole edilen endotelli ve endotelsiz aortalar, 2×10^{-6} M (dişi için) ve 3×10^{-6} M (erkek için) fenilefrinle prekontrakte edilmişlerdir. Asetilkolin (10^{-9} - 10^{-4} M), estrogen (10^{-10} - 10^{-4} M), HDL (0.001-0.3 µg/ml) ve sodyum nitroprussiyat (10^{-10} - 10^{-5} M) kümülatif doz-cevap eğrileri, dişi ve erkek sıçanların endotelli ve endotelsiz aorta halkalarında elde edilmiştir. Ayrıca, ICI 182,780 (estrogen reseptör antagonisti, 10^{-6} M) 20-30 dakika inkübasyonu sonrasında endotelli ve endotelsiz dokularda estrogenin etkisi incelenmiştir. Bazal nitrik oksit düzeylerini belirlemek için, bir grup aorta halkası 20 dakika boyunca 100 µM L-NOARG (N-nitro-L-arjinin) ile inkübe edilmiş ve oluşan prekontraksiyonlar ölçülmüştür. Diğer bir grup deneylerde, resveratrol içen ve içmeyen dişi ve erkek sıçanların aorta halkalarında (endotelli ve endotelsiz), anjiyotensin II (10^{-10} - 10^{-5} M) doz-cevap eğrisi elde edilmiştir.

III.C.5. Sıçan Aortasında Süperoksit Düzeylerinin Ölçümü

Sıçan aortasında süperoksit düzeyleri lusigenin ile uyarılmış kemilüminesans yöntemi ile ölçülmüştür. Bu yöntemin, intakt damarda süperoksit ölçümü için duyarlı ve güvenilir bir yöntem olduğu gösterilmiştir²⁰¹. Aorta halkaları (3-4 mm) HEPES tampunu içine alınmış ve karanlıkta 37°C’de 10 dakika inkübe edilmiştir. HEPES tamponu içerisinde hazırlanan 5 µM lusigenin çözeltisinden 200 µl Eliza plakasındaki kuyucuklara koyulmuş ve 10 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. Daha sonra 10 dakika boyunca beta sayacında kemilüminesans kaydedilerek kör değeri hesaplanmıştır. Ardından aorta halkaları kuyucuklara eklenerek 10 dakika boyunca cihazda süperoksit ölçümü yapılmıştır. Ölçülen miktardan kör değeri çıkarılarak süperoksit miktarı bulunmuştur.

Kontrol ve resveratrol içen dişi ve erkek sıçanların endotelli ve endotelsiz aortalarında süperoksit düzeyleri estrogen (10^{-6} M), asetilkolin (10^{-6} M), HDL (0.01 µg/ml) veya anjiyotensin II varlığında veya yokluğunda ölçülmüştür. Süperoksit oluşumu NAD(P)H oksidaz substratları olan 100 µM NADH veya NADPH ile 10 dakika 37°C’de stimüle edilen arter halkalarında da ölçülmüştür. Başka bir grup deneyde NAD(P)H ile stimüle olan süperoksit oluşumu 20 dakika resveratrol (1 µM), SOD (200 Ü/ml) veya DPI (10 µM) preinkübasyonu yapılan dokularda ölçülmüştür. Ölçülen süperoksit değerleri sayım/dakika/mg doku ağırlığı olarak ifade edilmiştir.

III.C.6.Uzun Süreli Resveratrol Tedavisinin eNOS Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Belirlenmesi

Azot gazında dondurulmuş ve -70°'de stoklanmış erkek ve dişi sıçanlardan izole edilen aorta parçaları (~100 mg), cam cam homojenizasyon yöntemi ile tris 1 M, EDTA 100 mM, EGTA 100 mM, chaps 20 mM, pefaobloc 2 mM içeren çözelti içinde homojenize edilmiştir. Daha sonra 5000 g'de 4°C'de 20 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant alınarak Bradford yöntemiyle protein miktar tayini yapılmıştır. Daha sonra her bir örnekten 30 µl alınarak % 10'luk (Acrilamid, Tris, SDS, TEMED, APS) içeren SDS-jele yüklenmiştir. Proteinler %10 SDS-PAGE (sodyum-dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi) ile 25 mA'de 30 dakika ve 50 mA'de 60 dakika sürüklenerek ayrıştırılmıştır. Jel üzerindeki proteinler elektroforetik olarak nitrosellüloz membranlara aktarılmıştır (BioRAD transfer sistemi ile 45 mA 1 saat). Membranlar %8 yağsız süt tozu içeren PBS-T (%0.1 Tween 20 içeren fosfatla tamponlanmış fizyolojik tuz çözeltisi) ile gece boyunca +4 °C'de bloklandıktan sonra ertesi gün PBS-T ile yıkanmıştır. Membranlar, önce görüntülenmek istenen proteinlere özgün primer antikorlarla (eNOS,1:2000 ve anti iNOS,1:5000, PBS-T içinde) ve daha sonra horse radish peroksidazla (HRP) konjuge sekonder antikorla (1:10000) birer saat, oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Tekrar PBS-T ile yıkanan membranlardaki özgün protein bantları HRP substratı ile işaretlenmiştir. Protein bantları Enhanced Chemi Luminescence (ECL) yöntemi ile görüntülenmiştir. Görüntüler daha sonra Kodak X-ray filmlere aktarılmıştır.

III.C.7.Uzun Süreli Resveratrol Tedavisinin eNOS mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisinin Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyon Analizi (RT-PCR) ile Belirlenmesi

Aortada eNOS mRNA ekspresyonu ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyon analizi (RT-PCR) ile belirlenmiştir. Erkek ve dişi sıçanlardan izole edilen aorta parçaları (~30 µg) cam cam homojenizatörü kullanılarak homojenize edilmiştir. Daha sonra RNA izolasyon kiti kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonundan sonra 260-280 nm’de spektrofotometrik olarak RNA miktar tayini yapılarak ardından komplementer DNA (cDNA) eldesine geçilmiştir. Bunun için elde edilen RNA’ya random hekzamer primer ve deionize su eklenerek 70°C’de 5 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra 5x reaksiyon tamponu, 10 mM dNTP karışımı ve RNase inhibitörü eklenerek 25°C’de 5 dakika inkübe edilmiştir. Reverse transkriptaz eklenerek 25°C’de 10 dakika, 42°C’de 60 dakika, 70°C’de 10 dakika inkübe edilerek cDNA elde edilmiş ve elde edilen cDNA üzerinde PCR yapılmıştır. cDNA üzerine eNOS-R ve eNOS-F primerleri, Tag polimeraz, dNTP karışımı, DMSO, 10x Accutag LA tamponu ve PCR suyu eklenerek 94°C’de 3 dakika denatüre edilip sırasıyla 94°C’de her biri 30 saniyelik 30 siklus, 58°C’de 30 saniye, 72°C’de 30 saniye ve en son siklуста 72°C’de 5 dakika inkübasyon basamakları gerçekleştirilerek PCR işlemi tamamlanmıştır. PCR’dan sonra elde edilen PCR ürünü ve DNA standartları (80-1030 bp) % 1.7’lik agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforezden sonra bandlar UV ışığı altında etidyum bromür ile görüntülenmiş ve fotograflanmıştır. Bantların dansitometrik analizi Bio-Profil Image Analysis System (Vilber Lourmat, France) kullanılarak

gerçekleştirilmiştir. Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) mRNA ekspresyonu kontrol olarak kullanılmıştır. Sıçan eNOS ve GAPDH sekansları dikkate alınarak aşağıdaki primerler RT-PCR deneylerinde kullanılmıştır. eNOS sense 5'-CTG-GCA-AGA-CCG-ATT-ACA-CGA-3', eNOS antisense 5'-CGC-AAT-GTG-AGT-CCG-AAA-ATG-3', GAPDH sense 5'-TCC-ACC-ACC-CTG-TTG-CTG-TA-3', GAPDH antisense 5'-ACC-ACA-GTC-CAT-GCC-ATC-AC-3'.

III.C.8. Uzun Süreli Resveratrol Uygulanmasının Plazma ve Aorta Nitrit Düzeyleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Yöntem, örneklerdeki nitratin, nitrat redüktaz ile (NADPH ve FAD ile birlikte) nitrite çevrilmesi ve oluşan nitritin Griess Reaktifi (Sulfanilamid ve N-naftiletilendiamin-di HCl) ile reaksiyona girerek kırmızı-pembe renk oluşturması ve oluşan bu renkli diazo bileşiğinin 540 nm'de verdiği absorbansın ölçülmesi esasına dayanmaktadır⁷⁷. Sıçan serum ve aorta örnekleri homojenize edildikten sonra nitrit düzeyleri uygun kitler kullanılarak ölçülmüştür..

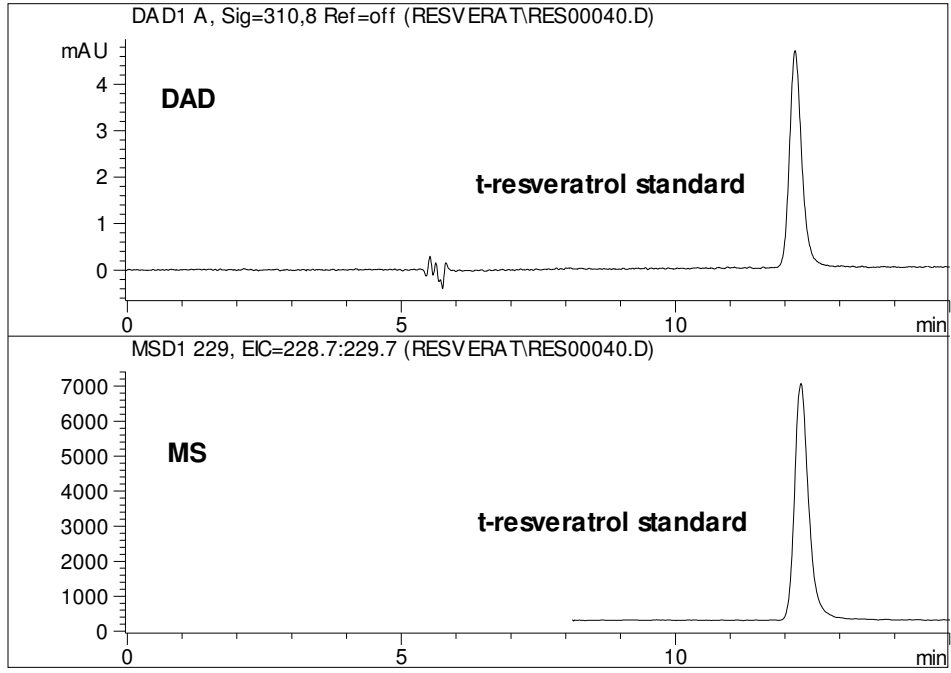
IV. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Anjiyotensin II'nin oluşturduğu kasılma cevapları 40 mM potasyum klorürün oluşturduğu kasılmanın % 'si olarak ifade edilmiştir. Asetilkolin, estrogen, HDL ve SNP ile oluşan gevşeme cevapları, fenilefrin ile oluşan prekontraksiyondaki % azalma olarak ifade edilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ s.h. olarak ifade edilmiştir. n sayısı tek bir hayvandan alınan aortayı ifade etmektedir. Maksimum cevabın % 50 sini (EC₅₀) oluşturan madde konsantrasyonu ve E_{max} (maksimum cevap) Prism 4.03 Graphpad programı kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar, Student t testi aracılığı ile eş olmayan gruplar arasındaki farkın anlamlılık testi kullanılarak analiz edilmiştir. 0.05'den küçük P değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Süperoksit düzeyleri, PCR ve biyokimyasal ölçümlerle ilgili datalar da Student-t testi kullanılarak analiz edilmiştir.

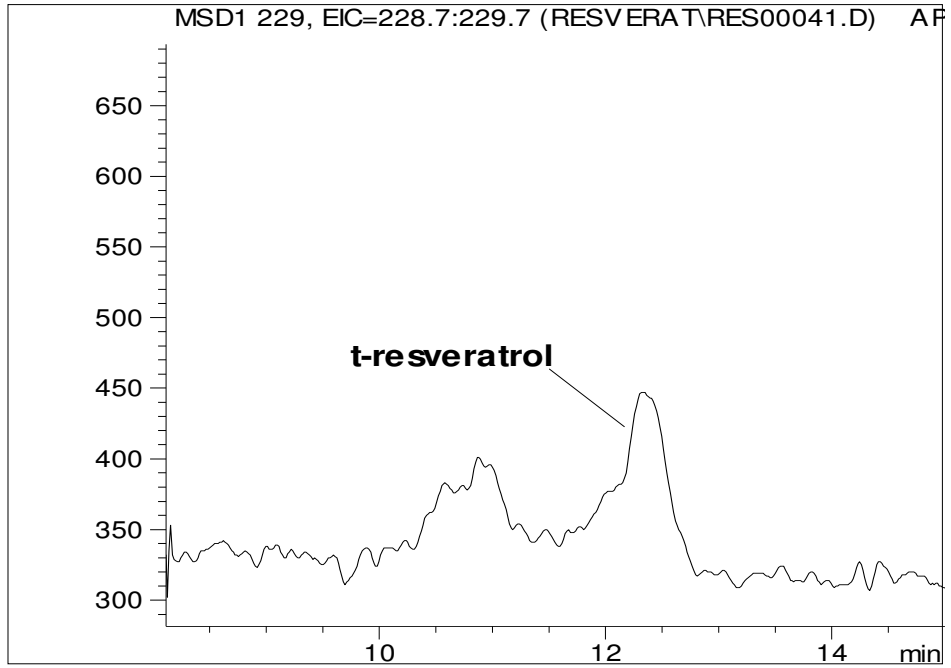
V. BULGULAR

V.1. Erkek ve Dişi Sıçanlara Uzun Süreli Resveratrol Uygulanmasından Sonra Plazma ve Karaciğer Örneklerinde Resveratrol Düzeylerinin Belirlenmesi

Erkek ve dişi sıçan plazma ve karaciğer örneklerinde *trans*-resveratrol ölçümü Tübitak Ankara Test ve Analiz Laboratuvarında yapılmıştır. Erkek ve dişi sıçanların plazma örneklerinde resveratrol düzeyleri ölçülebilir sınırların altında bulunmuştur. HPLC cihazında LC/APCI-MS ve DAD dedektörleri ile 7 ng/ml sınırının üstündeki değerler okunabilmektedir. Erkek ve dişi sıçan karaciğer örneklerinde resveratrol miktarı 40-50 ng/g olarak ölçülmüştür (Şekil 2,3).



Şekil 2. HPLC ve MS yöntemleri kullanılarak elde edilen standart *t*-resveratrol kromatogramları.



Şekil 3. Resveratrol içen sıçanların karaciğer ekstraktlarında *t*-resveratrol taramasını gösteren kromatogram örneği.

V.2. Biyokimyasal Ölçümler

V.2.A. Erkek ve Dişi Sıçanlara Uzun Süreli Resveratrol Uygulanmasının Vücut Ağırlığı, 17 β -estradiol Düzeyleri ve Lipid Profili Üzerine Etkisinin İncelenmesi

21 gün boyunca 50 mg/L resveratrol içimi erkek ve dişi sıçanların vücut ağırlığında anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır (Tablo 2). Resveratrol içimi, erkek ve dişi sıçanların plazma lipid profili üzerinde de önemli bir değişiklik oluşturmamıştır. Plazma estrogen düzeylerinin ise, resveratrol içen erkek ve dişi sıçanlarda anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır (Tablo 2).

Tablo 2. Erkek ve dişi sıçanlarda uzun süreli resveratrol uygulamasının(res) vücut ağırlığı, kan lipid profili ve estradiol düzeyleri üzerine etkisi

	<i>Erkek</i>	<i>Erkek res</i>	<i>Dişi</i>	<i>Dişi res</i>
Başlangıç vücut ağırlığı (g)	221.5 $\pm$ 2.2	225.2 $\pm$ 2.7	209.1 $\pm$ 2.2	214.4 $\pm$ 2.5
Res sonrası vücut ağırlığı (g)	224.6 $\pm$ 2.5	230.3 $\pm$ 2.5	213.9 $\pm$ 2.4	219.1 $\pm$ 2.3
Total kolesterol (mg/dl)	81,6 $\pm$ 1.5	76.4 $\pm$ 2.4	84.3 $\pm$ 4.4	98.3 $\pm$ 6.1
Trigliserit (mg/dl)	87.1 $\pm$ 6.7	93.4 $\pm$ 4.5	104.6 $\pm$ 6.7	114.8 $\pm$ 1.9
HDL-kol (mg/dl)	47.7 $\pm$ 1.2	48.7 $\pm$ 1.5	49.9 $\pm$ 2.3	55,3 $\pm$ 3.5
LDL-kol (mg/dl)	30.4 $\pm$ 4.1	27.1 $\pm$ 3.5	23.2 $\pm$ 2.6	23.7 $\pm$ 2.1
VLDL-kol (mg/dl)	17.3 $\pm$ 1.7	18.6 $\pm$ 1.1	20.8 $\pm$ 1.3	19.5 $\pm$ 1.6
Estradiol (pg/ml)	7.7 $\pm$ 0,6	3,6 $\pm$ 0,6*	32,1 $\pm$ 1,7	10,8 $\pm$ 2,2#

Değerler ortalama $\pm$ s.h.olarak ifade edilmiştir. * P <0.01 erkek kontrolden anlamlı farklı, # P <0.05 dişi kontrolden anlamlı farklı, n=31-40.

V.2.B. Erkek ve Dişi Sıçanlara Uzun Süreli Resveratrol Uygulanmasının Superoksit Dismutaz Aktivitesi, Plazma Bakır ve Çinko Düzeyi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

21 gün boyunca 50 mg/L resveratrol içimi, süperoksit dismutaz aktivitesi ve antioksidan metaller olan bakır ve çinko düzeyleri üzerinde herhangi bir değişiklik oluşturmamıştır (Tablo 3).

Tablo 3. Uzun süreli resveratrol uygulamasının (res) erkek ve dişi sıçanların plazma süperoksit dismutaz (SOD), bakır ve çinko düzeyleri üzerine etkisi

	<i>Erkek</i>	<i>Erkek res</i>	<i>Dişi</i>	<i>Dişi res</i>
SOD, Unite/mg protein	18.7±0.5	17.8±0.8	20.6±0.4	20.9±0.5
Bakır, mg/ml	182,4±10.7	214±29.9	251.1±17.12*	295.4±18
Çinko, mg/ml	207.2±25.1	209.7±20.8	207.2±12.4	220.5±27.1

* $P<0.01$ Erkek kontrolden anlamlı farklı. Değerler ortalama±s.h.olarak ifade edilmiştir. (n=9-22).

V.3. *In vitro* Damar Cevaplılığın İncelenmesi

V.3.A. Dişi ve Erkek Sıçanların Aorta Halkalarında Fenilefrinin Vazokonstriktör Etkisi ve Uzun Süreli Resveratrol Uygulanmasının Etkisi

Kontrol ve resveratrol içen dişi ve erkek sıçanlarda, fenilefrin (10^{-9} - 10^{-4} M) doz-cevap eğrisi üzerinde %80-90 aralığında kasılma oluşturan konsantrasyonları saptanmıştır. Dişi sıçanların aortasında 3×10^{-6} M, erkek sıçanların aortasında ise 2×10^{-6} M fenilefrinin, % 83-89 ve % 86-90 aralığında kontraksiyon oluşturduğu belirlenmiştir. Uzun süreli resveratrol içen sıçanlarda fenilefrinin aynı dozlarının bu yüzde aralığında kasılma oluşturduğu saptanmıştır.

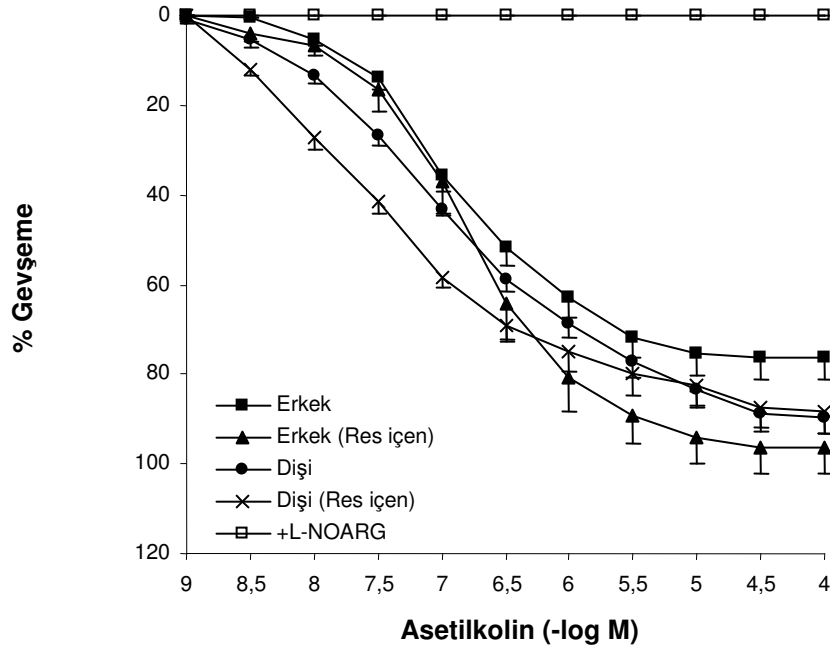
V.3.B. Dişi ve Erkek Sıçanların Aorta Halkalarında Asetilkolinin Endotel-bağımlı Gevşeme Cevapları ve Uzun Süreli Resveratrol Uygulanmasının Etkisi

Kontrol ve resveratrol içen dişi ve erkek sıçanların aortalarında, asetilkolin (10^{-9} - 10^{-4} M) doz bağımlı ve endotel aracılıklı gevşemeler oluşturmıştır (Şekil 4). Asetilkolinin oluşturduğu maksimum gevşeme cevabı, dişi sıçan aortasında erkek sıçan aortasına göre daha yüksek bulunmuştur (E_{maks} : % 90 (dişi), % 76 (erkek), $n=12$, $p<0.05$). Fakat EC_{50} değerleri arasında bir farklılık gözlenmemiştir. (EC_{50} : 6.73 ± 0.07 (erkek), 6.83 ± 0.07 (dişi), $n=12$, $p>0.05$).

Dişi ve erkek sıçanların endoteli kazınmış aortalarında asetilkolin, hiç gevşeme cevabı oluşturmamıştır. Parelel olarak, L-NOARG (10^{-4} M) uygulamasıyla hem erkek hem de dişi sıçan aortasında asetilkolinin oluşturduğu gevşemeler tamamen ortadan kalkmıştır (Şekil 4).

Uzun süre resveratrol uygulanan erkek sıçan aortasında, asetilkolinin oluşturduğu maksimum gevşeme cevabı kontrole göre artmış fakat, EC_{50} değeri değişmemiştir. (E_{maks} : % 96 (resveratrol), % 76 (kontrol), $n=12$, $p<0.05$; EC_{50} : 6.62 ± 0.07 (resveratrol), 6.73 ± 0.07 (kontrol), $n=12$, $p>0.05$). Dişi sıçan aortasında ise, uzun süre resveratrol uygulaması, asetilkolin EC_{50} değerini arttırmış fakat, maksimum cevabını etkilememiştir (EC_{50} : 7.35 ± 0.08 (resveratrol), 6.83 ± 0.06 (kontrol), $n=12$, $p<0.05$; E_{maks} : % 89 (resveratrol), % 88 (kontrol), $n=12$, $p>0.05$, Şekil 4, Tablo 4).

Resveratrol için erkek ve dişi sıçanların aortalarında da asetilkolinin oluşturduğu gevşeme cevapları L-NOARG (10^{-4} M) uygulamasıyla tamamen ortadan kalkmıştır. Bu bulgular, asetilkolinin endotel-bağımlı gevşetici etkisinde resveratrolün oluşturduğu artışın nitrik oksit aracılığı ile gerçekleşmiş olabileceğini göstermektedir.



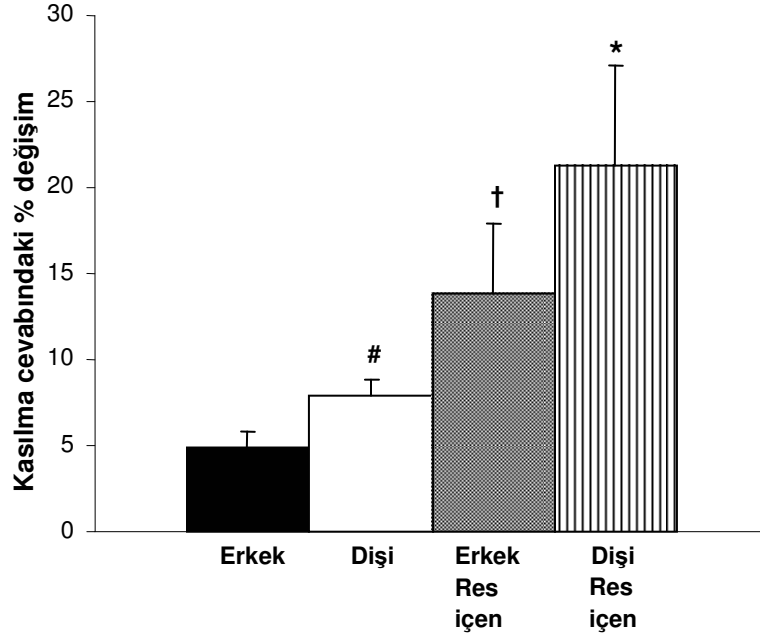
Şekil 4. Erkek ve dişi sıçanların endotelli aortalarında, asetilkolinin oluşturduğu gevşeme cevapları üzerine uzun süre resveratrol uygulamasının (Res içen) etkisi. Asetilkolinin oluşturduğu gevşemelerin, 100 μ M L-NOARG preinkubasyonu [erkek, erkek (res içen), dişi, dişi (res içen)] ile inhibisyonu. Değerler ortalama $\pm$ sh olarak ifade edilmiştir, n=10.

Tablo 4. Uzun süreli resveratrol içen (Res) ve içmeyen (Kon) dişi ve erkek sıçanların endotelli aortalarında asetilkolinin EC₅₀ (- log M) ve maksimum gevşeme (E_{maks}) değerleri.

		EC ₅₀	Emaks	n
ERKEK				
Asetilkolin	Kon	6.73±0.07	76.26±4.71	10
	Res	6.62±0.07	96.46±5.6*	10
DİŞİ				
Asetilkolin	Kon	6.83±0.06	89.86±3.3#	10
	Res	7.35±0.08*	88.52±4.8	10

Değerler ortalama±s.h. olarak ifade edilmiştir, [#]P<0.05, erkek kontrolden anlamlı farklı, ^{*}P<0.05 kontrolden anlamlı olarak farklı, n=10.

Bazal nitrik oksit üretim kapasitesini belirlemek için erkek ve dişi sıçan aorta halkaları 20 dakika boyunca L-NOARG (10⁻⁴M) ile inkübe edilmiş ve bu süre sonucunda bazal tonüste meydana gelen değişiklikler ölçülmüştür. Dişi sıçan aortasında L-NOARG uygulaması, bazal tonüste erkek sıçan aortasına göre daha fazla artış oluşturmuştur. Resveratrol uygulaması, hem erkek hem de dişi sıçanlarda bazal tonüsü anlamlı ölçüde artmıştır (Şekil 5).



Şekil 5. İzole organ banyosunda 20 dakikalık L-NOARG (100 μ M) inkübasyonun, uzun süre resveratrol içen (Res içen) ve içmeyen erkek ve dişi sıçanların aortalarında oluşturduğu kasılma cevabı. Sonuçlar ortalama $\pm$ sh olarak ifade edilmiştir ^{#, †} $P<0.05$, erkek kontrolden anlamlı olarak farklı, $*P<0.05$ dişi kontrolden anlamlı olarak farklı, n=10-12.

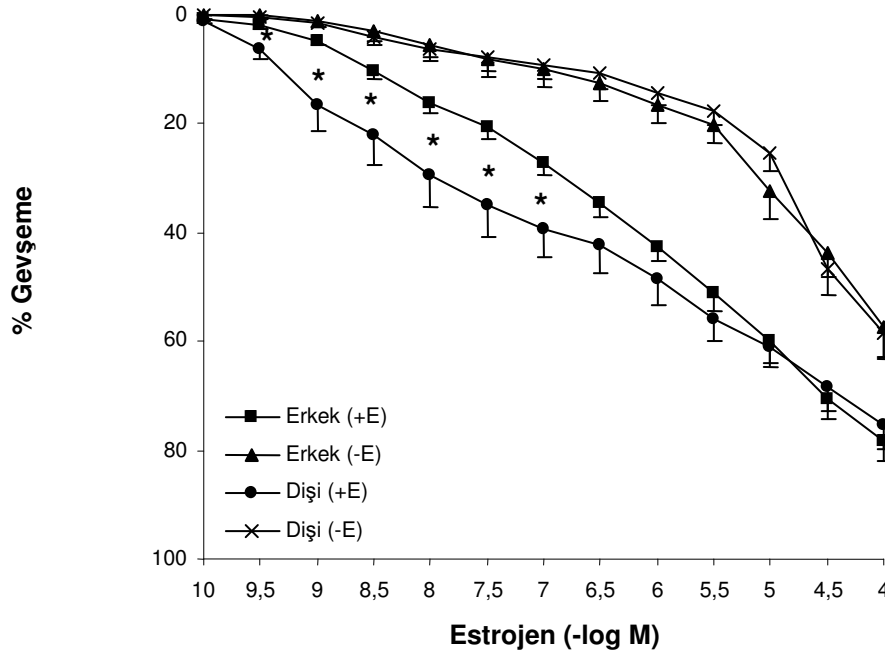
V.3.C. Erkek ve Dişi Sıçanların Aortalarında Estrojenin Endotel Bağımlı ve Bağımsız Gevşeme Cevapları ve Uzun Süreli Resveratrol Uygulanmasının Etkisi

Fenilefrin ile prekontrakte edilmiş erkek ve dişi sıçan aortalarında, 17β -estradiol (10^{-10} - 10^{-4} M), 5 dakika içerisinde ortaya çıkan endotel bağımlı ve endotel bağımsız gevşeme cevapları oluşturmuştur. Estrojen hem erkek hem dişi sıçan aortasında fizyolojik konsantrasyonlardan (1nM) itibaren endotel bağımlı gevşemeler oluşturmuştur (Şekil 6). Endotelli dokularda estrojenin oluşturduğu maksimum gevşeme cevabının dişi ve erkek sıçan aortasında benzer olduğu gözlenmiştir (E_{maks} : % 78 (erkek), % 75 (dişi), $n=8-12$, $p>0.05$). Bununla birlikte, dişi sıçanların endotelli aortasında estrojenin EC_{50} değeri, erkek sıçan aortasından daha yüksek bulunmuştur (EC_{50} : 6.31 ± 0.11 (erkek); 7.22 ± 0.21 (dişi), $n=8-12$, $p<0.05$). Estrojene cevaplılıkta izlenen dişi ve erkek sıçan aortalarının EC_{50} değerindeki farklılık, endotel kazınmasından sonra ortadan kalkmıştır (EC_{50} ve E_{maks} değerleri: 5.32 ± 0.11 (erkek), 5.18 ± 0.13 (dişi); % 57 (erkek), % 58 (dişi), $n=7-8$, $p>0.05$).

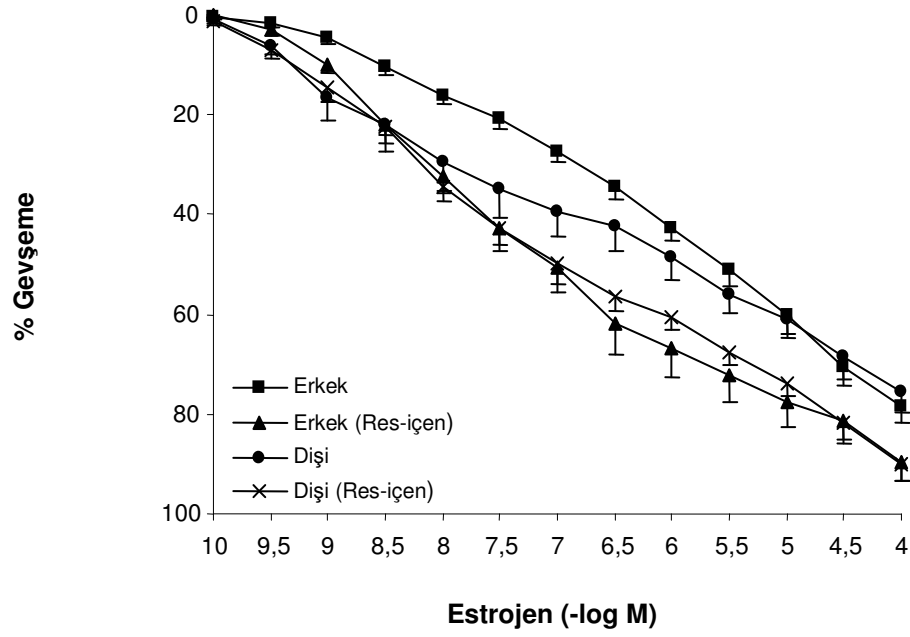
Resveratrol uygulaması, erkek sıçan endotelli aortasında estrojenin oluşturduğu maksimum cevabı ve EC_{50} değerini anlamlı ölçüde arttırmıştır (E_{maks} : % 90 (erkek-res), % 78 (erkek), $n=12$, $p<0.05$; EC_{50} : 7.22 ± 0.07 (erkek-res), 6.31 ± 0.11 (erkek), $n=12$, $p<0.05$). Dişi sıçan aortasında ise, resveratrol uygulaması estrojenin EC_{50} değerini değiştirmezken maksimum gevşeme cevabını anlamlı olarak artmıştır (E_{maks} : % 90 (dişi-res), %75.42 (dişi) $n=12$, $p<0.05$; EC_{50} : 7.24 ± 0.08 (dişi-res),

7.22±0.21 (dişi) n=12, p>0.05, Şekil 7). Resveratrol uygulaması, estrogenin gevşetici etkisindeki cinsiyet farkını ortadan kaldırmış ayrıca, hem erkek hem dişi endotelli aortalarında estrogenin maksimum gevşeme cevabını artırmıştır.

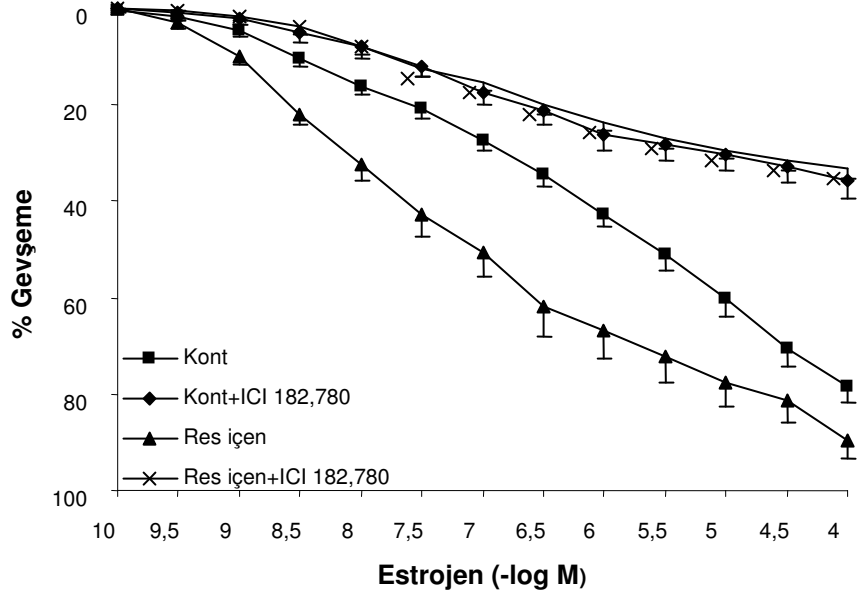
Estrojen reseptör antagonisti ICI 182,780 (10^{-6} M, 20' preinkübasyon) uygulaması, estrogenin oluşturduğu gevşemeleri büyük ölçüde ortadan kaldırmıştır. (Tablo 5).



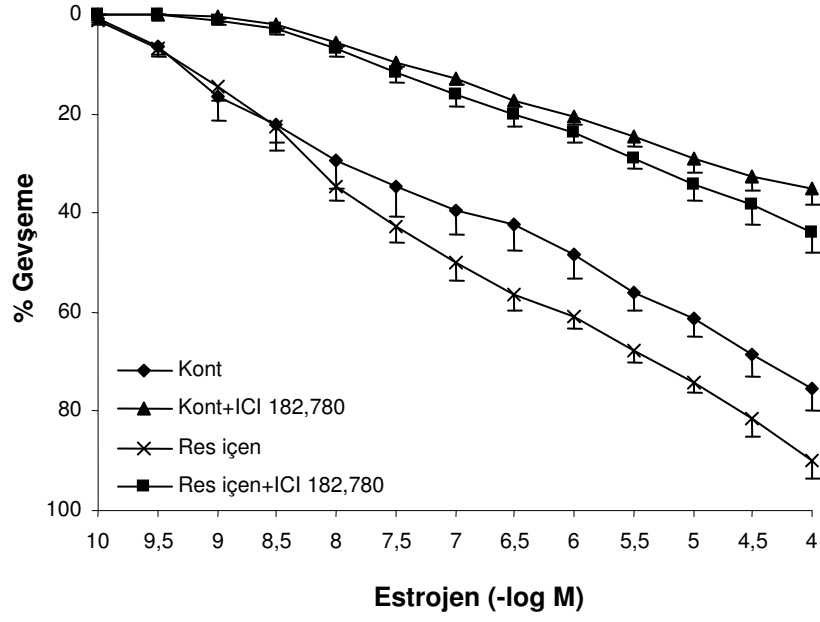
Şekil 6. Erkek ve dişi sıçan endotelli (+E) ve endotelsiz (-E) aortalarında estrogen doz-cevap eğrileri. Değerler ortalama±sh olarak ifade edilmiştir, *P<0.05, erkek (+E) dişi (+E)'den anlamlı olarak farklı. n=8-12.



Şekil 7. Uzun süre resveratrol içen (Res-içen) ve içmeyen erkek ve dişi sıçan endotelli aortalarında estrojen doz-cevap eğrileri üzerine etkisi. Değerler $\text{ortalama} \pm \text{sh}$ olarak ifade edilmiştir. $n=6-12$.



Şekil 8 . Estrojen reseptör antagonisti ICI 182,780'nin, uzun süre resveratrol içen (Res-içen) ve içmeyen (Kont) erkek sıçan endotelli aortalarında estrojenin oluşturduğu gevşeme cevapları üzerine etkisi. Değerler ortalama±sh olarak ifade edilmiştir, n= 8-12.



Şekil 9. Estrojen reseptör antagonisti ICI 182,780'nin, uzun süre resveratrol içen (Res-içen) ve içmeyen (Kont) erkek sıçan endotelli aortalarında estrojenin oluşturduğu gevşeme cevapları üzerine etkisi. Değerler ortalama $\pm$ sh olarak ifade edilmiştir, n= 6-8.

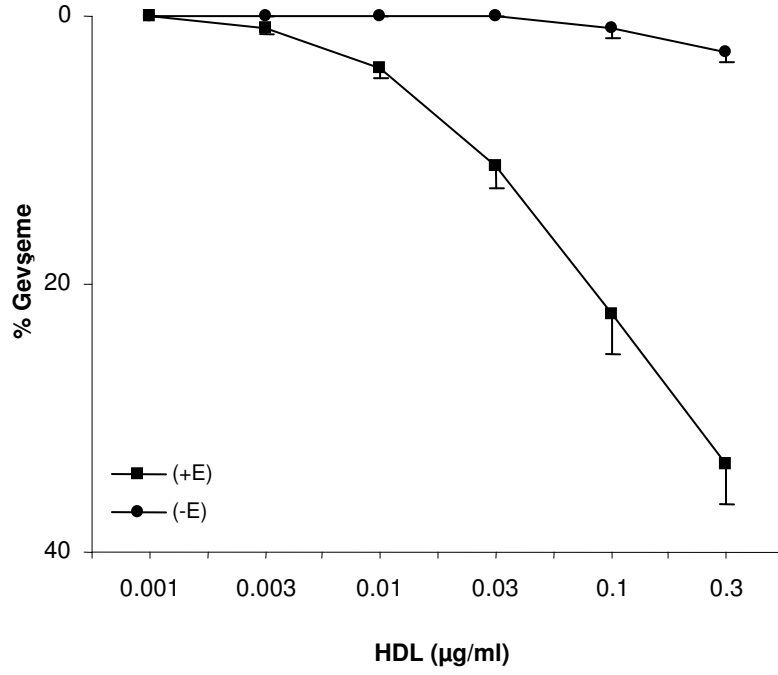
Tablo 5. Uzun süre resveratrol içen (Res-içen) ve içmeyen (Kontrol) erkek ve dişi sıçan aortalarında estrogenin EC_{50} (- log M) ve maksimum gevşeme (E_{maks}) değerleri ve ICI 182,780 preinkubasyonunun bu değerlere etkisi.

		EC_{50}	E_{maks}	n
ERKEK				
Estrojen	Kontrol (+E)	6.31±0.11	78.40±3.46	12
	Kontrol (-E)	5.32±0.11*	57.18±5.66*	7
	Res-içen	7.22±0.07*	89.74±3.75*	8
	Kontrol+ICI 182,780		35.83±3.5*	8
	Res+ICI 182,780		33.30±1.91#	6
Dişi				
Estrojen	Kontrol (+E)	7.22±0.21*	75.42±4.44	8
	Kontrol (-E)	5.18±0.13♦	58.45±4.74♦	8
	Res-içen	7.24±0.08	89.96±3.45♦	7
	Kontrol+ICI 182,780		35.54±2.93♦	6
	Res+ICI 182,780		43.95±4.11†	6

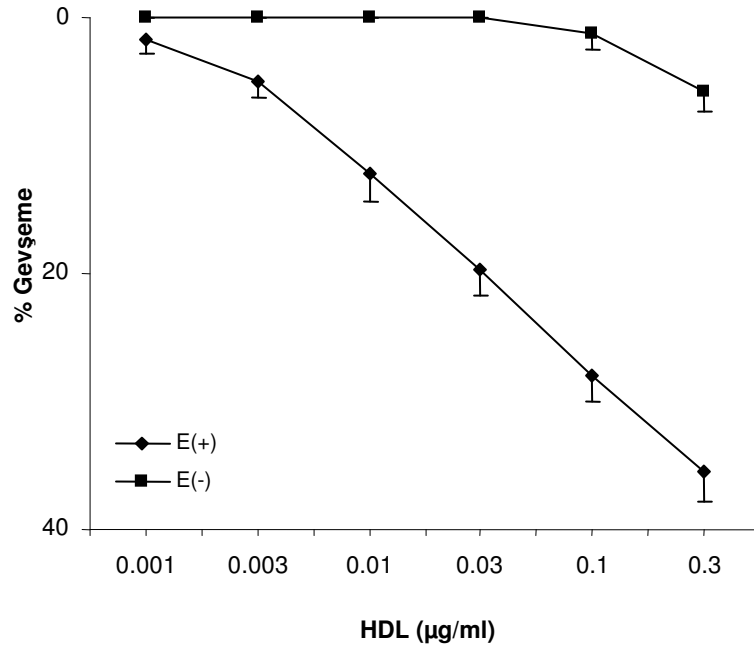
Değerler ortalama±s.h. olarak ifade edilmiştir, * $P<0.05$, erkek endotelli kontrolden anlamlı farklı, # $P<0.01$ resveratrol içen erkek gruptan anlamlı farklı, ♦ $P<0.05$ dişi endotelli kontrolden anlamlı olarak farklı, † $P<0.05$ resveratrol içen dişi gruptan anlamlı farklı n=6-12.

V.3.D. Erkek ve Dişi Sıçan Aortalarında HDL'nin Endotel Bağımlı Gevşeme Cevapları ve Uzun Süreli Resveratrol Uygulamasının Etkisi

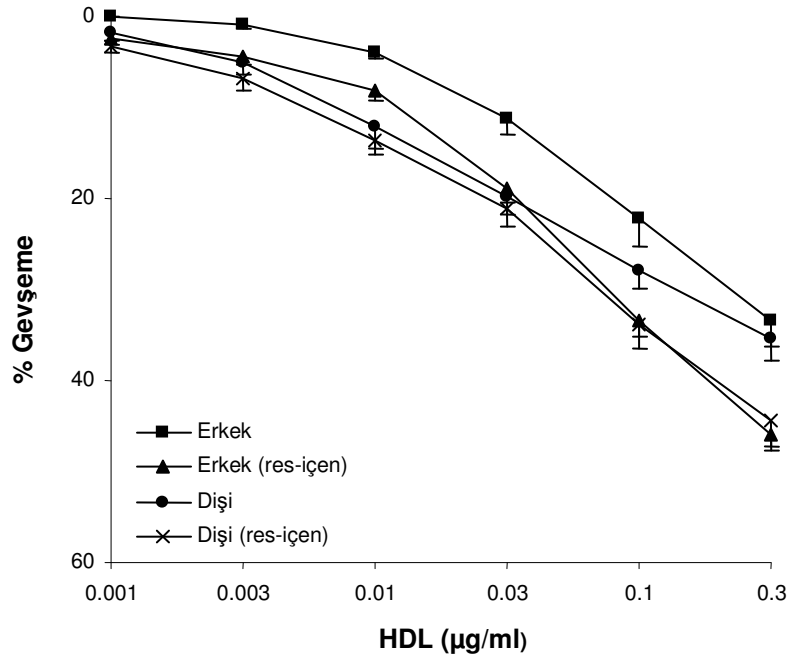
Fenilefrin ile prekontrakte edilmiş erkek ve dişi sıçan endotelli aortalarında HDL (0.001-0.3 µg/ml) konsantrasyon bağımlı gevşemeler oluşturmuştur (Şekil 10,11). Endotel kazınmasından sonra, hem erkek hem dişi sıçan aortalarında HDL'nin oluşturduğu gevşemeler ortadan kalkmıştır (Şekil 10,11). Bu bulgu, HDL'nin dişi ve erkek aortalarında oluşturduğu gevşemelerin tümüyle endotel bağımlı olduğunu göstermektedir. Erkek ve dişi sıçan aortasında, HDL'nin oluşturduğu gevşemeler maksimum cevabın büyüklüğü açısından benzerlik göstermektedir [E_{max} : %33 (erkek), %35 (dişi)]. HDL'nin EC_{50} değeri, dişi sıçan aortasında erkek sıçan aortasından daha yüksek olarak bulunmuştur (EC_{50} değerleri: 0.052 ± 0.0 µg/ml (erkek), 0.026 ± 0.0 µg/ml dişi $n=6-8$, $p<0.05$). Resveratrol tedavisi erkek ve dişi sıçan aortasında HDL'nin oluşturduğu endotel-bağımlı gevşeme cevabının büyüklüğünü anlamlı olarak arttırmıştır (E_{maks} değerleri: 46% (erkek) $n=6$, $p<0.05$; 44% (dişi), $n=6$, $p<0.05$). Ayrıca, resveratrol tedavisi erkek sıçanda HDL'nin EC_{50} değerini anlamlı ölçüde azaltmıştır (EC_{50} değerleri: 0.031 ± 0.0 µg/ml (erkek), $n=6$, $p<0.05$; 0.30 ± 0.0 µg/ml (dişi), $n=6$, $p>0.05$) (Şekil 12, Tablo 6).



Şekil 10. Erkek sıçan endotelli ve endotelsiz aortalarında HDL'nin oluşturduğu gevşeme cevapları. Değerler ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir.* $P<0.05$, $n=6-8$.



Şekil 11. Dişî sıçan endotelli ve endotelsiz aortalarında HDL'nin oluşturduğu gevşeme cevapları. Değerler ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir.*P<0.01, n=6.



Şekil 12. Uzun süre resveratrol içen (res-içen) ve içmeyen erkek ve dişi sıçanların **endotelli** aortalarında HDL doz-cevap eğrileri. Değerler ortalama $\pm$ sh olarak ifade edilmiştir.n=6-8.

Tablo 6. Uzun süre resveratrol içen (res-içen) ve içmeyen (Kontrol) erkek ve dişi sıçan endotelli aortalarında HDL'nin EC₅₀ (µg/ml) ve maksimum gevşeme (E_{maks}) değerleri.

		EC ₅₀	Emaks	n
ERKEK				
HDL	Kontrol	0.052±0.0	33.44±2.66	6
	Res içen	0.031±0.0*	45.89±1.79*	6
DIŞI				
HDL	Kontrol	0.026±0.0 [#]	35.42±2.41	8
	Res içen	0.030±0.0	44.41±2.74*	6

Değerler ortalama±s.h. olarak ifade edilmiştir, [#]P<0.05, erkek kontrolden anlamlı farklı, *P<0.05 kontrolden anlamlı olarak farklı, n=6-8.

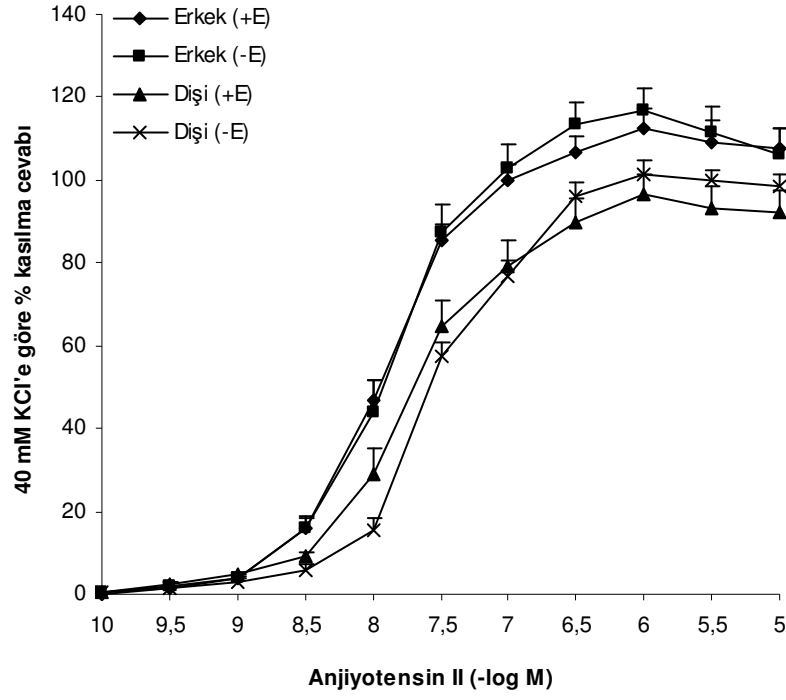
V.3.E. Erkek ve Dişi Sıçan Aortalarında Anjiyotensin II'nin

Vazokonstriktör ve Uzun Süreli Resveratrol Tedavisinin Etkisi

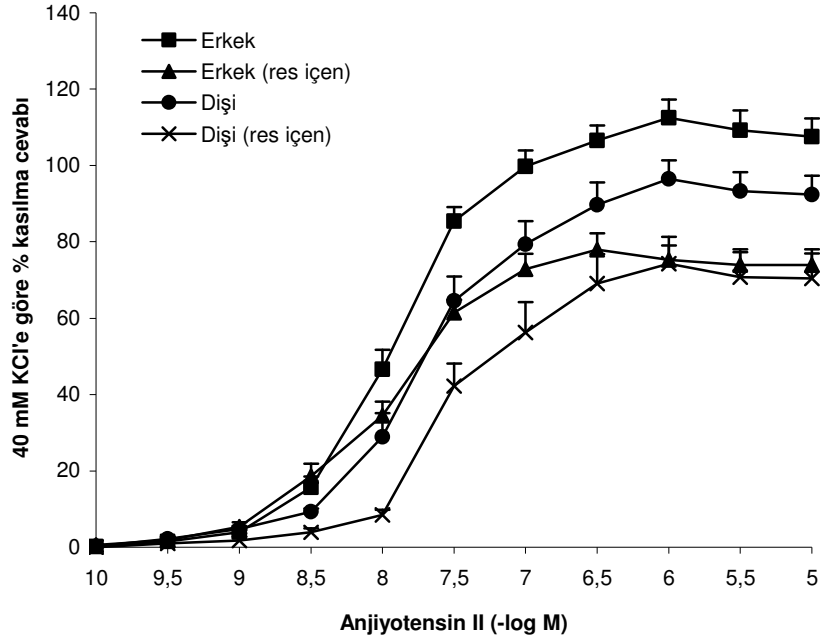
Erkek ve dişi sıçan aortalarında anjiyotensin II (10⁻¹⁰-10⁻⁵ M) doz-bağımlı kasılma cevapları oluşturmaktadır (Şekil 13,14). Endoteli sağlam aortalarda anjiyotensin II 'nin doz-cevap eğrileri karşılaştırıldığında, erkek hayvanlarda E_{maks} ve EC₅₀ değerleri dişi hayvanlara göre daha yüksek bulunmuştur (E_{maks}: %112.51±4.72 (erkek), %96.51±4.81 (dişi); EC₅₀: 7.95±0.08 (erkek), 7.73±0.05 (dişi), n=9-13, Tablo 7). Resveratrol içen erkek ve dişi hayvanlarda, anjiyotensin II ye cevaplılıktaki potens farklılığın devam ettiği (EC₅₀ : 7.80±0.01 (erkek), 7.53±0.08 (dişi), n=9-13, p<0.05)

fakat, Emaks değerlerindeki farklılığın ortadan kalktığı görülmektedir ($\%77.9 \pm 4.35$ (erkek), $\%74.24 \pm 7.07$ (dişi), $n=9-13$, $p>0.05$, Tablo 7).

Erkek ve dişi sıçan endotelsiz aortaları karşılaştırıldığında, dişi sıçanların anjiyotensin II ye duyarlılığının, erkek sıçanlara göre anlamlı olarak daha düşük olduğu grlmştr (EC_{50} : 7.81 ± 0.07 (erkek), 7.49 ± 0.05 (dişi), $n=10-13$, $p<0.05$, Tablo 7). Maksimum cevabın büyüklüğü de erkek sıçan endotelsiz aortasında, dişi sıçan aortasına göre daha yüksek bulunmuştur (E_{maks} : $\%116.95 \pm 5.23$ (erkek), $\%101.5 \pm 3.06$ (dişi), $n=10-13$, $p<0.05$, Tablo 7).



Şekil 13. Erkek ve dişi sıçan endotelli (+E) ve endotelsiz (-E) aortalarında anjiyotensin II doz-cevap eğrileri. Değerler ortalama $\pm$ sh olarak ifade edilmiştir, n=8-12.



Şekil 14. Uzun süre resveratrol içen (res-içen) ve içmeyen erkek ve dişi sıçan endotelli aortasında anjiyotensin II'nin oluşturduğu kasılma cevapları. Değerler ortalama $\pm$ sh olarak ifade edilmiştir, n=9-13.

Tablo 7 . Uzun süre resveratrol içen (Res) ve içmeyen (Kontrol) erkek ve dişi sıçanların endotelli (+ E) aortalarında angiotensin II' nin EC₅₀ (-log M) ve E_{maks} değerleri.

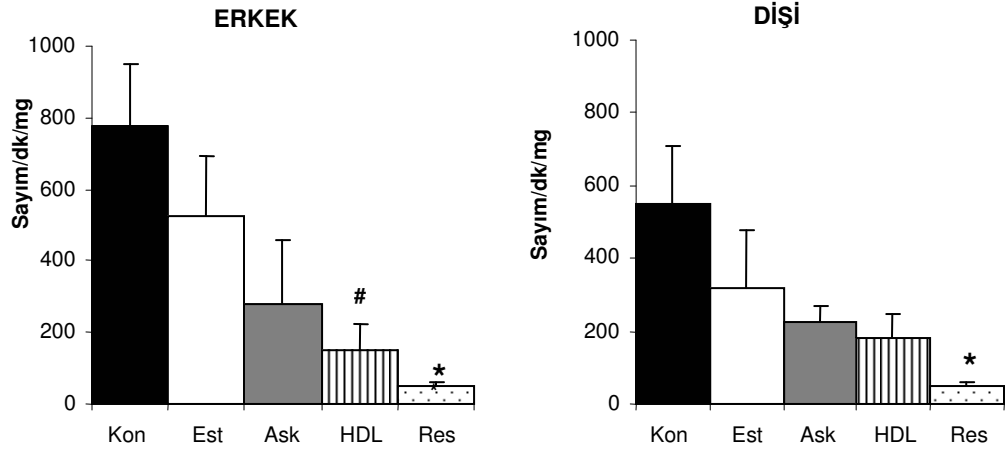
		EC ₅₀	Emaks	n
ERKEK				
Anjiyotensin II	Kontrol (+E)	7.95±0.08	112.50±4.72	10
	Kontrol (-E)	7.81±0.07	116.95±5.23	10
	Res (+E)	7.80±0.01*	77.90±4.35*	13
Dişi				
Anjiyotensin II	Kontrol (+E)	7.73±0.05*	96.51±4.81*	10
	Kontrol (-E)	7.49±0.05#	101.50±3.06#	13
	Res (+E)	7.53±0.08 [†] ♦	74.24±7.07 [†]	9

Değerler ortalama±sh olarak ifade edilmiştir. * $P<0.05$, erkek endotelli kontrolden anlamlı olarak farklı, # $P<0.05$ erkek endotelsiz kontrolden anlamlı olarak farklı, [†] $P<0.05$ dişi endotelli kontrolden anlamlı olarak farklı, ♦ $P<0.05$, res içen erkek endotelli grubundan anlamlı olarak farklı n=9-13.

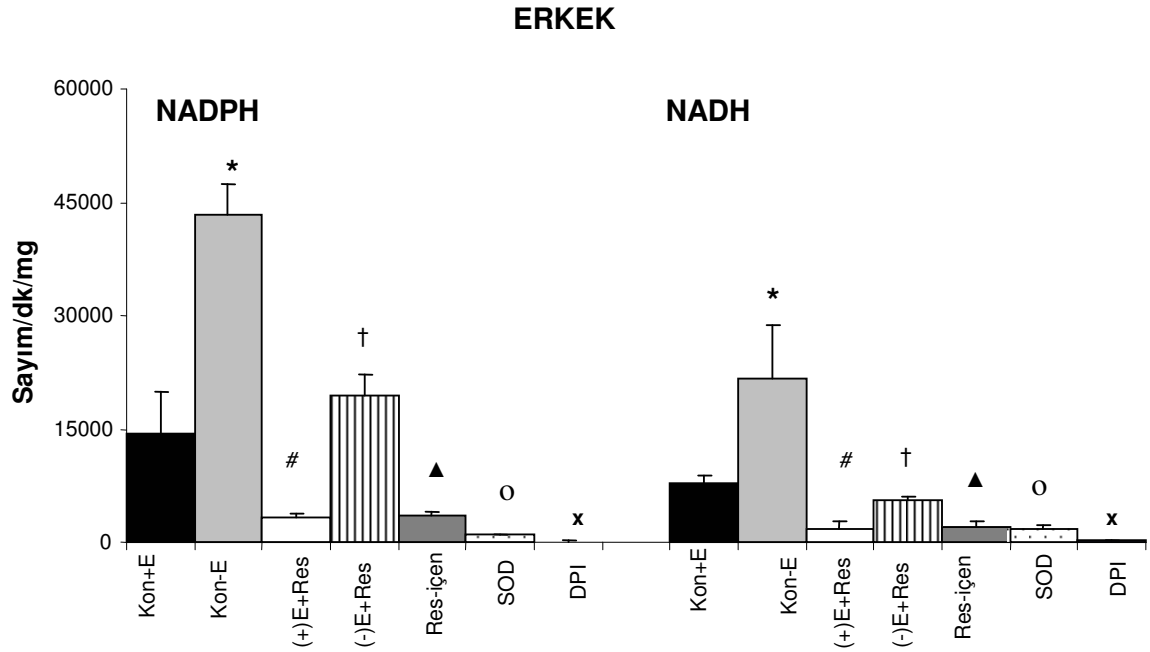
V.4. Erkek ve Dişi Sıçan Aortalarında Süperoksit Düzeyleri ve Akut ve Uzun Süreli Resveratrol Uygulanmasının Etkisi

Erkek ve dişi sıçanların aortalarında süperoksit oluşumu, estrogen (10^{-6} M) veya asetilkolin (10^{-6} M) uygulaması ile çok az, fakat, HDL (0.01 µg/ml) veya akut resveratrol (10^{-6} M) uygulaması anlamlı derecede azalmıştır (Şekil 15). Süperoksit düzeyleri resveratrol tedavisi alan sıçanların aortalarında oldukça düşük olduğu için bu

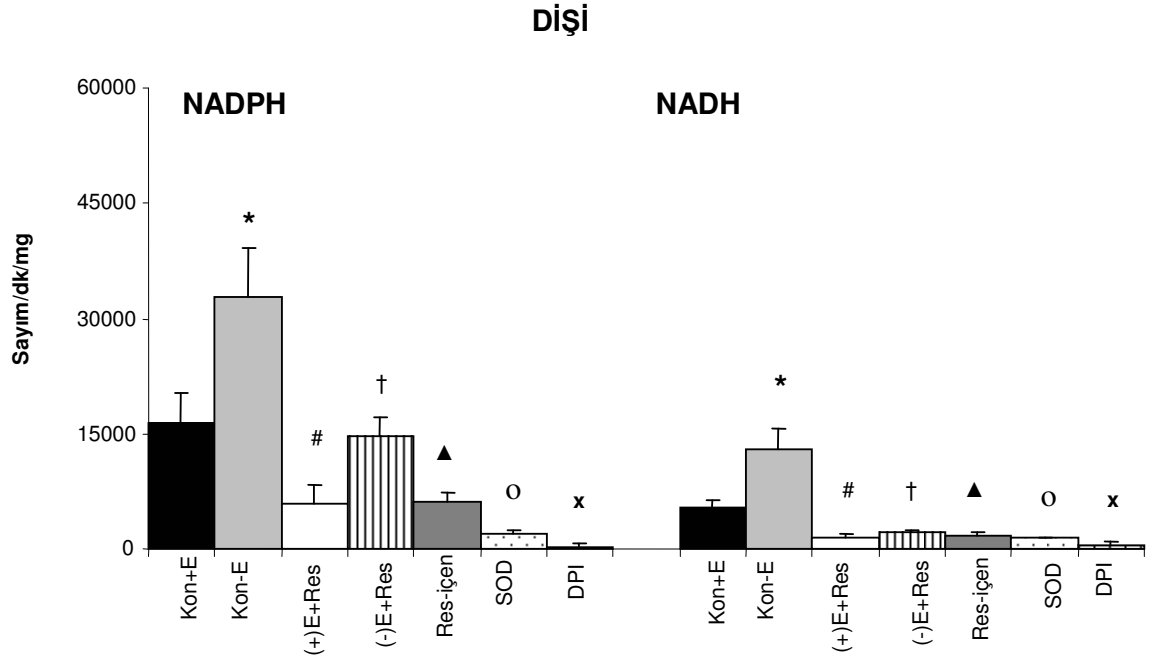
ajanların etkisi bu grupta incelenememiştir. Erkek ve dişi kontrol hayvanların endotelli aortasında, NADPH veya NADH (100 μ M), süperoksit oluşumunu cinsiyet farkı oluşturmaksızın eşit ölçüde uyarmıştır. Bununla birlikte, NADPH ile süperoksit oluşumu, NADH'a göre hem erkek hem dişi sıçan aortasında daha yüksek bulunmuştur. Erkek ve dişi endotelsiz aortasında NADPH veya NADH ile süperoksit oluşumu, endotelli aortaya göre daha yüksek bulunmuştur (Şekil 16, 17). Resveratrol tedavisi gören hayvanların aortasında NADPH veya NADH ile stimülasyon kontrol hayvanlara göre daha az oranda gerçekleşmiştir. Resveratrol içen hayvanlarda da NADPH ve NADH ile stimülasyonda cinsiyet farkı gözlemlenmemiştir. 10^{-6} M resveratrolün akut uygulanması, erkek ve dişi sıçan aortasında NADPH ve NADH stimülasyonu ile oluşan süperoksit oluşumunu anlamlı ölçüde azaltmıştır (Şekil 16, 17). Erkek ve dişi sıçan endotelli aortasında NADPH ve NADH ile stimüle olan süperoksit oluşumu, DPI (10 μ M) ve SOD (200 U/ml) uygulaması ile nerdeyse tamamen ortadan kalkmıştır (Şekil 16, 17).



Şekil 15. Erkek ve dişi sıçan endotelli aortasında süperoksit ölçümü. Erkek ve dişi sıçan aortasında estrogen (Est, 10^{-6} M), asetilkolin (Ask, 10^{-6} M), HDL (0.01 μ g/ml) ve resveratrol (Res, 10^{-6} M) uygulamasının süperoksit oluşumuna etkisi. n=8-12, *,[#] $P<0.05$ kontrole göre farklı.

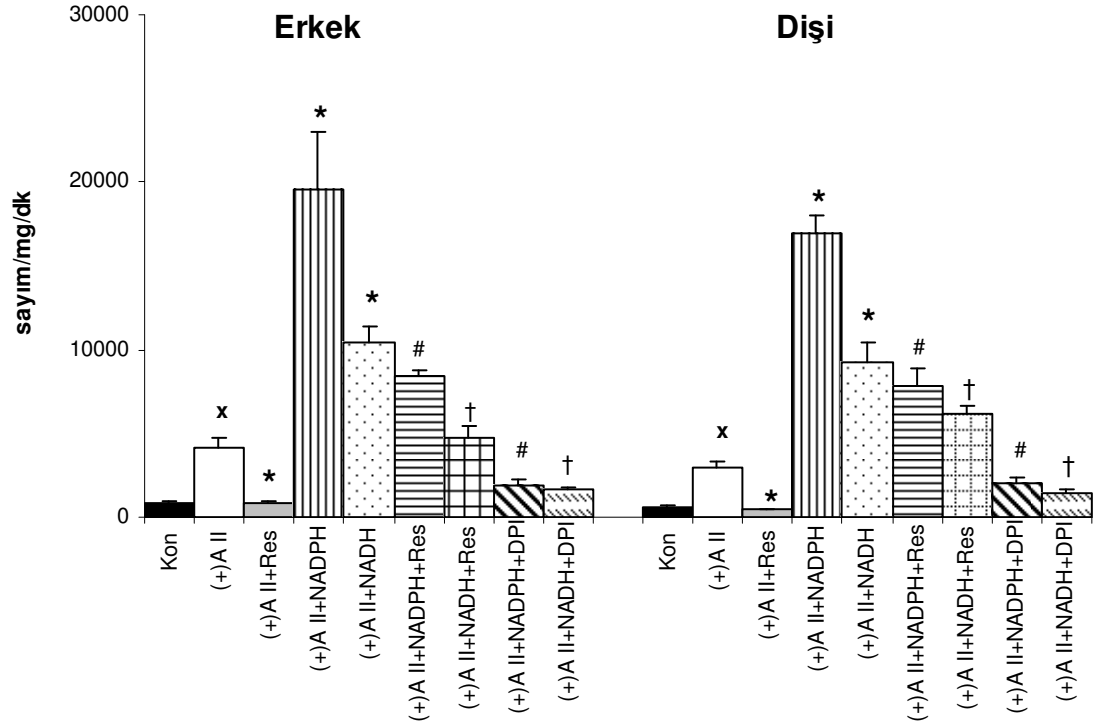


Şekil 16. Erkek sıçan endotelli (Kon+E) ve endotelsiz (Kon-E) aortalarında NADPH ve NADH ile süperoksit oluşumunun stimülasyonu. Resveratrolün akut uygulanması (1µM;Res) endotelli (+E+Res) ve endotelsiz (-E+Res) aortalarda NADPH ve NADH(100 µM) ile stimüle olan süperoksit oluşumunu belirgin derecede azaltmıştır. Uzun süre resveratrol içimi (res-içen), NAD(P)H ile stimüle olan süperoksit oluşumunu belirgin bir şekilde azaltmıştır. Akut SOD(200 U/mL) veya DPI (10^{-5} M) uygulanması neredeyse tamamen NAD(P)H stimülasyonunun etkisini ortadan kaldırmıştır. n=6-12, *, #, ▲, o, x, $P<0.05$ Kon+E'den anlamlı farklı, † $P<0.05$ Kon-E'den anlamlı farklı.



Şekil 17. Dişi sıçan endotelli (Kon+E) ve endotelsiz (Kon-E) aortalarında NADPH ve NADH ile süperoksit oluşumunun stimülasyonu. Resveratrolün akut uygulanması (1µM;Res) endotelli (+E+Res) ve endotelsiz (-E+Res) aortalarda NADPH ve NADH(100 µM) ile stimüle olan süperoksit oluşumunu belirgin derecede azaltmıştır.Uzun süre resveratrol içimi (res-içen), NAD(P)H ile stimüle olan süperoksit oluşumunu azaltmıştır. Akut SOD(200 U/mL) veya DPI (10^{-5} M) uygulanması neredeyse tamamen NAD(P)H stimülasyonunun etkisini ortadan kaldırmıştır. n=6-12, *, #, ▲, O, x, $P<0.05$ Kon+E'den anlamlı farklı, † $P<0.05$ Kon-E'den anlamlı farklı.

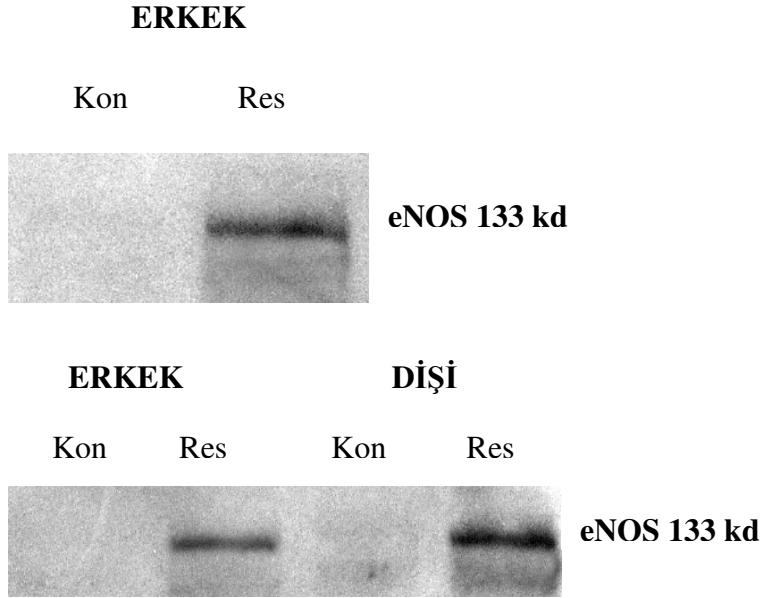
Diğer bir grup deneyde, anjiyotensin II nin süperoksit oluşumu üzerine etkisi incelenmiştir. Anjiyotensin II (10^{-7} M), hem erkek hem de dişi sıçanların endotelli aortalarında süperoksit oluşumunu önemli ölçüde arttırmıştır (Şekil 18). Anjiyotensin II' nin bu etkisinde cinsiyet farklılığı izlenmemiştir. Anjiyotensin II (10^{-7} M) nin, NAD(P)H (100 μ M) ile birlikte uygulanması, süperoksit oluşumunu tek başına NAD(P)H uygulamasından daha fazla artırmamıştır. Ayrıca, bu etkide herhangi bir cinsiyet farklılığı izlenmemiştir. Anjiyotensin II' nin, süperoksit oluşumunda yarattığı artış, akut resveratrol (10^{-6} M) uygulaması ile belirgin ölçüde azalmıştır. Anjiyotensin II-NAD(P)H kombinasyonun oluşturduğu süperoksit artışı, DPI (10 μ M) ile hemen hemen ortadan kalkmaktadır (Şekil 18). Bu etkilerde de herhangi bir cinsiyet farklılığı izlenmemiştir.



Şekil 18. Erkek ve Dişi sıçan endotelli aortalarında anjiyotensin II (AII) varlığında süperoksit oluşumunun stimülasyonu. Resveratrolün akut uygulanması (1µM;Res) endotelli (+Res) aortalarda, anjiyotensin II (10^{-7} M) nin tek başına yada onun NAD(P)H (100 µM) ile kombinasyonunun neden olduğu süperoksit artışını belirgin derecede azaltmıştır DPI (10^{-5} M) uygulanması neredeyse tamamen NAD(P)H stimülasyonunun etkisini ortadan kaldırmıştır. n=6-12. x, $P<0.05$ Kon'den anlamlı farklı, *, $P<0.05$ AII'den anlamlı farklı, #, $P<0.05$ AII+NADPH'dan anlamlı farklı, † $P<0.05$ AII+NADH'dan anlamlı farklı.

V.5. Erkek ve Dişi Sıçanlara Uzun Süreli Resveratrol Uygulanmasının eNOS Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisinin Western Blotting Yöntemi ile Belirlenmesi

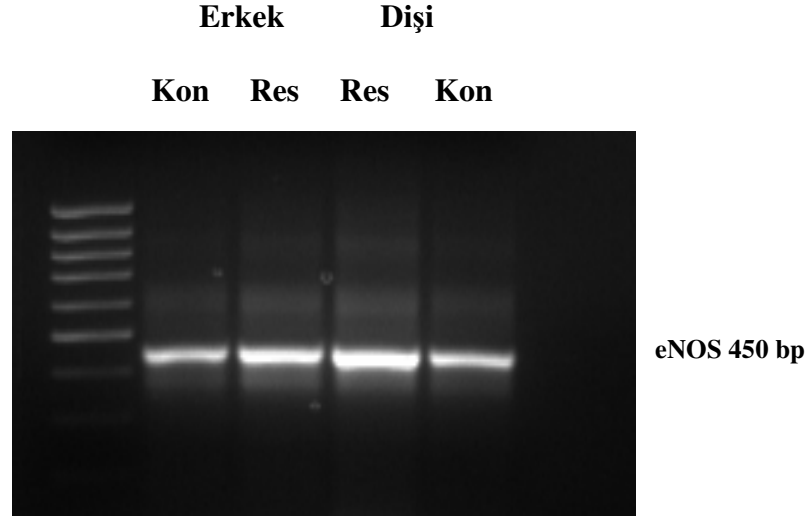
3 hafta boyunca 50 mg/l resveratrol uygulanan erkek ve dişi hayvanların aortalarında eNOS ekspresyonlarında artış olduğu görülmüştür.



Şekil 19. Kontrol ve uzun süreli resveratrol (Res) uygulanmış erkek ve dişi sıçan endoteli aortasında eNOS protein ekspresyonları. Resveratrol eNOS ekspresyonunu arttırmıştır. (n=2)

V.6. Erkek ve Dişi Sıçanlara Uzun Süreli Resveratrol Uygulanmasının eNOS mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisinin Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyon Analizi (RT-PCR) ile Belirlenmesi

Uzun süre resveratrol uygulanması erkek ve dişi sıçan aortasında eNOS mRNA düzeylerini anlamlı ölçüde arttırmıştır. eNOS mRNA ekspresyonu dişide ve erkekte farklı bulunmamıştır. Bantların dansitometrik analizi Bio-Profil Image analiz sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Vilber Lourmat, France).



Şekil 20. Kontrol ve uzun süreli resveratrol (Res) uygulanmış erkek ve dişi sıçan endotelli aortasında eNOS mRNA ekspresyonları. Resveratrol eNOS mRNA ekspresyonunu anlamlı şekilde arttırmıştır. (n=3)

Tablo 8. RT-PCR deneylerinin Dansitometrik Analizi

	eNOS
Erkek	511,2 ± 42,43
Erkek-res	719 ± 54,30*
Dişi	510,6 ± 39,75
Dişi-res	669,33 ± 46,20 [#]

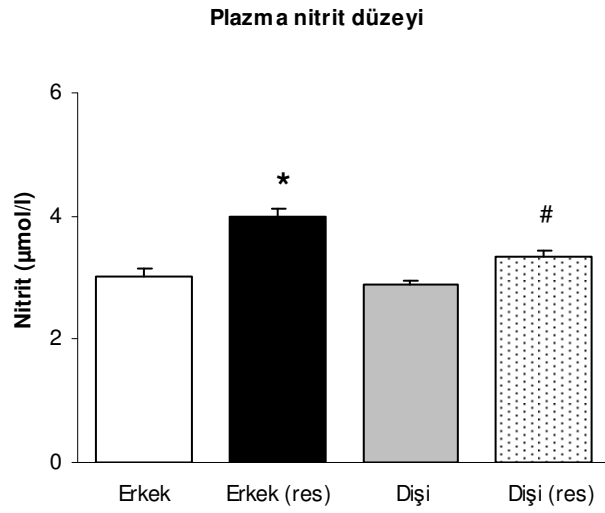
Şekil 21. Data 3 veya 4 ayrı deneyden elde edilen sonuçların ortalama optik dansitesini ifade etmektedir.* $P<0.05$ erkek kontrolden, # $P<0.05$ dişi kontrolden anlamlı olarak farklı bulunmuştur.

V.7. Erkek ve Dişi Sıçanlara Uzun Süreli Resveratrol Uygulanmasının

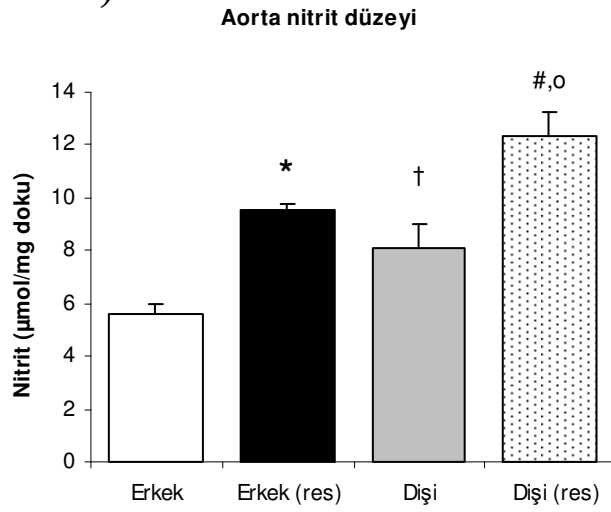
Plazma ve Aorta Nitrit Düzeyleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Erkek ve dişi sıçanlara uzun süreli resveratrol uygulanması plazma ($\mu\text{mol/l}$) ve aorta ($\mu\text{mol/mg}$) nitrit düzeyleri anlamlı olarak artmıştır Şekil (A ve B).

A)



B)



Şekil 22 . Uzun süreli resveratrol içiminin (res) erkek ve dişi sıçanların plazma (A) ve aortasında (B) nitrit düzeylerine etkisi. Sonuçlar ortalama $\pm$ sh olarak ifade edilmiştir (n=6-22). *Erkek kontrolden anlamlı olarak farklı $p<0.01$, #Dişi kontrolden anlamlı olarak farklı $p<0.01$, † Erkek kontrolden anlamlı olarak farklı $p<0.01$.

VI. TARTIŞMA

Bu çalışmanın ilk bölümünde, endotel bağımlı vazodilatör bileşiklerden asetilkolin, estrogen ve HDL'nin erkek ve dişi sıçanların torasik aortalarındaki etkileri karşılaştırılmıştır. Ayrıca, anjiyotensin II'nin vazokonstriktör etkisi de erkek ve dişi sıçan arterlerinde incelenmiştir. Uzun süre resveratrol içiminin (50 mg/L, 21 gün), bu vazoaaktif bileşiklere cevaplılıkta izlenen cinsiyet farklılığı üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu hayvanların aortalarında, eNOS ve iNOS proteini, eNOS mRNA ekspresyonu ile plazma ve aorta nitrit düzeyleri ölçülmüştür. Erkek ve dişi sıçan aortalarında bazal ve uyarılmış süperoksit oluşumu ve plazma estrogen düzeyi de ölçülmüştür. Uzun süre resveratrol içen dişi ve erkek sıçanlarda, endotel bağımlı vazodilatör cevapların arttığı, anjiyotensin II'nin vazokonstriktör etkisinin azaldığı, eNOS protein ve eNOS mRNA ekspresyonunun arttığı, plazma ve aorta nitrit düzeylerinin arttığı fakat, süperoksit oluşumunun azaldığı görülmüştür. Bununla birlikte, uzun süre resveratrol içen erkek ve dişi sıçanların kan lipid profillerinde bir değişiklik izlenmemiştir. İlginç olarak, hem erkek hem dişi sıçanlarda plazma estrogen düzeylerinde belirgin bir düşüş saptanmıştır. Bulgularımız, uzun süre resveratrolle beslenmenin, eNOS mRNA ve eNOS protein düzeylerini arttırarak ve süperoksit oluşumunu azaltarak, nitrik oksitin hem oluşumunu hem de biyoyararlanımını artırdığını göstermektedir.

3 hafta boyunca resveratrol içen dişi ve erkek sıçanların plazma ve karaciğer örnekleri incelendiğinde, resveratrolün plazma düzeyinin, HPLC-MS metoduyla ölçülebilen sınırların altında olduğu fakat, karaciğerde 40-50 ng/ml

düzeyinde bulunduğu görölmüştür. Karaciğer resveratrol düzeylerinin dişi ve erkekte farklılık göstermediğı görölmüştür. Sıçanlarda daha önce yapılan bir çalışmada, gastrik intübasyonla 2mg/kg dozunda verilen resveratrolün 5-10 dakika sonra plazmada doruk düzeyine ulaştığı ve plazmadan eliminasyon yarı ömrünün 12-15 dakika olduğu gösterilmiştir¹⁰⁵. Resveratrolün, 2 mg/kg¹⁰⁵ ve 50 mg/kg dozlarında sıçanlara¹³⁶, 20 mg/kg dozunda farelere⁷ intragastik olarak verilmesinden sonra, plazmada sırasıyla 0.5, 1.2, 6.6 µM doruk konsantrasyon değerlerine ulaştığı belirtilmiştir. Sıçan ve farelerde yapılan çalışmalarda, resveratrolün iyi bir şekilde absorbe edilebildiğı, karaciğer ve barsak epitel hücrelerinde hızla glukuronid ve sülfat konjugatlarına dönüştürüldüğü gösterilmiştir^{2,204,227,242}. Bertelli ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, sıçanlara intragastrik olarak 86µg/kg dozunda verilen resveratrolün plazmada 20.2 ng/ml, karaciğerde 20.7 ng/g, kalpte 2.2 ng/g ve böbrekte 20 ng/g konsantrasyonlarda bulunduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada, sıçanlara 15 gün boyunca 43 µg/kg dozunda resveratrol verildiğinde, plazmada 7.6 ng/ml, karaciğerde 53.5 ng/g, kalpte 3.1 ng/g ve böbrekte 44.1 ng/g konsantrasyonlarında resveratrol bulunduğu saptanmıştır²⁰. Vitrac ve ark., farelere [¹⁴C] işaretli *trans*-resveratrolün oral uygulanmasından 6 saat sonra plazmada oldukça düşük düzeyde bulunduğunu fakat, karaciğerde HPLC ile ölçülebilir miktarlarda bulunduğunu göstermiştir²²⁷. Bu bulgular, resveratrolün oral olarak alındığında hızlı bir şekilde absorbe ve metabolize olduğunu ve özellikle karaciğer gibi bazı periferik organlarda biriktiğini göstermektedir.

Juan ve ark., yüksek doz olarak tanımlanan 20 mg/kg resveratrolün oral olarak, 28 gün boyunca erkek Sprague-Dawley sıçanlara vermesinden sonra, hepatic

fonksiyonların ve hematolojik ve biyokimyasal parametrelerin değişmediğini saptamışlardır¹⁰⁶. Bizim çalışmamızda kullanılan resveratrol konsantrasyonu 6 mg/kg/gün olarak belirlenmiştir. Bu doz, resveratrolün akut ve kronik biyolojik etkilerini inceleyen diğer çalışmalardaki limitleri içinde kalmaktadır^{28,60,82,200, 225,245}.

Yetişkin (14-16 haftalık) erkek ve dişi sıçanların deney başlangıç ağırlıklarının ve 21 günlük resveratrol içimi sonucundaki ağırlıklarının önemli ölçüde değişmediği saptanmıştır (Tablo 2). Daha önce yapılan çalışmalarda, 25 mg/L resveratrol ile 15 gün²⁸, 20 mg /kg resveratrol ile 28 gün¹⁰⁶ ve 1 mg/kg resveratrol ile 8 hafta boyunca beslenen sıçanlarda¹⁴⁶, vücut ağırlığının ve büyüme hızının kontrol hayvanlardan farklılık göstermediği belirtilmiştir. Erkek ve dişi sıçanların kan lipid profilleri incelendiğinde de, 3 haftalık resveratrol içiminin HDL, LDL, VLDL ve trigliserit düzeylerini değiştirmedeği görülmüştür. Daha önce yapılan bir çalışmada, 50 ng/ml resveratrol ile 20 gün boyunca beslenen erkek sıçanlarda serum kolesterol, HDL, LDL, VLDL, serum trigliserit düzeylerinin değişmediği gösterilmiştir¹⁴⁵.

Cinsiyet farklılığının damarlar üzerindeki etkisini incelemek için, izole organ banyosunda, erkek ve dişi ve sıçanların endotelli ve endotelsiz torasik aortalarında, asetilkolin (10^{-9} - 10^{-4} M), estrogen (10^{-10} - 10^{-4} M), HDL (0.001-0.3 µg/ml) ve SNP (10^{-9} - 10^{-4} M) kümülatif doz-cevap eğrileri oluşturulmuştur. İlk önce, erkek ve dişi sıçanların endotelli ve endotelsiz aorta halkalarında 10^{-9} - 10^{-4} M doz aralığında fenilefrin doz cevap eğrisi elde edilmiştir. Maksimum fenilefrin kontraksiyonunun % 80-90'ını oluşturan fenilefrin dozu, erkek sıçanların endotelli ve endotelsiz aortalarında

3×10^{-6} M; dişi sıçanların endotelli ve endotelsiz aortalarında ise 2×10^{-6} M olarak hesaplanmıştır.

Asetilkolin (10^{-9} - 10^{-4} M), erkek ve dişi sıçan endotelli aortalarında konsantrasyon- ve endotel-bağımlı gevşemeler oluşturmuştur (Şekil 4). Asetilkoline maksimum gevşeme cevapları karşılaştırıldığında, dişi sıçan aortasındaki gevşemenin, erkek sıçan aortasından daha fazla olduğu görülmüştür (erkek ve dişi E_{maks} değerleri: % 76 ve %90, $n=12$, $p<0.05$). Erkek ve dişi sıçan arasında asetilkolinin potensi açısından ise bir farklılık saptanmamıştır (erkek ve dişi EC_{50} değerleri: 6.73 ± 0.07 , 6.83 ± 0.07 , $n=12$, $p>0.05$, Tablo 4). Bu bulgumuz, asetilkolinin dişi hayvanların arterlerinde daha fazla endotel-bağımlı gevşeme cevabı oluşturduğunu belirten çalışmalarla uyum göstermektedir^{110,170,235,237}. Buna göre, endotel bağımlı gevşetici faktörlerin dışı, asetilkolinle daha fazla oluştuğunu söylemek olasıdır. Ayrıca, endotel-bağımsız gevşeme oluşturan SNP'nin etkisinde cinsiyet farklılığı izlenmemiştir. Asetilkolin, erkek ve dişi sıçanların endoteli kazınmış aortalarında ise hiç gevşeme oluşturmamıştır. Paralel olarak, L-NOARG (10^{-4} M) varlığında asetilkolin gevşemeleri erkek ve dişi arterlerinde tamamen ortadan kalkmıştır. L-arjinin analogları ile NO oluşumunun inhibisyonu sonucu izlenen vazokonstriksiyon, izole damar preparatlarında bazal nitrik oksit oluşum kapasitesini belirlemek için kullanılmaktadır. L-NOARG uygulamasından sonra ölçülen vazokonstriksiyon, dişilerde erkek sıçanlardan daha fazladır. Daha önce de, benzer şekilde dişi hayvanların arterlerinde L-arjinin analoglarının daha fazla kontraksiyon oluşturduğu belirtilmiştir^{61,87}.

Estrojenin (10^{-10} - 10^{-4} M) akut uygulaması, erkek ve dişi sıçan aortalarında ilk beş dakika içinde fizyolojik konsantrasyonlarda (1 nM) başlayan gevşemeler oluşturmuştur. Estrojenin, bu akut gevşetici etkisi büyük oranda endotel kökenli faktörler aracılığıyla gerçekleşmektedir çünkü, endotel tabakasının kazınması estrojenin oluşturduğu bu gevşemeyi büyük oranda ortadan kaldırmaktadır. Daha önce yapılan bazı çalışmalarda benzer şekilde, estrojenin vazodilatör etkisinin esas olarak endotel-bağımlı olduğu belirtilmiştir^{26,31,94,128,240}. Kültüre edilmiş damar endotel hücrelerinde, estrojenin nanomolar konsantrasyonlarda eNOS aktivasyonu yapabildiği gösterilmiştir^{91,209}. Bu çalışmada, dişi sıçanların aortasının estrojenin endotel bağımlı gevşetici etkisine erkeklerden daha duyarlı olduğu saptanmıştır. Endotel tabakasının kazınmasından sonra, erkek ve dişi sıçan aortalarında estrojen konsantrasyon-cevap eğrileri neredeyse eşitlenmektedir. Bu bulgu, daha önceki bazı çalışmaların sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir^{68,128,140}. Bununla birlikte, 17β -estradiolün vazodilatör etkisinin erkek sıçanların endoteli kazınmış aortalarında dişilerden daha yüksek olduğunu gösteren sonuçlar da bulunmaktadır⁴⁵. Ayrıca, erkek sıçanların mezenterik arterlerinin estrojenin vazodilatör etkisine, dişi sıçanların proöstrus ve diöstrus dönemlerindeki daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Dişilerde, menstrul siklus fazlarındaki estrojen dalgalanmalarının bu varyasyondan sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür¹⁹⁴. Bu çalışmada dişi sıçanlar, östrus siklusu dikkate alınmaksızın rastgele seçilmiştir. Çalışılan ajanların E_{maks} ve EC_{50} değerleri, her bir doz cevap eğrisinden probit analizi ile ayrı ayrı hesaplandığında belirgin bir varyasyon olmadığı görülmüştür.

HDL düzeyleri ile ateroskleroz gelişimi arasında ters bir ilişki olduğunu gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Fakat, HDL'nin antiaterojenik etkisinin altında yatan mekanizma henüz tümüyle aydınlatılamamıştır¹⁹⁶. Son zamanlarda, HDL'nin kültüre edilmiş endotel hücrelerinde eNOS aktivasyonu yaptığı ve buna bağlı olarak NO salınımına neden olduğu gösterilmiştir²⁴³. Aynı çalışmada, HDL'nin (25 µg/ml) dişi farelerin torasik aortasında endotel bağımlı ve NO aracılıklı vazodilatasyon oluşturduğu da bildirilmiştir. Fare ve sıçan torasik aortalarında, HDL'nin oluşturduğu konsantrasyon bağımlı vazodilatasyonun, NOS inhibitörü L-NAME ile preinkübasyondan sonra ortadan kalktığı gösterilmiştir¹⁵⁶. Başka bir çalışmada, fare femoral arterinde kadınlardan izole edilen HDL'nin, fakat erkek HDL'sinin değil, eNOS'u aktive ederek vazodilatasyon oluşturduğu gösterilmiştir. HDL'nin cinsiyet bağımlı olarak gösterdiği bu etkinin, HDL-estradiol kombinasyonu ile eNOS aktivasyonuna bağlı olduğu belirtilmiştir⁷⁴. Bu çalışmada, araştırmacılar HDL'nin kaynağına dikkat çekmişler fakat, HDL'nin dişi ve erkek hayvanlar üzerindeki etkilerini araştırmamışlardır. Bizim çalışmamızda ise, ticari olarak bulunan HDL kullanılmıştır. Üretici firmanın, HDL üretiminde cinsiyet farklılığının dikkate alınmadığı konusunda bildirimi olmuştur. HDL (0.001-0.3 µg/ml), fizyolojik konsantrasyonlarda, hem erkek hem dişi sıçan aortasında konsantrasyon bağımlı gevşemeler oluşturmuştur. Bu gevşemeler endotel tabakasının uzaklaştırılmasından sonra tümüyle ortadan kalkmaktadır. Dişi arterlerinin HDL'nin vazodilatör etkisine daha duyarlı olduğu dikkat çekmiştir (Tablo 6) .

İnsan koroner arterlerinde, anjiyotensin II'nin (10^{-11} - 10^{-6} M) vazokonstriktör etkisinin kadınlarda erkeklerden daha güçlü olduğu gösterilmiştir¹⁴. Erkek ve dişi fare afferent arteriollerinde, anjiyotensin II'nin oluşturduğu kasılmaların cinsiyete göre bir farklılık yaratmadığı belirtilmiştir¹⁶⁷. Erkek ve dişi fare serebral arterlerinde yapılan bir çalışmada, anjiyotensin II'nin AT1 reseptörleri aracılığıyla güçlü kontraksiyonlar oluşturduğu ve bu kontraksiyonların erkek fare serebral arterlerinde daha büyük olduğu bildirilmiştir⁵⁶. Erkek sıçan torasik aortasında dişilerden daha fazla anjiyotensin II reseptörü bulunduğu ve estrogenin, anjiyotensin II reseptör downregülasyonuna neden olduğu ileri sürülmüştür¹⁵⁴. Wistar erkek ve dişi sıçanların perfüze böbreklerinde, anjiyotensin II'nin etkisi karşılaştırıldığında, erkeklerdeki vazokonstriksiyonun daha fazla olduğu görülmüştür. Anjiyotensin II nin etkisinde ortaya çıkan bu cinsiyet farklılığının, L-NAME preinkübasyonundan sonra ortadan kalktığı gösterilmiştir²³³. Bizim çalışmamızda, anjiyotensin II'nin endoteli sağlam arterlerdeki maksimum vazokonstriktör etkisinin, erkeklerde daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca, EC50 değerleri karşılaştırıldığında erkek sıçanların arterlerin anjiyotensin II'ye duyarlılığının daha yüksek olduğu görülmüştür. Anjiyotensin II'ye cevaplılıkta izlenen cinsiyetler arası Emaks ve potens farklılığı, endotel tabakasının kazınmasından sonra da devam etmiştir.

Orta derecede şarap tüketiminin (günde 250-300 cc, kardiyovasküler risk insidansını azalttığı öne sürülmektedir^{79,82}. Çeşitli çalışmalarda, kırmızı şarabın içindeki polifenolik bileşiklerin, kan damarlarında endotel kaynaklı NO oluşumunu artırarak

vazodilatör etki gösterdiği rapor edilmiştir^{3,4,5,40,59,230}. Kırmızı şarabın polifenolik bileşiklerinden olan resveratrolün, sıçan torasik aortası, kobay mezenterik^{38,151} ve insan internal meme arterinde¹⁷⁴ NO bağımlı gevşemeler oluşturduğu gösterilmiştir. Resveratrolün oluşturduğu vazodilatör etkinin, kobayların östrus siklusunun değişik dönemlerinde farklılık göstermediği mezenterik ve uterus arterlerindeki çalışmalarla saptanmıştır¹⁵⁰. Bizim çalışmamızda, uzun süreli resveratrol içiminin asetilkolin, estrogen ve HDL'nin endotel bağımlı vazodilatör etkilerini arttırdığı saptanmıştır. Ayrıca, anjiyotensin II'nin oluşturduğu kasılma cevaplarında belirgin bir azalma görülmüştür. Uzun süre resveratrol içiminden sonra, erkek sıçanlarda asetilkolinle oluşan maksimum gevşemenin, artarak dişi sıçanlardaki maksimum gevşemeyle eşitlendiği görülmüştür. Ayrıca, uzun süre resveratrol içiminden sonra, erkek sıçan arterlerinin estrogen ve HDL'ye duyarlılığının artarak dişi sıçanların değerlerine yaklaştığı saptanmıştır. Anjiyotensin II'ye cevaplılıkta, erkek sıçan arterlerinde daha yüksek olarak saptanan Emaks değerleri, resveratrol içiminden sonra azalarak dişilerle eşitlenmiştir. Ayrıca, resveratrol içiminden sonra L-NOARG ile oluşan vasokonstriksiyon, hem erkek hem dişi sıçan arterlerinde artış göstermiştir. Bu bulgular uzun süre resveratrol içen hayvanlarda hem bazal hem stimüle olmuş endotel fonksiyonunun arttığını göstermektedir. Ayrıca ilginç olarak, resveratrol, erkek ve dişi sıçanların endotel bağımlı vazodilatör ajanlara ve vazokonstriktör ajan anjiyotensin II'ye cevaplılıkta saptanan cinsiyet farklılığını büyük ölçüde ortadan kaldırmaktadır. Resveratrolün endotel fonksiyonunda oluşturduğu iyileşme, onun endotel kaynaklı faktörlerden NO'nun oluşumundaki artışa ya da parçalanmasındaki azalmaya bağlı olarak ortaya çıkmış olabilir. Bu bağlamda, resveratrolün (1-20 µM) koroner bypass-

graft dokusu olarak kullanılan insan internal meme arterinde endotel reaktivitesini iyileştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca, 0.1 µM konsantrasyonda reseveratrolün kültüre edilmiş insan umbilikal ven endotel hücrelerinde, eNOS aktivitesini 2 dakikalık bir inkübasyon periyodunun ardından belirgin olarak arttırdığı rapor edilmiştir. Resveratrolün daha uzun süreli uygulanmasının (72 saate kadar), aynı hücre kültürü ortamında eNOS mRNA ekspresyonunu ve ortamdaki NO miktarını arttırdığı gösterilmiştir²³⁰. 7 gün boyunca 2.5 mg/kg resveratrol verilen hayvanların kalplerinde, eNOS ve iNOS ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir⁵⁰. Bizim bu çalışmamız, uzun süreli resveratrol uygulamasının, damarların endotel hücre fonksiyonundaki değişiklikleri inceleyen ilk çalışma olması bakımından önem taşımaktadır. Benzeri bir çalışmada daha önce, kırmızı şarabın alkol içermeyen ekstresi, kersetin ve kateşin içeren diyetlerle 10 gün süreyle beslenen sıçanlarda asetilkolinin endotel bağımlı vazodilatör etkisinin, NO oluşumundaki artış sonucu potansiye olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada, asetilkolinin endotel bağımlı vazodilatör etkisinde görülen iyileşmenin, eNOS ekspresyonundaki artışa veya süperoksit oluşumundaki azalmaya bağlı olmadığı da gösterilmiştir¹⁷. Bizim bu çalışmamızda, uzun süreli resveratrol uygulanmasından sonra, eNOS protein ve eNOS mRNA ekspresyonunun hem erkek hem dişi sıçan arterlerinde arttığı gösterilmiştir. Yanı sıra, çalışmamızda uzun süre resveratrol içen hayvanların plazma ve aortalarında nitrit oluşumunun da fazlalaştığı bulunmuştur. Bütün bu bulgularla, resveratrolün, dişi ve erkek sıçanların arterlerinde NO oluşumunu arttırarak endotel fonksiyonunu iyileştirdiği söylenebilir.

Diğer taraftan resveratrolün çeşitli iskemi reperfüzyon modellerinde laktat dehidrogenaz, lipid peroksidasyon ve malondialdehit düzeylerini azalttığı gösterilmiştir^{71,95,117}. Ayrıca, çeşitli reaktif oksijen türleri oluşturan enzim türleri üzerinde resveratrolün inhibitör etkisi olduğu saptanmıştır^{63,137}. Ayrıca, resveratrolün vasküler sistemdeki majör süperoksit kaynaklarından biri olan NAD(P)H oksidazı inhibe ettiği gösterilmiştir^{43,160}. Bu çalışmada, süperoksit oluşturan diğer enzim sistemleri için bir substrat olmayan NAD(P)H, endoteli sağlam ve endotelsiz arter segmentleri üzerine eklendiğinde, süperoksit oluşumunun çok belirgin bir şekilde arttığı saptanmıştır. Beklentilere paralel olarak, NAD(P)H stimülasyonuna cevapta, süperoksit oluşumunun endotelsiz arter segmentlerinde daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu bulgu, endotel kaynaklı faktörlerin damar düz kasından kaynaklanan süperoksiti kısmen tampon ettiğini göstermektedir. NAD(P)H oksidazın en önemli uyarılarından biri olan anjiyotensin II'nin, NAD(P)H ile kombinasyonu süperoksit oluşumunda ileri bir artış oluşturmamıştır. Bu bulgu, ortama dışarıdan eklenen NAD(P)H'nin, damardaki mevcut NAD(P)H oksidazı tümüyle satüre ettiği dolayısıyla, anjiyotensin II eklenmesiyle süperoksit oluşumunda fazladan bir değişiklik olamadığı şeklinde yorumlanabilir. Zira, anjiyotensin II'nin tek başına damar segmentleri üzerine eklenmesi, bazal süperoksit oluşumunda önemli bir artış oluşturmaktadır. Bu artışın, dişi ve erkek arterlerinde farklılık göstermediği saptanmıştır. Hem endoteli sağlam hem de endotelsiz arter segmentlerinde, NAD(P)H stimülasyonu sonucu saptanan süperoksit miktarındaki artış, 1µM resveratrol varlığında belirgin olarak azalmıştır. İnsan arterlerinde benzeri bir inhibisyonu daha önce resveratrolün aynı dozu ile NAD(P)H stimülasyonuna cevapta göstermiştik⁴³. NAD(P)H stimülasyonu sonucu artan

süperoksitin, süperoksitin enzimatik süpürücüsü, SOD ve NAD(P)H oksidaz inhibitörü, DPI ile de önemli ölçüde inhibe olduğu görülmüştür. NAD(P)H stimülasyonunun resveratrolle beslenen hayvanların arterlerinde daha düşük olması, resveratrolün oksidatif enzim sistemi üzerindeki inhibitör etkisinin devam ettiğini göstermektedir. Bu çalışmada, NAD(P)H stimülasyonuna cevapta ölçülen süperoksit miktarının erkek ve dişi hayvanların arterlerinde farklılık göstermediği saptanmıştır. Resveratrolün NAD(P)H oksidaz üzerindeki inhibitör etkisinin, erkek ve dişi sıçanların arterlerinde farklılık göstermediği de bulunmuştur.

Auger ve ark., polifenollerin, bakır ve çinko gibi metal iyonlarıyla şelasyon yapabilme aktivitelerinin olduğunu ve böylece, bu metallerin serbest radikalleri katalizleme özelliklerini önlediklerini göstermiştir. Bu özellik, polifenollerin antioksidan özelliklerine katkıda bulunmaktadır⁹. Fakat, bizim çalışmamızda resveratrolle beslenmiş erkek ve dişi hayvanların plazma SOD aktivitesinin değişmediği saptanmıştır. Dolayısıyla, resveratrolün antioksidan aktivitesinin, SOD ile ilişkili olmadığı görülmektedir.

Estrojenin vazodilatör etkisi ve onun resveratrol ile potansiyasyonu, erkek ve dişi sıçanların aortalarında non selektif estrojen reseptör antagonisti ICI 182,780 ile inkübasyondan sonra azalarak eşit büyüklüğe gelmektedir. Bu bulgu, resveratrolün, estrojenin vazodilatör etkisinde oluşturduğu potansiyasyonun, klasik estrojen reseptörleri aracılığıyla olabileceğini düşündürmektedir. Daha önce, estrojenin akut vazodilatör etkisinin, estrojen reseptör antagonisti ICI 182,780 ile inhibe edildiği

ve bu etkilerin klasik estrogen reseptörleri aracılığı ile oluştuğu ileri sürülmüştür³¹. Resveratrolün bu etkisi, onun potansiyel fitoöstrojenik etkisine bağlı olabilir. Çünkü, resveratrolün (10-30 μ M) insan meme kanser hücrelerinde, estrogen reseptörlerini aktive ettiği ve bu etkilerin, ICI 182,780 ile inhibe olduğu gösterilmiştir⁶⁹. Çeşitli endotel hücrelerinin kültürleri kullanılarak yapılan bir başka çalışmada, resveratrol ve estrogenin nanomolar konsantrasyonlarda, MAPK ve eNOS'u aynı yoldan aktive ettiği ve etki mekanizmalarının ortak bir aracı sistem üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir¹¹⁹. Diğer hücre tipleri kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda ise, resveratrolün estrogen reseptörleri üzerinde, hem parsiyel agonist hem de antagonist etkisi olduğu gösterilmiştir^{8,23,24}. Bu bulgular, resveratrolün estrogen reseptörleri üzerindeki aktivitesinin hücre tipleri arasında farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Resveratrol, doğal selektif estrogen modülatörü olarak da dikkate alınabilecek bir bileşik olarak gözükmektedir. İlginç olarak, bizim bu çalışmamızda, plazma estrogen düzeylerinin uzun süre resveratrol içiminden sonra, hem erkek hem dişi sıçanlarda azaldığı görülmüştür. Bu sonuç, onun mikromolar konsantrasyonlarda MCF-7 hücrelerinde saptanan aromataz inhibitör etkisiyle ilişkili olabilir²³². Bizim çalışmamızda, resveratrol aromataz inhibitör etkisiyle testosteronun estrojene dönüşümünü inhibe etmiş olabilir. Bu bulgularla resveratrol, endojen estrogen sentezini inhibe ederken, kendisi direkt estrogen reseptörlerini aktive edebilir ve organizmada yeni bir estrogen dengesi yaratıyor olabilir. Resveratrolün bu etkisi, vazoaaktif ajanlara cevaplılıkta saptadığımız cinsiyet farklılığının kapanmasına katkıda bulunmuş olabilir.

Sonuç olarak, resveratrolün NO oluşumunu arttırarak ve süperoksit oluşumunu azaltarak endotel fonksiyonunu iyileştirdiği söylenebilir. Ayrıca, resveratrolle beslenmenin, vazoaaktif ajanlara cevaplılıkta saptanan cinsiyet farklılığını erkeğin lehine olarak değiştirdiği görölmüştür. Bu bulguların ışığında, resveratrolün yararlı etkilerinden, erkeklerin dişilere göre daha fazla yarar sağladığı söylenebilir. Resveratrolün bu etkisinin, özellikle erkeklerde, kalp damar hastalıklarından korunma açısından klinik bir değeri olabilir.

VII. ÖZET

Epidemiyolojik çalışmalarda, kırmızı şarap tüketiminin yüksek olduğu toplumlarda kalp-damar hastalıkları riskinin düşük olduğu gösterilmiştir. Özellikle Fransızların, diyetlerinde yüksek oranda doymuş yağ tüketmelerine rağmen, kalp-damar hastalıklarına yakalanma oranının diğer toplumlara göre beklentilerin tersine, düşük olması “Fransız Paradoksu” olarak adlandırılmaktadır. Bunun, Fransızların yemeklerinde düzenli kırmızı şarap tüketme alışkanlığından kaynaklanmış olabileceği ileri sürülmektedir^{178,208}.

Kırmızı şarabın içindeki polifenolik bileşiklerden resveratrol, endotel reaktivitesini arttırıcı, güçlü antioksidan, trombosit ve lökosit fonksiyonunu inhibe edici özellikler taşımaktadır. Bu etkileriyle resveratrol, iyi bir antihipertansif ve antiaterosklerotik olma niteliklerine sahiptir. Resveratrol, hem estrogen benzeri hem de estrogen antagonisti aktivite göstermekte olup onun, dişilik hormonu estrogenle etkileşimi bilinmemektedir. Doğal estrogenler, endotel hücre reaktivitesini arttırıcı özellikte, vazodilatör ve antioksidan etkili bileşiklerdir. Estrogenlerin bu sayılan özellikleri, kadınların menopoş öncesi dönemde kalp-damar hastalığına yakalanma oranının düşük olmasını iyi bir şekilde açıklamaktadır. Menopoş sonrası dönemde, kadınlarda kalp-damar hastalığı riski erkeklerle eşitlenmektedir.

Bu çalışmada, endotel bağımlı vazodilatör bileşiklerden asetilkolin, estrogen ve HDL'nin erkek ve dişi sıçanların torasik aortalarındaki etkileri

incelenmiştir. Parelel olarak uzun süre resveratrol içiminin, cinsiyete bağlı olarak vazodilatör bileşiklerin etkisinde ortaya çıkan farklılık üzerine etkisi araştırılmıştır. Ayrıca, vazokonstriktör bileşiklerden anjiyotensin II'nin etkisi de erkek ve dişi sıçan arterlerinde karşılaştırılmış ve resveratrol içiminden sonraki cevaplar ölçülmüştür. Resveratrol içiminin, erkek ve dişi sıçan arterlerinde eNOS ve iNOS protein düzeylerine, eNOS mRNA ekspresyonuna, plazma ve aorta nitrit ve plazma estrogen düzeylerine etkisi de araştırılmıştır. Erkek ve dişi sıçanlara uzun süreli resveratrol içirilmesinden sonra, plazma ve karaciğer örneklerinde resveratrol düzeyleri ölçülmüştür

Kontrol ve uzun süre resveratrol içen (50 mg/L, 21 gün) erkek ve dişi sıçan torasik aortalarından izole edilen 3-4 mm uzunluğundaki halkalar, izometrik gerim ölçümü için organ banyosuna takılmıştır. Bu aortalarda, fenilefrin (10^{-9} - 10^{-4} M), asetilkolin (10^{-9} - 10^{-4} M), estrogen (10^{-10} - 10^{-4} M), HDL (0.001-0,3 µg/ml) ve anjiyotensin II (10^{-10} - 10^{-5} M) doz-cevap eğrileri oluşturulmuştur.

Kontrol ve resveratrol içen her iki cinsiyetten sıçanların aortalarında süperoksit ölçümü, lusigeninin düşük dozu (5 µM) kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca, bu aortalarda iNOS, eNOS proteinleri Western Blotting yöntemi kullanılarak, eNOS mRNA ekspresyonu ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyon analizi (RT-PCR) ile ölçülmüştür. Plazma estrogen düzeyi, uygun elektrokemilüminesans kiti, plazma ve karaciğer resveratrol düzeyleri de HPLC-MS yöntemi kullanılarak ölçülmüştür.

Erkek ve dişi sıçan plazma örneklerinde resveratrol düzeyleri ölçülebilir sınırların altında bulunmuştur. Karaciğer örneklerinde resveratrol miktarı ise, 40-50 ng/g olarak ölçülmüştür. 21 gün boyunca 50 mg/L resveratrol içimi sıçanların vücut ağırlığında anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır. Resveratrol içimi, erkek ve dişi sıçanların plazma lipid profili üzerinde de önemli bir farklılık oluşturmamıştır. Resveratrol içimi, SOD aktivitesi ve bakır ve çinko düzeyleri üzerinde de herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Plazma estrogen düzeyleri ise, resveratrol içen erkek ve dişi sıçanlarda anlamlı olarak azalmıştır.

Erkek ve dişi sıçanların endotelli aortalarında asetilkolin, estrogen ve HDL'nin oluşturduğu gevşeme cevaplarında erkek ve dişi sıçan arasında farklılık gözlenmiştir. Bu ajanlarla oluşan endotel bağımlı gevşemelerin, dişilerde daha belirgin (asetilkolin için) veya bu gevşetici ajanlara dişilerin erkeklerden daha duyarlı (estrogen ve HDL için) olduğu bulunmuştur. Endotel-bağımsız gevşetici ajan sodyum nitroprussiyata cevaplarda ise, cinsiyete bağlı bir farklılık olmadığı görülmüştür. Vazokonstriktör ajan anjiyotensin II'ye sensitivitenin ve cevaplılığın, erkek sıçanlarda dişilerden daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Resveratrol içimi, asetilkolin, estrogen ve HDL'ye endotel-bağımlı gevşemeleri özellikle erkek sıçan aortasında daha belirgin olarak arttırmış ve böylece erkek ve dişi sıçanlar arasında saptanan farklılığı hemen hemen ortadan kaldırmıştır. Resveratrol içen sıçanlarda anjiyotensin II'nin oluşturduğu kasılmaların azaldığı ve

erkek ve dişi sıçan aortalarında saptanan farklılığın kısmen ortadan kalktığı görölmüştür.

Resveratrol içimi, erkek ve dişi sıçan aortalarında eNOS mRNA ekspresyonlarını anlamlı olarak artırdığı bulunmuştur. Ayrıca, resveratrol verilen erkek ve dişi sıçanlarda plazma ve aorta nitrit düzeylerinin belirgin derecede arttığı saptanmıştır.

Akut resveratrol (1 µM) uygulamasının, bazal ve NAD(P)H ile uyarılmış süperoksit oluşumunu büyük ölçüde inhibe ettiği bulunmuştur. Uzun süre resveratrol içen erkek ve dişi sıçan aortalarında NAD(P)H ile stimölasyona bir direnç olduğu saptanmıştır. Bu etkilerde cinsiyete bağılı bir farklılık izlenmemiştir. Anjiyotensin II (10^{-7} M) nin erkek ve dişi sıçan aortalarında süperoksit oluşumunu belirgin bir şekilde artırdığı ve cinsiyete bağılı bir farklılık olmadığı saptanmıştır. Anjiyotensin II ve NAD(P)H kombinasyonun ise, süperoksit oluşumunda fazladan bir değışiklik oluşturmadığı belirlenmiştir. Resveratrolün, bu uygulamalarla oluşan süperoksit oluşumunu da belirgin bir şekilde azalttığı bulunmuştur.

Bu çalışmanın sonuçları, uzun süre resveratrol uygulamasının asetilkolin, estrogen ve HDL'nin endotel bağımlı gevşeme cevaplarını arttırdığını, anjiyotensin II kasılma cevaplarını azalttığını ve erkek ve dişi sıçan aortalarında endotel bağımlı gevşeme ve kasılma cevaplarında görölen cinsiyet farklılığını ortadan kaldırdığını göstermektedir. Resveratrol uygulanan gruplarda görölen endotel

fonksiyonundaki artış, artan eNOS mRNA ekspresyonu ve azalan süperoksit oluşumuyla ilişkili olabilir. Bu çalışmanın sonuçları, resveratrolün kardiyovasküler sistem üzerindeki koruyucu etkilerinin aydınlatılmasında önemli katkılar sağlayabilir.

VIII.SUMMARY

Epidemiological studies indicate an association between moderate consumption of red wine and reduced risk of coronary heart disease. The mortality rate from coronary heart disease in French population is paradoxically lower than those of other countries despite having a diet rich in high saturated fat. This interesting situation is named as French Paradox and has been attributed to moderate and regular red wine consumption of French people with their meal^{178, 208}.

Resveratrol, one of the polyphenolic compounds present in red wine, has powerful antioxidant and endothelial reactivity promoting effects and also inhibitory activity on thrombosis and leukocyte functions. With these effects, resveratrol shows effective antiatherosclerotic and antihypertensive agent profiles. Resveratrol has both estrogen agonistic and antagonistic activity, but its interaction with female hormone estrogen is still unknown. Natural estrogens have endothelial reactivity increasing activity, vasodilating and antioxidant properties. These effects clearly explain the low-incidence of mortality from coronary heart disease in females before menopause according to men. After menopause, the risk of coronary heart disease in women almost equalize with in that of men.

In this study firstly, the effects of endothelium-dependent vasodilatory agents acetylcholine, estrogen and HDL, on male and female rat aortae were investigated. Parallely, the influence of long term resveratrol treatment on the gender-

related difference with these vasodilatory agents was also investigated. Besides, the effect of angiotensin II, a powerful vasoconstricting agent, were compared in aortic rings from male and female rats and the responses to angiotensin II were determined after resveratrol treatment. Additionally, the effect of resveratrol treatment on eNOS, iNOS protein expression, eNOSmRNA expression in male and female aortae, plasma and aorta nitrite level and plasma estrogen levels were investigated. The amount of resveratrol in plasma and liver samples of male and female rats were measured after long term resveratrol treatment.

The thoracic aortae were isolated from control and long-term resveratrol treated (50 mg/L, 21 days) male and female rats. The aortic rings of 3-4 mm, were mounted in organ bath for the measurement of isometric force. Concentration-response curves to acetylcholine (10^{-9} - 10^{-4} M), estrogen (10^{-10} - 10^{-4} M), HDL (0.001-0.3 μ g/ml) and angiotensin II (10^{-10} - 10^{-5} M) were obtained in aortic rings.

The superoxide measurement was done by using a low concentration (5 μ M) of lucigenin in aortae of the control and resveratrol treated rats from both genders. Besides, iNOS, eNOS proteins were measured by Western Blotting technique, eNOS mRNA expression was measured by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. Plasma estrogen level was measured by suitable electrochemiluminescence kit, plasma and liver resveratrol levels were measured by HPLC-MS method.

In male and female aortic samples resveratrol levels were found to be underlimit of the quantifiable amounts. Resveratrol amount was measured as 40-50 ng/g in liver homegenates from both genders. Long-term resveratrol treatment (50 mg/l, 21 days) didn't affect the body weight of the rats. Resveratrol feeding didn't cause any significant difference on the plasma lipid profiles of male and female rats. Resveratrol treatment also didn't affect plasma SOD activity or the levels of copper and zinc. The plasma level of estrogen was significantly decreased in resveratrol treated male and female rats.

The endothelial relaxations to acetylcholine, estrogen and HDL showed diversty between aortic rings with endothelium from male and female genders. The endothelium-dependent relaxations to these agents were more pronounced (for acetylcholine responses) or ready (for estrogen and HDL responses) in the aorta from female than those of male. The vascular smooth muscle cell responsiveness to endothelium-independent relaxing agent, sodium nitroprusside was similar in the arteries from male and female. The contractile response and sensitivity to angiotensin II were more pronounced in male compared with female.

Resveratrol treatment potentiated the endothelium-dependent relaxations to acetylcholine, estrogen and HDL especially in aorta from male and thereby closing endothelial reactivity of male to that of female. Resveratrol treatment decreased the contractile responses to angiotensin II in both genders and partially abolished the gender differences observed.

Resveratrol treatment significantly increased eNOS mRNA expressions in male and female rat aortae. Moreover, plasma and aortae nitrite levels of resveratrol-treated male and female rats were also significantly increased.

Resveratrol treatment and acute application of resveratrol greatly decreased basal and NAD(P)H-induced superoxide production in arterial segments from male and female rats. The aortae from long term resveratrol treated male and female rats were found to be resistant to NAD(P)H-stimulated superoxide production, but there were not any gender dependent differences in these effects. Angiotensin II (10^{-7} M) significantly enhanced superoxide production in endothelium intact aortae from male and female rats and there were not any gender-related difference with this effect. In combination with NAD(P)H, angiotensin II did not cause further increase in superoxide production. Resveratrol also significantly decreased angiotensin II-stimulated superoxide production.

The results of this study suggest that, resveratrol treatment markedly increased endothelial relaxations to acetylcholine, estrogen and HDL, decreased contractions to angiotensin II and closed the gender differences observed both in endothelial relaxations and contractions in aortic rings from male and female rats. The increased endothelial reactivity in resveratrol treated animals could be related to increased nitric oxide and decreased superoxide production. The results of this study could bring out important contributions to highlight the protective cardiovascular effects of resveratrol.

IX. KAYNAKLAR

1. ANDERSEN, H.L., WEIS, J.U., FJAHLAND, B., LARSGAARD, N.: Effect acute and long term treatment with 17 β -estradiol on the vasomotor responses in the rat aorta, Br. J. Pharmacol., 126,159-168. (1999)
2. ANDLAUER, W., KOLB, J., SIEBERT, K., FURST, P.: Assessment of resveratrol bioavailability in the perfused small intestine of the rat, Drugs Exp. Clin. Res., 26, 47-55. (2000)
3. ANDRIAMBELOSON, E., KLESCHYOV, A.L., MULLER, B., BERETZ, A., STOCLET, J.C., ANDRIANTSITOHANIA, R.: Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta, Br. J. Pharmacol., 120, 1053-1058. (1997)
4. ANDRIAMBELOSON, E., MAGNIER, C., HAAN-ARCHIPOFF, G., LOBSTEIN, A., ANTON, R., BERETZ, A., STOCLET, J.C., ANDRIANTSITOHAINA, R.: Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta, J. Nutr., 128(12), 2324-33. (1998)
5. ANDRIAMBELOSON, E., STOCLET, J.C., ANDRIANTSITOHAINA, R.: Mechanism of endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by

wine polyphenols in rat thoracic aorta, J. Cardiovasc. Pharmacol., 33(2), 248-54.
(1999)

6. ARICHI, H., KIMURA, Y., OKUDA, H., BABA, K., KOZAWA, M., ARICHI, S.: Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. on lipid metabolism, Chem. Pharm. Bull., 30,1766-1770. (1982)
7. ASENSI, M., MEDINA, I., ORTEGA, A., CARRETERO, J., BANO, M.C., OBRADOR, E., ESTRELA J.M.: Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability, Free Radic. Biol. Med., 33, 387-398. (2002)
8. ASHBY, J., TINWELL, H., PENNIE, W., BROOKS, A.N., LEFEVRE, P.A., BERESFORD, N., SUMPTER, J.P.: Partial and weak oestrogenicity of the red wine constituent resveratrol: consideration of its superagonist activity in MCF-7 cells and its suggested cardiovascular protective effects, J. Appl. Toxicol., 19(1), 39-45. (1999)
9. AUGER, C., TEISSEDRE, P.L., GERAIN, P., LEQUEUX, N., BORNET, A., SERISIER, S., BESANCON, P., CAPORICCIO, B., CRIISTOL, J.P., ROUANET, J.M.: Dietary wine phenolics catechin, quercetin, and resveratrol efficiently protect hypercholesterolemic hamsters against aortic fatty streak accumulation, J. Agric. Food Chem., 53(6),2015-21. (2005)

10. BAIRD, D.T., FRASER, I.S.: Blood production and ovarian secretion rates of estradiol-17 β and estrone in women throughout the menstrual cycle, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 38,1009-1017. (1974)
11. BAIRD, D.T., UMBACH, D.: Dietary intervention study to assess estrogenicity of dietary soy, among postmenopausal women, *Clin. Endocr.*, 80,1685-1690. (1995)
12. BAKHIT, R.M., KLEIN, B.P., ESSEX-SORLIE, D.: Intake of 25 g of soybean protein with or without soybean fibre alters plasma lipids in men with elevated cholesterol concentrations, *J Nutr.*, 124, 213-222. (1994)
13. BASLY, J.P., MARRE-FOURNIER, F., LE BAIL, J.C., HABRIOUX, G., CHULIA, A.J.: Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)-resveratrol, *Life Sci.*, 66(9),769-77. (2000)
14. BATENBURG, W.W., GARRELD, I.M., BERNASCONI, C.C., JULLERAT-JEANNERET, L. VAN KATS, J.P., SAXENA, P.R., DANSER, A.H.: Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation in human coronary microarteries, *Circulation*, 109(19), 2296-301. (2004)

15. BELGUENDOUZ, L., FREMONT, L., LINARD, A.: Resveratrol inhibits metal iondependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins, *Biochem Pharmacol.*, 53,1347-1355. (1997)
16. BELGUENDOUZ, L., FREMONT, L., GOZZELINO, M.T.: Interaction of trans resveratrol with plasma proteins, *Biochem. Pharmacol.*, 55, 811-816. (1998)
17. BENITO, S, LOPEZ, D., SAIZ, M.P., BUXADERAS, S., SANCHEZ, J., PUIG-PARELLADA, P., MITJAVILA, M.T.: A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta, *Br. J. Pharmacol.*, 135(4), 910-6. (2002)
18. BERGENDI, L., BENES, L., DURACKOVA, Z., FERENCIK, M.: Chemistry, physiology and pathology of free radicals, *Life Sci.*, 65(18-19), 1865-1874. (1999)
19. BERTELLI, A.A., GIOVANNINI, L., STRADI, R., BERTELLI, A., TILLEMENT, J.P.: Plasma, urine and tissue levels of trans- and cis-resveratrol (3,4',5trihydroxystilbene) after short-term or prolonged administration of red wine to rats, *Int. J. Tiss. Reac.*, 18, 67-71. (1996)
20. BERTELLI, A., BERTELI, A.A., GOZZINI, A., GIOVANNINI, L.: Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity,. *Drugs Exptl. Clin. Res.*, 24(3),133-138. (1998a)

21. BERTELLI, A.A., GIOVANNINI, L., STRADI, R., URIEN, S., TILLEMENT, J.P., BERTELLI, A.: Evaluation of kinetic parameters of natural phytoalexin in resveratrol orally administered in wine to rats, *Drugs Exptl. Clin. Res.*, 24, 51-55. (1998b)
22. BEVERS, L.M, BRAAM, B., POST, J.A., VAN ZONNEVELD, A.J., RABELINK, T.J., KOOMANS, H.A., VERHAAR, M.C., JOLLES, J.A.: Tetrahydrobiopterin, but not L-Arginine, decreases NO synthase uncoupling in cells expressing high levels of endothelial NO synthase, *Hypertension*, 47, 87-94. (2006)
23. BHAT, K.P., LANTVIT, D., CHRISTOV, K., MEHTA, R.G., MOON, R.C., PEZZUTO, J.M.: Estrogenic and antiestrogenic properties of resveratrol in mammary tumor models, *Cancer Res.*, 61(20), 7456–7463. (2001a)
24. BHAT, K.P., PEZZUTO, J.M.: Resveratrol exhibits cytostatic and antiestrogenic properties with human endometrial adenocarcinoma (Ishikawa) cells. *Cancer Res.*, 61(16) ; 6137–6144. (2001b)
25. BLOND, J.P., DENIS, M.P., BEZARD, J.: Quercetin effectively inhibited resveratrol glucuronidation, *Sci. Alim.* 15, 347-358. (1995)

26. BOLEGO, C., CIGNARELLA, A., SANVITO, P., PELOSI, V., PELLEGATTA, F., PUGLISI, L., PINNA, C.: The acute estrogenic dilation of rat aorta is mediated solely by selective estrogen receptor-alpha agonists and is abolished by estrogen deprivation. *J Pharmacol. Exp. Ther.*, 313(3),1203-8. (2005)
27. BOWERS, J.L., TYULMENKOV, V.V., JERNIGAN, S.C., KLINGE, C.M.: Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta, *Endocrinology*, 141, 3657-3667. (2000)
28. BRADAMANTE, S., BARENGHI, L., PICCININI, F., BERTELLI, A.A., DE JONGE, R., BEEMSTER, P., DE JONG, J.W.: Resveratrol provides late-phase cardioprotection by means of a nitric oxide- and adenosine-mediated mechanism, *Eur. J. Pharmacol.*, 465,115-123. (2003)
29. BRADAMANTE, S., BARENGHI, L., VILLA, A.: Cardiovascular protective effects of resveratrol, *Cardiovasc. Drug Rev.*, 22(3),169-188. (2004)
30. BRANDES, R.P., KREUZER, J.: Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation, *Cardiovasc. Res.*, 65,16-27. (2005)

31. BUCCI, M., RAVIEZZO, F., CICALO, C., PINTO, A., CIRINO, G.: 17 β -oestradiol induced vasorelaxation in vitro is mediated by eNOS through hsp and akt/pkb dependent mechanism. *Br. J. Pharmacol.*, 135;1695-1700. (2002)
32. BULUÇ, M., DEMİREL-YILMAZ, E.: Resveratrol decreases calcium sensitivity of vascular smooth muscle and enhances cytosolic calcium increase in endothelium, *Vascular Pharmacol.*, 44, 231-237. (2006)
33. CAULIN-GLASER, T., GARCIA-CARDENA, G., SARREL, P., SESSA, W.C., BENDER, J.R.: 17- β -estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca⁺⁺ mobilization, *Circ. Res.*, 81, 885-892. (1997)
34. CHAN, M.MY., MATTIACCI, JA., HWANG, H.S., SHAH, A., FONG, D.: Synergy between ethanol and grape polphenols, quercetin, and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway, *Biochem. Pharmacol.*, 60,1539-1548. (2000)
35. CHAN, H.Y., YAO, X., TSANG, S.Y., CHAN, F.L., LAU, C.W., HUANG, Y.: Different role of endothelium/nitric oxide in 17beta-estradiol- and progesterone-induced relaxation in rat arteries, *Life Sci.*, 69(14), 1609-17. (2001)

36. CHANDER, V., TIRKEY, N., CHOPRA, K.: Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin protects against cyclosporin-induced nephrotoxicity through nitric oxide dependent mechanism, *Toxicology*, 210,55-64. (2005)
37. CHANVITAYAPONGS, S., DRACZYNSKA-LUSIAK, B., SUN, A.Y.:
Amelioration of oxidative stress by antioxidants and resveratrol in PC12 cells, *Neuroreport.*, 8(6), 1499-502. (1997)
38. CHEN, C.K., PACE-ASCIAK, C.R.: Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta, *Gen. Pharmacol.*, 27, 363-366. (1996)
39. CHEN, Z., YUHANNA, I.S., GALCHEVA-GARGOVA, Z.I., KARAS, R.H., MENDELSON, M.E., SHAUL, P.W.: Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen, *J. Clin. Invest.*, 103,401-406. (1999)
40. CISHEK, M.B., GALLOWAY, M.T., KARIM, M., GERMAN, J.B., KAPPAGODA, C.T.: Effect of red wine on endothelium-dependent relaxation in rabbits, *Clin. Sci.*, 93(6), 507-11. (1997)
41. COLLINS, P., ROSANDO, G.M., SARRELL, P.M., ULRICH, L., ADAMOPOULOS, S., BEALE, C. M., MCNEILL, J.G., POOLE WILSON, P.A.: 17- β -estradiol attenuates acetylcholine-induced coronary arterial

constriction in women but not men with coronary heart disease, *Circulation*, 92, 24-30. (1995)

42. COS, P., DE BRUYNE, T., APERS, S., VANDEN BERGHE, D., PIETERS, L., VLIETINCK, A.J.: Phytoestrogens: recent developments. *Planta Med.*, 69(7),589-99. (2003)

43. COSKUN, B., SOYLEMEZ, S., PARLAR, A.I., ULUS, A.T., KATIRCIOĞLU, S.F., AKAR, F.: Effect of resveratrol on nitrat tolerance in isolated human internal mamary artery, *J. Cardiovasc. Pharrmacol.*, 47, 437-445. (2006)

44. COUSE, J.F., HEWITT, S.C., BUNCH, D.O., SAR, M., WALKER, V.R, DAVIS, B.J., KORACH KS: Postnatal sexreversal of the ovaries in mice lacking estrojen receptors α and β , *Science*, 286, 2328-2331. (1999)

45. CREWS, J.K., KHALIL, R.A.: Antagonistic effects of 17 beta-estradiol, progesterone, and testosterone on Ca^{2+} entry mechanisms of coronary vasoconstriction, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19,1034-1040. (1999)

46. CRIQUI, M.H., RINGEL, B.L.: Does diet or alcohol explain the French paradox?, *Lancet*, 344, 1719-1723. (1994)

47. CSOMOS, E., SARKADI-SIMON, L.: Determination of biologically active compounds in Hungarian wines. *Periodica. Poly. Technica. Ser. Chem. Eng.*, 46(1-2), 73-81. (2002)
48. DARBLADE, B., PENDARIES, C., KRUST, A., DUPONT, S., FOUQUE, M.J., RAMI, J., CHAMBON, P., BAYARD, F., ARNAL, J.F.: Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-,but not beta-, estrogen receptor, *Circ. Res.*, 90(4),413-9. (2002)
49. DAS, D.K., SATO, M., RAY, P.S., MAULIK, G., ENGELMAN, R.M., BERTELLI, A.A., BERTELLI A.: Cardioprotection of red wine; role of polyphenolic antioxidants, *Drugs. Exp. Clin. Res.*, 25, 115-120. (1999)
50. DAS, S., ALAGAPPAN, V.K.T., BAGCHI, D., SHARMA, H.S., MAULIK, N., DAS, D.K.: Coordinated induction of iNOS–VEGF–KDR–eNOS after resveratrol consumption. A potential mechanism for resveratrol preconditioning of the heart, *Vasc. Pharmacol.*, 42, 281 – 289. (2005)
51. DENIS, L., MORTON, M.S., GRIFFITHS, K.: Diet and its preventive role in prostatic disease, *Eur Urol.*, 35,377-387. (1999)

52. DOGAN, A.E.: Türk şaraplarındaki resveratrol miktarının HPLC ile Tayin Edilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı 2005.
53. EL-MOWAFY, A.M., WHITE, R.E.: Resveratrol inhibits MAPK activity and nuclear translocation in coronary arterial smooth muscle: reversal of endothelin-1 stimulatory effects, FEBS Lett, 451, 63-67. (1999)
54. EL-MOWAFY, A.M.: Resveratrol activates membrane-bound guanylyl cyclase in coronary arterial smooth muscle: a novel signaling mechanism in support of coronary protection, Biochem. Biophys. Res. Commun., 291,1218-1224. (2002)
55. ENG, E.T, WILLIAMS, D., MANDAVA, U., KIRMA, N., TEKMAL, R.R., CHEN, S.: Supression of aromatase (estrojen synthetase) by red wine phytochemicals, Breast Cancer Res. Treat., 67, 133-146. (2001)
56. FARACI, F.M., LAMPING, K.G., MODRICK, M.L., RYAN, M.J., SIGMUND, C.D., DIDION, S.P.: Cerebral vascular effects of angiotensin II: new insights from genetic models, J. Cereb. Blood Flow Metab., 26(4), 449-55. (2006)
57. FARHAT, M.Y., LAVIGNE, M.C., RAMWELL, P.W.: The vascular protective effects of estrogen, FASEB J., 10(5),615-24. (1996)

58. FITZPATRICK, D.F., HIRSCHFIELD, S.L., COFFEY, R.G.: Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products, *Am J Physiol.*, 265,H774-8 (1993).
59. FLESCH, M., SCHWARZ, A., BOHM, M: Effects of red and white wine on endothelium-dependent vasorelaxation of rat aorta and human coronary arteries. *Am J Physiol.* 1998 Oct;275(4 Pt 2):H1183-90.
60. FLOREANI, M., NAPOLI, E., QUINTIERI, L., PALATINI, P.: Oral administration of trans-resveratrol to guinea pigs increases cardiac DT-diaphorase and catalase activities, and protects isolated atria from menadione toxicity, *Life Sci.*, 72, 2741-50. (2003)
61. FLORIAN, M., LU, Y., ANGLE, M., MAGDER, S.: Estrogen induced changes in Akt dependent activation of endothelial nitric oxide synthase and vasodilation, *Steroids*, 69,637-645. (2004)
62. FRANKEL, E.N., KANNER, J., GERMAN, J.B., PARKS, E., KINSELLA, J.E.: Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine, *Lancet*, 341,454-457. (1993a)
63. FRANKEL, E.N., WATERHOUSE, A.L., KINSELLA, J.E.: Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol, *Lancet*, 341, 1103-1104. (1993b)

64. FREAY, A.D., CURTIS, S.W., KORACH, K.S., RUBANYI, G.M.: Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by estrogen in depolarized rat and mouse aorta: role of nuclear estrogen receptor and Ca^{2+} uptake, *Circ. Res.*, 81,242-248. (1997)
65. FREMONT, L.: Biological effects of resveratrol, *Life Sci.*, 66, 663-73. (2000)
66. FURCHGOTT, R.F., ZAWADZKI, J.V.:The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature*, 288(5789), 373-6. (1980)
67. FURCHGOTT, R.F.: The requirement for endothelial cells in the relaxation of arteries by acetylcholine and some other vasodilators, *Trends Pharmaceut Sci.*, 7, 173-176. (1981)
68. GARCIA-VILLALON, A.L., BUCHHOLZ, J.N., KRAUSE, D.N., DUCKLES, S.P.: Sex differences in the effects of 17 beta-estradiol on vascular adrenergic responses, *Eur. J. Pharmacol.*, 314(3), 339-45. (1996)
69. GEHM, B.D., MCANDREWS, J.M., CHIEN, P.Y.: Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 14138-14143. (1997)

70. GILLIGAN, D.M., QUYYUMI, A.A., CANNON, R.O.: III. Effects of physiological levels of estrogen on coronary vasomotor function in postmenopausal women, *Circulation*, 89,2545-2551. (1994)
71. GIOVANNINI, L., MIGLIORI, M., LONGONI, B.M., DAS, D.K., BERTELLI, A.A., PANICHI, V., FILIPPI, C., BERTELLI, A.: Resveratrol, a polyphenol found in wine, reduces ischemia reperfusion injury in rat kidneys, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 37(3),262-70. (2001)
72. GLASER, T.C., GARCIA-CARDENA, G., SARREL, P., SESSA, W.C., BENDER, J.R.: 17β -estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca^{2+} mobilization, *Circ. Res.*, 82, 885-892. (1997)
73. GOLDBERG, D.M., YAN, J., SOLEAS, G.J.: Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects, *Clin Biochem.*, 36, 79-87. (2003)
74. GONG, M., WILSON, M., KELLY, T., SU, W., DRESSMAN, J., KINCER, J., MATVEEV, S.V., GUO, L., GUERIN, T., LI, X.A., ZHU, W., UITTENBOGAARD, A., SMART, E.J.: HDL-associated estradiol stimulates endothelial NO synthase and vasodilation in an SR-BI-dependent manner, *J. Clin. Invest.*, 111,1579–1587. (2003)

75. GONZALES, R.J., WALKER, B.R., KANAGY, N.L.: 17β -estradiol increases nitric oxide-dependent dilation in rat pulmonary arteries and thoracic aorta, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 280, L555-L564. (2001)
76. GRAGASIN, F.S., XU, Y., ARENAS, I.A., KAINTH, N., DAVIDGE, S.T.: Estrogen reduces angiotensin II-induced nitric oxide synthase and NAD(P)H oxidase expression in endothelial cells, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 23, 38-44. (2003)
77. GREEN, L.C., WAGNER, D.A., GLOGOWSKI, J., SKIPPER, P.L., WISHNOK, J.S., Analysis of nitrate, nitrite, and $[^{15}\text{N}]$ nitrate in biological fluids, *Anal. Biochem.*, 126, 131-138. (1982)
78. GRIENDLING, K.K., MINIERI, C.A., OLLERENSHAW, J.D., ALEXANDER, R.W.: Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells, *Circ. Res.*, 74, 1141-1148. (1994)
79. GRONBAEK, M., SORENSEN, T.I.: Alcohol consumption and risk of coronary heart disease. Studies suggest that wine has additional effect to that of ethanol, *BMJ.*, 313 (7053), 365. (1996)

80. GRUBER, D.M., HUBER, J.C.: Tissue specificity: the clinical importance of steroid metabolites in hormone replacement therapy, *Maturitas*, 37, 151-157. (2001)
81. GRUBER, C.J., TSCHUGGEL, W., SCHNEEBERGER, C., HUBER, J.,C.: Production and actions of estrogens, *N. Eng. J. Med.*, 346(5),340-352. (2002) Rev.
82. GU, J., WANG, C.Q., FAN, H.H., DING, H.Y., XIE, X.L., XU, Y.M., WANG, B.Y., HUANG, D.J.: Effects of resveratrol on endothelial progenitor cells and their contributions to reendothelialization in intima-injured rats, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 47,711–721. (2006)
83. GUZIK, T.J., MUSSA, S., GASTALDI, D.: Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase, *Circulation*, 105,1656-1662. (2002)
84. HAMILTON, C.A., BROSNAN, M.J., AL-BENNA, S., BERG, G., DOMINICZAK, A.F.: NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels, *Hypertension*, 40,755-762. (2002)

85. HANASAKI, Y., OGAWA, S., FUKUI, S.: The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* 16, 845-850. (1994)
86. HATTORI, R., OTANI, H., MAULIK, N., DAS, D.K.: Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide, *Am. J. Physiol.*, 282, H1988-H1995. (2002)
87. HAYASHI, T., FUKUTO, J.M., IGNARRO, L.J., CHAUDHURI, G.: Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater than female rabbits than in male rabbits; implications for atherosclerosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 89(23), 11259-11263. (1992)
88. HEGSTED, D.M., AUSMAN, L.M.: Diet, alcohol and coronary heart disease in men, *J. Nutr.*, 60,197-198. (1988)
89. HEINRICH, M., LEONTL, M., NEBEL, S., PESCHEL, W.: "Localfood-nutraceuticals". An example of a multidisiplinary research Project on local knowledge, *J. Physiol. Pharmacol.*, 56, 5-22. (2005)
90. HILLIER, S.G., WHITECLAW, P.F., SYMTH, C.D.: Follicular oestrogen synthesis: the "two-cell, two gonadotrophin" model revisted, *Mol. Cell Endocrinol.* 100, 51-54. (1994)

91. HISHIKAWA, K., NAKAKI, T., MARUMO, T., SUZUKI, H., KATO, R., SARUTA, T.: Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells, *FEBS Letters*, 360, 291-293. (1995)
92. HSIEH, T.C., JUAN, G., DARZYNKIEWICZ, Z., WU, J.M.: Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and p21(WAF1/CIP1), and suppresses cultured bovine pulmonary artery endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G2, *Cancer Res.*, 59(11), 2596-601. (1999)
93. HUANG, A., SUN, D., KOLLER, A., KALEY, G.A.: Gender difference in flow-induced dilation and regulation of shear stress; role of estrogen and nitric oxide. *Am. J. Physiol.* 275, R1571-1577. (1998)
94. HUANG, A., SUN, D., KOLLER, A., KALEY, G.B.: 17- β -estradiol restores endothelial nitric oxide release to shear stress in arterioles of male hypertensive rats, *Circulation*, 101, 94-100. (2000)
95. HUNG, L.M., SU, M.J., CHU, W.K., CHIAO, C.W., CHAN, W.F., CHEN, J.K.: The protective effect of resveratrols on ischaemia-reperfusion injuries of rat hearts is correlated with antioxidant efficacy, *Br. J Pharmacol.* 135, 1627-1633. (2002)

96. HUNG, L.M., SU, M.J., CHEN, J.K.: Resveratrol protects myocardial ischemia-reperfusion injury through both NO-dependent and NO-independent mechanisms, *Free Radic. Biol. Med.*, 36(6),774-781. (2004)
97. IGNARRO, L.J., CIRINO, G., CASINI, A., NAPOLI, C.: Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 34(6), 879-86. (1999)
98. IMAMURA, G., BERTELLI, A.A., BERTELLI, A., OTANI, H., MAULIK, N., DAS, D.K.: Pharmacological preconditioning with resveratrol: an insight with iNOS knockout mice, *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol.*, 282(6),H1996-2003. (2002)
99. JAGER, U., NGUYEN-DUONG, H.: Relaxant effect of trans-resveratrol on isolated porcine coronary arteries, *Arzneimittelforschung*, 49,207-211. (1999)
100. JANG, M., CAI, L., UDEANI, G.O., SLOWING, K. W., THOMAS, C. F., BEECHER, C.W., FONG, H.H., FARNSWORTH, N.R., KINGHORN, A.D., MEHTA, R.G., MOON, R.C., PEZZUTO, J.M.: Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes, *Science*, 275, 218-220. (1997)

101. JANNIN, B., MENZEL, M., BERLOT, J.P., DELMAS, D.: Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, cellular targets;plasmatic protein binding and cell uptake, *Biochem. Pharmacol.*, 68, 1113-1118. (2004)
102. JEANDET, P., BESSIS, R., GAUTHERON, B.: The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages, *Am. J. Enol. Vitic.*, 42, 41-46. (1991)
103. JIANG, C., SARREL, P.M., LINDSAY, B.C., POOLE-WILLIAMS, P.A., COLLINS, P.: Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 β -estradiol in vitro, *Br. J. Pharmacol.*, 104,1033-1037. (1991)
104. JIANG, C., SAREL, P.M., POOLE-WILSON, P.A., COLLINS, P.: Acute effect of 17 β -estradiol on rabbit coronary artery contractile responses to endothelin-1, *Am. J. Physiol.*, 263, H271-H275. (1992)
105. JUAN, M.E., BUENAFUENTE, J., CASALS, I., PLANAS, J.M.: Plasmatic levels of trans-resveratrol in rats, *Food Res. Int.*, 35,195-199. (2002a)
106. JUAN, M.E., VINARDELL, M.P., PLANAS, J.M.: The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful, *J. Nutr.*, 132, 257-260. (2002b)

107. KALDAS, M.I., WALLE, U.K., WALLE, T.: Resveratrol transport and metabolism by human intestinal Caco-2 cells, *J. Pharm. Pharmacol.*, 55(3),307-12. (2003)
108. KAPLAN, S., BISLERI, G., MORGAN, J.A., CHEEMA, F.H., OZ, M.C.: Resveratrol, a natural red wine polyphenol, reduces ischemia-reperfusion-induced spinal cord injury, *Ann. Thorac. Surg.*, 80, 2242-2249. (2005)
109. KATO, S., ENDOH, H., MASUHIRO Y.: Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase, *Science*, 270,1491-1494. (1995)
110. KAUSER, K., RUBANYI, G.M.: Gender difference in bioassayable endothelium-derived nitric oxide from isolated rat aortae, *Am J Physiol*, H2311-2317. (1994)
111. KEANEY, J.F., SHWAERY, G.T., XU, A., NICOLosi, R.J., LOSCALZO, J., FOXALL, T.L., VITA, J.A.:17 beta-estradiol preserves endothelial vasodilator function and limits low-density lipoprotein oxidation in hypercholesterolemic swine, *Circulation*, 89(5), 2251-2259. (1994)

112. KERRY, N.L., ABBEY, M.: Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro, *Atherosclerosis*, 135, 93-102. (1997)
113. KUHNLE, G., SPENCER, J.P.E., CHOWRIMOOTO, G., SCHROETER, H., DEBNAM, E.S., SRAL, S.K.S., RICE-EVANS, C., HAHN, U. Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 272, 212-217. (2000)
114. KIM, H.P., LEE, J.Y., JEONG, J.K., BAE, S.W., LEE, H.K., JO, I.: Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor α localized in caveolae, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 263, 257-262, (1999)
115. KIMURA, Y., OHMINAMI, H., OKUDA, K., BABA, M., KOZAWA, M., ARICHI, S.: Effects of stilbene components of roots of *Polygonum* ssp. on liver injury in peroxidized oil-fed rats, *Planta Med.*, 49, 51-54. (1983)
116. KIMURA, Y., OKUDA, H., ARICHI, S.: Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes, *Biochim. Biophys. Acta.*, 834(2), 275-278. (1985)

117. KIZILTEPE, U., TURAN, N.N., HAN, U., ULUS, A.T., AKAR, F.: Resveratrol, a red wine polyphenol, protects spinal cord from ischemia-reperfusion injury, J. Vasc. Surg., 40(1), 138-45. (2004)
118. KLINGE, C.M., RISSINGER, K.E., WATTS, M.B., BECK, V., EDER, R., JUNGBAUER, A.: Estrogenic activity in white and red wine extracts, J. Agric. Food Chem., 52, 1850-1857. (2003)
119. KLINGE, C.M., BLANKENSHIP, K.A., RISSINGER, K.E., BHATNAGAR, S., NOISIN, E.L., SUMANASEKERA, W.K., ZHAO, L., BERY, D.M., KEYNTON, R.S.: Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptors α and β in endothelial cells, J. Biol. Chem., 280(9), 7460-7468. (2005)
120. KLURFELD, D.M., KRITCHEVSKY, D.M.: Differential effects of alcoholic beverages on experimental atherosclerosis in rabbits, Exp. Mol. Pathol., 34, 62-71. (1981)
121. KOH, K.K.: Effects of estrogen on the vascular wall: vasomotor function and inflammation, Cardiovasc. Res., 55(4), 714-26. (2002)

122. KUIPER, G.G.J.M., GUSTAFSSON, J.A.: The novel oestrogen receptor β -subtype: potential role in the cell and promoter specific actions of estrogens and anti-estrogens, FEBS Lett., 410, 87-90. (1997)
123. LABRIE, F., LUU-THE, V., LIN, S-X., LABRIE, C., SIMARD, J., BRETON, R., BELANGER, A.: The key role of 17β -hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology, Steroids, 62, 148-158. (1997)
124. LAMUELA-RAVENTOS, R.M., WATERHOUSE, A.L.: Occurrence of resveratrol in selected California wines by a new HPLC method, J. Agric. Food. Chem. 41, 521-523. (1993)
125. LAMUELA-RAVENTOS, R.M., ROMERO-PEREZ, A.I., WATERHOUSE, A.L., TORRE-BORONAT, M.C.: Direct HPLC analysis of cis- and trans-Resveratrol and Piceid isomers in Spanish red Vitis vinifera wines, J. Agric. Food Chem, 43, 281-283. (1995)
126. LANGCAKE, P., PRYCE, R.J.: The production of resveratrol by Vitis vinifera and other members of the vitaceae as a response to infection or injury, Physiol. Plant Pathol., 9, 77-86. (1976)

127. LANTE, A., CRAPSI, A., LAMOLINO, G., SPETOLLI, P.: Chemical parameters, biologically active polyphenols and sensory characteristics of some Italian organic wines, *J. Wine Res.*, 15(3),203-209. (2004)
128. LE TRAN, Y., FUNG, A., FORSTER, C.: Role of gender and vascular endothelium in rat aorta response to 17 β -estradiol, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 75,1393-1397. (1997)
129. LEIKERT, J.F., RATHIEL, T.R., WOHLFART, P., CHEYNIER, V., VOLLMAR, A.M., DIRSCH, V.M.:Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation*, 106(13), 1614-7. (2002)
130. LEE, H.P., GOURLEY, L., DUFFY, S.W.: Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore, *Lancet*, 337,1197-2000. (1991)
131. LEVI, F., PASCHE, C., LUCCHINI, F., GHIDONI, R., FERRARONI, M., LA VECCHIA, C.: Resveratrol and breast cancer risk, *Eur. J. Cancer Prev.*, 14(2), 139-42. (2005)

132. LI, H. F., CHEN, S. A., WU, S.N.: Evidence for the stimulatory effect of resveratrol on Ca^{2+} -activated K^{+} current in vascular endothelial cells, *Cardiovasc. Res.*, 45(4),1035-1045. (2000)

133. LI, H.F., TIAN, Z.F., QUI, X.Q., WU, J.X., ZHANG, P., JIA, Z.J.: A study of mechanisms involved in vasodilation induced by resveratrol in isolated porcine coronary artery, *Physiol. Res.*, 55,365-372. (2006)

134. LI, X.A., TITLOW, W.B., JACKSON, B.A., GILTIAY, N., NIKOLOVA-KARAKASHIAN, M., UITTENBOGAARD, A, SMART, E.J.: High-density lipoprotein binding to scavenger receptor B, type 1 activates endothelial nitric oxide synthase in a ceramide-dependent manner, *J. Biol. Chem.*, 277, 11058-11063. (2002)

135. MA, L., ROBINSON, C.P., THADANI, U., PATTERSON, E.: Effect of 17β -estradiol in the rabbit: Endothelium-dependent and independent mechanism of vascular relaxation, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 30(1),130-5. (1997)

136. MARIER, J.F., VACHON, P., GRITSAS, A., ZHANG, J., MOREAU, J.P., DUCHARME, M.P.: Metabolism and disposition of resveratrol in rats; Extent of absorption, glucuronidation and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model, *JPET.*, 302, 369-373. (2002)

137. MARTINEZ, J., MORENO, J.J.: Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production, *Biochem. Pharmacol.*, 59(7), 865-70. (2000)
138. MATTIVI F.: Solid phase extraction of trans-resveratrol from wines for HPLC analysis, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 196, 552-525. (1993)
139. MCCULLOCH, A.I., RANDALL, M.D.: Sex differences in the relative contributions of nitric oxide and EDHF to agonist-stimulated endothelium dependent relaxations in the rat isolated mesenteric arterial bed, *Br. J. Pharmacol.*, 123(8),1700-1706. (1998)
140. MCNEILL, A.M., DUCKLES, S.P, KRAUSE, D.N.: Relaxant effects of 17 β -estradiol in the rat tail artery are greater in females than males. *Eur. J. Pharmacol.*, 308, 305-309. (1996)
141. MENDELSON, M.E.: Protective effects of estrogen on the cardiovascular system, *Am J Cardiol.*, 20(89),12E-17E, Review. (2002)
142. MENDELSON, M.E., KARAS, R.H.: Estrogen and the blood vessel wall, *Curr. Opin. Cardiol.*, 9(5), 619-26. (1994)

143. MENG, X., MALIAKAL, P., LU, H., LEE, M.J., YANG, C.S.: Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice, *J. Agric. Food Chem.*, 52(4), 935-42. (2004)

144. MGBONYEBI, O.P., RUSSO, J., RUSSO, I.H.: Antiproliferative effect of synthetic resveratrol on human breast epithelial cells, *Int. J. Oncol.*, 12(4), 865-869. (1998)

145. MIURA, D., MIURA, Y., YAGASAKI, K.: Hypolipidemic action of dietary resveratrol a phytoalexin in grapes and red wine, in hepatoma-bearing rats, *Life Sci.*, 73,1393-1400. (2003)

146. MIZUTANI, K., IKEDA, K., KAWAI, Y., YAMORI, Y.: Protective effect of resveratrol on oxidative damage in male and female stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 28,55-59. (2001)

147. MOLLNAU, H., WENDT, M., SZOES, K.: Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signalling, *Circ Res*, 90,E58-65, (2002)

148. MONCADA, S., PALMER, R.M., HIGGS, E.A.: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology, *Pharmacol. Rev.*, 43(2),109-42.(1991)

149. MUGGE, A., RIEDEL, M., BARTON, M., KUHN, M., LICHTLEN, PR.: Endothelium independent relaxation of human coronary arteries by 17 β -estradiol in vitro, *Cardiovasc. Res.*, 27,1939-1942. (1993)
150. NADERALI, E.K., DOYLE, P.J., WILLIAMS, G.: Resveratrol induces vasorelaxation of mesenteric and uterine arteries from female guinea-pigs, *Clin. Sci.*, 98, 537-543. (2000)
151. NADERALI, E.K., SMITH, S.L., DOYLE, P.J., WILLIAMS, G.: The mechanism of resveratrol-induced vasorelaxation differs in the mesenteric resistance arteries of lean and obese rats, *Clin. Sci.*,100, 55-60. (2001)
152. NANJI, A.A., FRENCH, S.W.: Alcoholic beverages and coronary heart disease. Wine, beer or both?, *Int. J. Cardiol.*, 8,487-489. (1985)
153. NECHMAD, A., MERIN, G., SCHWALB, H., SHIMON, D.V., BORMON, J.B., MAILGALTER, E., MOSSERI, M.: Estrogen induces nitric oxide-mediated vasodilation of human mammary arteries in vitro, *Nitric oxide*, 2(6),460-466. (1998)
154. NICKENIG, G., STREHLOW, K., WASSMANN, S., BAUMER, A.T., ALBORY, K., SAUER, H., BOHM, M.: Differential effects of estrogen and

progesterone on AT(1) receptor gene expression in vascular smooth muscle cells, *Circulation*, 102(15),1828-33. (2000)

155. NIJVELDT, R.B., VAN NOOD, E., VAN HOORN, D.E.C., BOELEN, P.G., VAN NORREN, K., VAN LEEUWEN, P.A.M.: Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *Am. J. Clin. Nutr.*, 74,418-425. (2001)
156. NOFER, J.R., VAN DER, G.M., TOLLE, M., WOLINSKA, I., VON WNUCK, L.K., BABA, H.A., TIETGE, U.J., GODECKE, A., ISHII, I., KLEUSER, B., SCHÄFERS, M., FOBKER, M., ZIDEK, W., ASSMANN, G., CHUN, J., LEVKAU, B.: HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3, *J. Clin. Invest.*, 113, 569–581. (2004)
157. NOVAKOVIC, A., GOJKOVIC-BUKARICA, L., KANJUH, V., HEINLE, H.: Potassium channels-mediated vasorelaxation of rat aorta induced by resveratrol, *Basic Clin. Pharm. Toxicol.*, 99,360-364. (2006a)
158. NOVAKOVIC, A., GOJKOVIC-BUKARICA, L., PERIC, N., NEZIC, D., DJUKANOVIC, B., MARKOVIC-LIPKOVSKI, J., HEINLE, H.: The mechanism of endothelium-independent relaxation induced by the wine polyphenol resveratrol in human internal mammary artery, *J. Pharmacol. Sci.*, 101,85-90. (2006b)

159. ORSHAL, J.M., KHALIL, R.A.: Gender, sex hormones, and vascular tone, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 286(2):R233-49. (2004)

160. ORALLO, F., ALVAREZ, E., CAMINA, M, LEIRO, J.M., GOMEZ, E, FERNANDEZ, P.: The possible implication of trans-resveratrol in the cardioprotective effects of longterm moderate wine consumption, *Mol. Pharmacol.*, 61, 294–302. (2002)

161. ORALLO F.: Comparative studies of the antioxidant effects of *cis*- and *trans*-resveratrol, *Curr. Med. Chem.*, 13, 87-98. (2006)

162. PACE-ASCIAC, C.R., HAHN, S., DIAMANDIS, E.P., SOLEAS, G., GOLDBERG, D.M.: The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease, *Clin. Chim. Acta.*, 235(2), 207-19. (1995)

163. PACE-ASCIAC, C.R., ROUNOVA, O., HAHN, S.E., DIAMANDIS, E.P., GOLDBERG, D.M.: Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy humansubjects, *Clin. Chim. Acta.*, 246(1-2), 163-82. (1996)

164. PADILLA, E, RUIZ, E, REDONDO, S., GORDILLO-MOSCOSO, A., SLOWING, K., TEJERINA, T.: Relationship between vasodilation capacity and phenolic content of Spanish wines, *Eur. J. Pharmacol.*, 517,84-91. (2005)

165. PAECH, K., WEBB, P., KUIPER, G.G.J.M., NILSSON, S., GUSTAFSSON, J.A., KUSHNER, P.J., SCANLON, T.S.: Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites, *Science*, 277,1508-1510. (1997)

166. PAK, K.J., GEARY, G.G., DUCKLES, S.P., KRAUSE, D.N.: Male-female differences in the relative contribution of endothelial vasodilators released by rat tail artery, *Life Sci*, 71,1633-1642. (2002)

167. PATZAK, A., MROWKA R., STORCH E., HOCHER, B., PERSSON, PB.: Interaction of Angiotensin II and Nitric Oxide in isolated perfused afferent arterioles of mice, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 12,1122–1127. (2001)

168. PERVAIZ, S.: Resveratrol: from grapevines to mamalian biology, *FASEB J*, 17,1975-1985. (2003)

169. PETTERSON, K., GRANDIEN, K., KUIPER, G.G., GUSTAFFSON J.A.: Mouse estrogen receptor β forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor α , *Mol. Endocrinol*, 11,1486-1496. (1997)

170. PINNA, C., CIGNARELLA, A., ZANARDO, R., BOLEGO, C., PUGLISI, L.: Gender differences and antioxidant treatment affect aortic reactivity in short-term diabetic rats, *Eur. J. Pharmacol.*, 431,71-79. (2001)
171. PIPER, K.G., HIGGINS, G.: Estimation of trace metals in biological material by atomic absorption spectrophotometry, *Proc. Ass. Clin. Biochem.*, 4,190-208. (1967)
172. POTTER, S.M., BAUM, J.A., TENG, H., STILLMAN, R.J., SHAY, N.F., ERDMAN, J.W.: Soy protein and isoflavones; their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women, *Am. J. Clin. Nutr.*, 68,1375S-1379S. (1998)
173. RAHIMIAN, R., CHAN, L., GOEL, A., POBURKO, D., VAN BREEMEN, C.: Estrogen modulation of endothelium-derived relaxing factors by human endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 322,373-379. (2004)
174. RAKICI, O., KIZILTEPE, U., COSKUN, B., ASLAMACI, S., AKAR, F.: Effects of resveratrol on vascular tone and endothelial function of human saphenous vein and internal mammary artery, *Int. J. Cardiol.*, 105,209-15. (2005)

175. RATOLA, N., FARIA-LUIS, J., ALVES A.: Analysis and quantification of trans-resveratrol in wines from Alentejo Region (Portugal), Food Technol. Biotechnol. 42(2),125-130. (2004)
176. RAY, P.S., MAULIK, G., CORDIS, G.A., BERTELLI, A.A., BERTELLI, A., DAS, D.K.: The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia-reperfusion injury, Free Radic. Biol. Med., 27,160-169. (1999)
177. RECKELHOFF, J.F., HENNINGTON, B.S., MOORE, A.G., BLANCHARD, E.J., CAMERON, J.: Gender differences in the renal nitric oxide (NO) system: dissociation between expression of endothelial NO synthase and renal hemodynamic response to NO synthase inhibition, Am. J. Hypertens., 11, 97-104. (1998)
178. RENAUD, S., DE LORGERIL, M: Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease, Lancet, 339,1523-1526. (1992)
179. RICE-EVANS, C.A., MILLER, J., PAGANGA, G.: Antioxidant properties of phenolic compounds, Trends Plant Sci., 2,152-159. (1997)
180. RIMM, E.B., KLATSKY, A., GROBBEE, D., STAMPFER, M.J.: Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heartdisease: is the effect due to beer, wine, or spirits, Br. Med J., 312,731-736. (1996)

181. ROJAS, A., FIGUEROA, H., RE, L., MORALES, M.A.: Oxidative stres at the vascular wall, Mechanistic and Pharmacological aspects, Arch. Med. Res., 37,436-448. (2006)
182. ROSELLI, M., IMTHURN, B., KELLER, P.J., JACSON, E.K., DUBEY, P.K.: Circulating nitric oxide (nitrite/nitrate) levels in postmenopausal women substituted with 17- β -estradiol and norethisterone acetate: a two year follow-up study, Hypertension, 25, 848-853. (1995)
183. ROYSHOWDHURY, S., WOLF, G., KEILHOFF, D., BAGCHI, D., HORN, T.: Protection of primary glial cells by grape seed proanthocyanidin extract against nitrosative/oxidative stres, Nitric Oxide, 5, 137-149. (2001)
184. RUDOLF, J.L., RESURRECCION, A.,V.,A., SAALIA, F.K., PHILLIPS, R.D.: Development of a reverse-phase-performance liquid chromatography method for analyzing trans-resveratrol in peanut kernels, Food Chem., 89, 623-638. (2005).
185. RUEF, J., MOSER, M., KUBLER, W., BODE, C.: Induction of endothelin-1 expression by oxidative stres in vascular smooth muscle cells, Cardiovasc. Pathol., 10, 311-315. (2001)

186. RUSSELL, K.S., HAYNES, M.P., SINHA, D., CELERISME, E., BENDER, J.R.: Estrogen stimulates heat shock protein 90 binding to endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells. Effects on calcium sensitivity and NO release, *J. Biol. Chem.*, 275, 5026-5030. (2000a)

187. RUSSELL, K.S., HAYNES, M.P., SINHA, D., CELERISME, E., BENDER, J.R.: Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling, *PNAC USA*, 97,5930-5935. (2000b)

188. SAITO, S., ARAS, R.S., LOU, H., RAMWELL, P.W., FOEGH, M.L.: Effects of estrogen on nitric oxide synthase expression in rat aorta allograft and smooth muscle cells, *J. Heart Lung Transplant.* 18,937-945. (1999)

189. SALOM, J.B., BURGUETE, M.C., PEREZ-ASENSIO, F.J., CENTENO, J.M., TORREGROSA, G., ALBORCH, E.: Acute relaxant effects of 17 β -estradiol through non-genomic mechanisms in rabbit carotid artery, *Steroids*, 67,339-346. (2002)

190. SANCHEZ, A., GOMEZ, M.J., DORANTES, A.L., ROSALES, J.L., PASTELIN, G., DIAZ, V., POSADAS, F., ESCALANTE, B.: The effect of ovariectomy on depressed contractions to phenylephrine and KCl and increased

relaxation to acetylcholine in isolated aortic rings of female compared to male rabbits, Br. J. Pharmacol., 118(8), 2017-2022. (1996)

191. SATO, M., MAULIK, N., DAS, D.K.: Cardioprotection with alcohol: role of both alcohol and polyphenolic antioxidants, Ann. N. Y. Acad. Sci., 957,122-35. (2002)
192. SELLES, J., POLINI, N., ALVAREZ, C., MASSHEIMER, V.: Progesterone and 17 β -estradiol acutely stimulate nitric oxide synthase activity in rat aorta and inhibit platelet aggregation, Life Sci, 69,815-827. (2001)
193. SESSA, W.C.: Regulation of endothelium derived nitric oxide in health and disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 100(1),15-18. (2005)
194. SHAW, L., TAGGART, M., AUSTIN, C.C.: Effects of the oestrous cycle and gender on acute vasodilatory responses of isolated pressurized rat mesenteric arteries to 17 β -estradiol, Br. J. Pharmacol., 132,1055-1062. (2001)
195. SHAW, C.A., TAYLOR, E.L., MEGSON, I.L., ROSSI, A.G.: Nitric oxide and the resolution of inflammation: implications for atherosclerosis, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 100(1),67-71. (2005)

196. SHAUL, P.W., MINEO, C.:HDL action on the vascular wall: is the answer NO?, *J. Clin. Invest.*, 113(4), 509-13. (2004)
197. SIEMANN, E.H., CREASY, L.L.:Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine, *Am. J. Enol. Vitic.*, 43, 49-52. (1992)
198. SIMONCINI, T., HAFEZI-MOGHADAM, A., BRAZIL, D.P., CHIN, W.W., LIAO JK.: Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of fosfatidylinositol-OH kinase, *Nature*, 407,538-541. (2000)
199. SIMOPOULOS AP.: The traditional diet of Greece and cancer, *Eur. J. Cancer Prev.*, 13(3), 219-30. (2004)
200. SINHA, K., CHAUDHARY, G., GUPTA, Y.K.: Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats, *Life Sci.*, 71(6), 655-65. (2002)
201. SKATCHKOV, M.P., SPERLING, D., HINK, U., MULSCH, A., HARRISON, D.G., SINDERMAN, I., MEINERTZ, T., MUNZEL, T.: Validation of lucigenin as a chemiluminescent probe to monitor vascular superoxide as well as basal vascular nitric oxide production, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254, 319–324. (1999)

202. SMOLDERS, R.G.V., VAN DER MOOREN, M., KENEMANS, P., VAN DER LINDEN, P.W.J., STEHOUWER, C.D.A., SIPKEMA, P.: 17 β -estradiol induces a rapid, endothelium-dependent, sex specific vasodilation in spontaneous constricted rat arterioles, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 187, 375-381. (2002)
203. SOLEAS, G.J., DIAMANDIS, E.P., GOLDBERG, D.M.: Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention, *J. Clin. Lab. Anal.*, 11(5),287-313. (1997)
204. SOLEAS, G.J., ANGELINI, M., GRASS, L., DIAMANDIS, E.P., GOLDBERG, D.M.: Absorption of trans-resveratrol in rats, *Methods Enzymol.*, 335,145-154. (2001a)
205. SOLEAS, G.J., YAN, J., GOLDBERG, D.M.: Measurement of trans-resveratrol, (+)-catechin, and quercetin in rat and human blood and urine by gas chromatography with mass selective detection, *Methods. Enzymol.*, 335, 130-145. (2001b)
206. SORESCU, D., WEISS, D., LASSEGUE, B., CLEMPUS, R.E., SZOES, K., SORESCU, D.: Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis, *Circulation*, 105,1429-1435. (2002)

207. STIRONE, C., CHU, Y., SUNDAY, L., DUCKLES, S.P., KRAUSE, DN.: 17 β -estradiol increases endothelial nitric oxide synthase mRNA copy number in cerebral blood vessels: quantification by real-time polymerase chain reaction, *Eur. J. Pharmacol.*, 478,35-38. (2003)

208. ST LEGER, A.S., COCHRANE, A.L., MOORE, F.: Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine, *Lancet*, 1,1017-1020 (1979)

209. STEFANO, G.B., PREVOT, V., BEAUVILLAIN, J.C., CADET, P., FIMIANI, C., WELTERS, I., FRICCHIONE, G.L., BRETON, C., LASSALLE, P., SALZET, M., BILFINGER, T.V.: Cell-surface estrogen receptors mediate calcium-dependent nitric oxide release in human endothelia, *Circulation*, 101, 1594–1597. (2000)

210. SQUADRITO, F., ALTAVILA, D., SQUADRITO, G.: Genistein supplementation and estrogen replacement therapy improve endothelial dysfunction induced by ovariectomy in rats, *Cardiovasc. Res.*, 45,454-462. (2000)

211. TAMURA, K., YAMAGUCHI, K., KOGO, H.: 17 β -estradiol inhibits ovariectomy-induced expression of inducible nitric oxide synthase in rat aorta in vivo, *Life Sci.*, 66(17), 259-264. (2000)

212. TEOH, H., LEUNG, S.W.S., MAN, R.Y.K.: Short-term exposure to physiological levels of 17 β -estradiol enhances endothelium-independent relaxation in porcine coronary artery, *Cardiovasc. Res.*, 42, 224-231. (1999)
213. TEOH, H., LEUNG, S.W.S., QUAN, A., HUANG, M., MAN, G.S.K., MAN, R.Y.K.: Acetylcholine-mediated relaxation in rat thoracic aorta is enhanced following acute exposure to physiological concentrations of 17- β -estradiol, *Mol. Cell Biochem.*, 207, 65–70 (2000a).
214. TEOH, H., MAN, R.Y.K.: Enhanced relaxation of porcine coronary arteries after acute exposure to a physiological level of 17- β -estradiol involves non-genomic mechanisms and the cyclic AMP cascade, *Br. J. Pharmacol.* 198, 1739–1747. (2000b)
215. TEP-AREENAN, P., KENDAL, D.A., RANDALL, M.D.: Mechanisms of vasorelaxation to 17 β -estradiol in rat arteries, *Eur. J. Pharmacol.*, 476,139-149. (2003)
216. TRELA, B.C., WATERHOUSE, A.L.: Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability, *J. Agric. Food Chem.* 44,1253-1257.(1996)

217. TRICHOPOULOU, A., COSTACOU, T., BAMIA, C.: Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population, *N. Engl. J. Med.*, 348(26),2599-2608. (2003)

218. TSAI, S.H., LIN-SHIAU, S.Y., LIN, J.K.: Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NF κ B in macrophages by resveratrol, *Br. J. Pharmacol.*, 126,673-680. (1999)

219. TURNER, R.T., EVANS, G.L., ZHANG, M., MARAN, A., SIBONGA, J.D.: Is resveratrol an estrogen agonist in growing rats? *Endocrinology*, 140(1), 50-4. (1999)

220. ULBRIGHT, T.L.V, SOUTHGATE, D.A.:Coronary heart disease:seven dietary factors, *Lancet*, 338,985-992. (1991)

221. UNEMOTO, T., HONDA, H., KOGO, H.: Differences in the mechanisms for relaxation of aorta induced by 17 β -estradiol or progesterone between normotensive and hypertensive rats, *Eur. J. Pharmacol.*, 472(1-2), 119-26. (2003)

222. VALKO, M., RHODES, C.J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M., MAZUR, M.: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem. Biol. Int.*, 160,1-40. (2006)

223. VARAS-LORENZO, C., GARCIA-RODRIGUEZ, L.A., PEREZ-GUTTHANN, S. ET AL.: Hormone replacement therapy and incidence of acute myocardial infarction; a population-based nested case-control study, *Circulation*, 101,2572-2578. (2000)

224. VINSON, J.A., TEVFEL, K.A., WU, N.: Red wine, dealcoholised red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model, *Atherosclerosis*, 156,67-72. (2001)

225. VIRGILI, M., CONTESTABILE, A.: Partial neuroprotection of in vivo excitotoxic brain damage by chronicadministration of the red wine antioxidant agent, trans-resveratrol in rats, *Neurosci Lett.*, 281(2-3), 123-6. (2000)

226. VISIOLI, F., BOGANI, P., GRANDE, S., GALLI, C.: Mediterranean food and health: Building human evidence, *J. Physiol. Pharmacol.*, 56,37-49. (2005)

227. VITRAC, X., DESMOULIERE, A., BROUILLAUD, B., KRISA, S., DEFFEIEUX, G., BARTHE, N, ROSENBAUM, J., MERILLON, J.M.: Distribution of [¹⁴C]-*trans*-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration, *Life Sci.*, 72, 2219-2233. (2003)

- 228. WAGNER, A.H., SCHROETER, M.R., HECKER, M.: 17 β -estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells, *FASEB J.*, 15,2121-2130. (2001)

- 229. WALLE, T., HSIEH, F., DELEGGE, M.H., OATIS, J.E.J.R., WALLE, UK.: High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos.*, 32,1377-1382. (2004)

- 230. WALLERATH, T, DECKERT, G, TERNES, T., ANDERSON, H., LI, H., WITTE, K., FORSTERMANN, U.:Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase, *Circulation*, 106, 1652–1658. (2002)

- 231. WALLERATH, T., LI, H., GODTEL-AMBRUST, U., SCHWARZ, P.M., FORSTERMANN, U.: A blend of polyphenolic compounds explains the stimulatory effect of red wine on human endothelial NO synthase, *Nitric Oxide*, 12,97-104. (2005)

- 232. WANG, Y., LEE, K.W., CHAN, F.L., SHIUAN CHEN, S., LEUNG, L.K.: The red wine polyphenol resveratrol displays bilevel inhibition on aromatase in breast cancer cells. *Toxicol. Sci.*, 92,71–77. (2006)

- 233. WANGENSTEEN, R, , MORENO, J.M., SAINZ, J.A., GOMEZ, I.R., CHAMORR, V., DÍOS, J., OSUNA, A., VARGAS, F.: Gender difference in the role of endothelium-derived relaxing factors modulating renal vascular reactivity, *Eur. J. Pharmacol.*, 486, 281–288. (2004)

- 234. WEBB, D.J., MONGE, J.C., YANAGISAWA, M.: Endothelin: New discoveries and rapid progress in the clinic, *Trends. Pharmacol. Sci.*, 19,5-8. (1998)

- 235. WELLMAN, G.C., BONEV, A.D., NELSON, M.T., BRAYDEN, J.E.: Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide, and Ca^{2+} -dependent K-channels, *Circ. Res.*, 79, 1024–1030. (1996)

- 236. WHITE, R.E., DARKOW, D.J., LANG, J.L.: Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP dependent mechanism, *Circ Res.*, 77,936-942 (1995)

- 237. WHITE, R.M., RIVERA, C.O., DAVISON, C.A.: Nitric oxide-dependent and -independent mechanisms account for gender differences in vasodilation to acetylcholine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 292, 375–380. (2000)

- 238. WOODMAN, O.L., MISSEN, M. A., BOUJAOUDE, M.: Daidzein and 17β -estradiol enhance nitric oxide synthase activity associated with an increase in

calmodulin an decrease in caveolin-1, J. Cardiovasc. Pharm., 44,155-163.
(2004)

239. WU, Q., WANG, M., SIMON, J.E.: Analytical methods to determine phytoestrogenic compounds, J. Chromatography. B., 812, 325-355. (2004)
240. WYNNE, F.L., PAYNE, J.A., CAIN, A.E., RECKELHOFF, J.F., KHALIL, R.A.: Age-related reduction in estrogen receptor-mediated mechanisms of vascular relaxation in female spontaneously hypertensive rats, Hypertension, 43, 405-412. (2004)
241. YI, S., OBERLEY, L.W., LI, Y.: A simple method for clinical assay of superoxide dismutase, Clin. Chem., 34(13),497-500. (1988)
242. YU, C.W., SHIN, Y.G., CHOW, A., LI, Y.M., KOSMEDER, J.W., LEE, Y.S., HIRSCHELMAN, W.H., PEZZUTO, J.M., MEHTA, R.G., VAN BREEMEN, R.B.: Human, rat and mouse metabolism of resveratrol, Pharm Res., 19,1907-1914. (2002)
243. YUHANNA, I.S., ZHU, Y., COX, B.E., HAHNER, L.D., OSBORNE-LAWRENCE, S., LU, P., MARCEL, Y.L., ANDERSON, R.G., MENDELSON, M.E., HOBBS, H.H., SHAUL, P.W.: High-density

lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase, *Nat. Med.*, 7,853–857. (2001)

244. ZEMBOWICZ, A., HECKER, M., MACARTHUR, H., SESSA, W.C., VANE, J.R.: Nitric oxide and another potent vasodilator are formed from N^G-hydroxyl-L-arginine by cultured endothelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88,11172-11176. (1991)
245. ZOU, J.G., HUANG, Y., CAO, K., YANG, G., YIN, H., LEN, J., HSIEH, T.C., WU, J.M.: Effect of resveratrol on intimal hyperplasia after endothelial denudation in an experimental rabbit model, *Life Sci.*, 68,153-163. (2000)
246. ZOU, J.G., WANG, Z.R., HUANG, Y., CAO, K., WU, J.M.: Effect of red wine and wine polphenol resveratrol on endothelial function in hypercholesterolemic rabbits, *Int. J. Mol. Med.*, 11, 317-320. (2003)

X. ÖZGEÇMİŞ

01.04.1977 tarihinde Ankara’da doğdum.1995 yılında Bolu İzzet Baysal Anadolu Lisesi’nden mezun oldum. Lisans eğitimimi 1999 yılında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nde tamamladım. 1999-2001 yılları arasında Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimimi tamamladım. 2000-2005 yılları arasında aynı departmanda Araştırma Görevlisi olarak çalıştım. Halen Farmakoloji Anabilim Dalı’nda doktora eğitimime devam etmekteyim ve Sağlık Bakanlığı İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü’nde görev yapmaktayım.