

Yüksek Yağ İçeren Diyet İle Beslenen Ratlarda DHEAS'ın Leptin, Lipid Profili Ve Endotel Fonksiyonu Üzerine Etkileri

Banu İŞBİLEN¹
Zeki ARI²
Ahmet VAR²
Ece ONUR²
Bekir Sami UYANIK³

¹Çanakkale Devlet Hastanesi, Biyokimya Laboratuvarı
Çanakkale-TÜRKİYE

²Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı
Manisa-TÜRKİYE

³ Hisar Intercontinental, Biyokimya Laboratuvarı
İstanbul-TÜRKİYE

DHEAS'ın vücutta yağ kitlesini azaltarak ve lipid metabolizmasını düzenleyerek, anti-obeziter ve anti-aterosklerotik etki gösterdiği bildirilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda, yüksek yağ içerikli diyet (YYD) ile beslenen ratlarda DHEAS'ın leptin, lipid profili ve endotel fonksiyonu üzerine etkilerini araştırdık.

Sprague-Dawley cinsi dişi ratlar 2 gruba ayrılarak grup I standart pellet, grup II YYD ile beslendi. 5 ay süre ile beslenmenin ardından grup II ratlar 3 alt gruba ayrıldı. Grup I ve grup IIa'ya (n=9) SF, grup IIb (n=9) 1 mg/kg DHEAS ve grup IIc'ye (n=9) 10 mg/kg DHEAS 7 gün boyunca ip olarak verildi. Son enjeksiyondan 24 saat sonra ratlar sakrifiye edilerek serum, karaciğer ve aort örnekleri toplandı. Dokularda leptin, ET-1, NO ve VEGF düzeyleri ölçüldü. Serumda bu parametrelere ek olarak, TG, TK, HDL-K ve DHEAS analizleri yapıldı.

Ratlarda 5 aylık YYD, vücut ağırlıklarında herhangi bir artışa neden olmadı. Tüm gruplarda serum, karaciğer ve aort leptin düzeyleri yüksekti ve DHEAS uygulanması leptin düzeylerini etkilemedi. YYD, TG ve TK düzeylerini belirgin artırdı. DHEAS uygulandığında TG ve TK düzeyleri anlamlı azaldı. İstatistiksel açıdan anlamlı olmasa da DHEAS, HDL-K seviyelerini azalttı. YYD, ET-1, NO ve VEGF parametrelerinde farklılık oluşturmadı. Yüksek dozda DHEAS serum ET-1 ve NO seviyelerini artırdı. Yalnızca karaciğerde ET-1 seviyeleri azaldı. Serum, karaciğer ve aort VEGF düzeylerinde ise gruplar arası herhangi bir farklılık bulunamadı. YYD ve DHEAS'ın endotel fonksiyonları üzerine etkisi kompleks olabilir. Sonuç olarak, DHEAS'ın TG ve TK düzeylerini azaltarak, lipid metabolizması üzerine olumlu etki gösterdiğini ifade etmek mümkündür.

Anahtar Kelimeler: Yüksek yağlı-diyet, DHEAS, lipid profili, leptin, endotelin-1, nitrik oksid

The Effect of DHEAS on Leptin, Lipid Profile, and Endothelial Function in the Rats Exposed To High-Fat Diet

According to previous reports, DHEAS has anti-atherosclerotic, and anti-obesity effects via regulating lipid metabolism, and decreasing body fat mass. This study aims to examine the effects of DHEAS on leptin, lipid profile, and endothelial function on the rats fed with high-fat diet (HFD).

Female Sprague-Dawley rats were divided into two groups: Group I (standard chow), -II (HFD). Following 5 months of feeding, group II were allocated into 3 subgroups: Group IIa (SF), -IIb (1 mg/kg DHEAS), and -IIc (10 mg/kg DHEAS). All treatments applied as (ip) for 7 days. ET-1, NO, and VEGF were measured in liver and aorta. Furthermore, TG, TC, HDL-C, and DHEAS were detected in serum.

No significant increase was observed in the body weights among the groups. Serum, liver, and aort leptin levels were found higher in HFD groups, although DHEAS did not lead to a difference. TG and TC increased in HFD groups. TG, TC, and HDL-C decreased with DHEAS. However, the decrease in HDL-C was insignificant. There was no effect of HFD on ET-1, NO, and VEGF. Significant increases was observed in serum ET-1, and NO with high-dose DHEAS. A significant decrease was noted only in ET-1 in liver. No difference was documented in the VEGF of serum, liver, and aorta. The mechanisms underlying effects of HFD and DHEAS on endothelial functions might be complex. As a consequence, it can be stated that DHEAS has an advantageous effect on lipid metabolism as it lowers TG and TC levels.

Key Words: High-fat diet, DHEAS, lipid profile, leptin, endothelin-1, nitric oxide

Giriş

Son 20 yılda ucuz, lezzetli ve yüksek yağ içeren birçok gıda maddesinin ortaya çıkmasıyla diyetdeki yağ miktarı hızla artmıştır (1). Yüksek yağ içeren diyet (YYD) ile beslenme, insan metabolik sendromuna paralel olarak kemirgenlerde obezite ve metabolik hastalıkları indükleyebilmektedir (2,3). Gerçekten de, YYD'in ratlarda vücut yağ oranı artışına ek olarak hiperleptinemi, hipertrigliseridemi ve hiperkolesterolemiye sebep olduğu bildirilmiştir (4,5).

Geliş Tarihi : 03.02.2007
Kabul Tarihi : 09.05.2007

Yazışma Adresi Correspondence

Banu İŞBİLEN
Çanakkale Devlet Hastanesi, Biyokimya Laboratuvarı
Çanakkale-TÜRKİYE

drisbilen@yahoo.com

Bu tarz YYD ile oluşan hiperlipidemi, erken dönemde endotel disfonksiyonuna, geç dönemde ateroskleroz oluşumuna neden olduğundan (6) ateroskleroz gelişiminde bağımsız bir risk faktörüdür (7). Gerçekten de, YYD ile beslenen insanlarda ortaya çıkan hipertrigliserideminin endotel hasarı oluşturması örneğinde olduğu gibi (8), bilinen tüm ateroskleroz risk faktörleri endotelial disfonksiyonla ilişkilidir (9).

167 amino asitli bir protein olan leptinin (16 kDA) ekspresyonu, primer beyaz adipoz dokuda olmakla beraber vasküler doku ve karaciğerde de gösterilmiştir (10-12). Leptin, metabolizmanın regülasyonunda major bir rol oynar ve multipl nöroendokrin (adeno- ve nörohipofiz aksı ve hipotalamus-hipofiz-adrenal aks) fonksiyona sahiptir (10). Vücut yağ rezervlerini korumak için adaptif değişiklikler yapan leptinin anjiogenezis, lipid metabolizması, reproduktif sistem dahil birçok fizyolojik süreçte etkileri gösterilmiştir (13,14). Ancak gerek YYD'in, gerekse bu çalışmada etkileri incelenen dehidroepiandrosteron-sülfat (DHEAS)'ın leptin salınımıyla ilişkisi bilinmemektedir.

Endotelyum, yalnızca kanla doku arasında madde alışverişinin yapıldığı kan damarlarını döşeyen tek katlı hücre dizisi olmayıp, aynı zamanda güçlü vazodilatör – nitrik oksid (NO), prostaglandinler, endotelin-1 (ET-1) vb.-, antikoagülan ve biyoaktif moleküller üreten, vasküler tonusu ve proliferasyonu regüle eden aktif bir organdır (15-17). Azalmış NO-aracılı vazodilatasyon sonucu oluşan endotelial disfonksiyon, kardiyovasküler ve metabolik hastalıkların birçoğunda görülmektedir (18). L-argininden sentezlenen NO endotelde guanilat siklazı aktive edip, cGMP konsantrasyonlarını artırarak, düz kas hücrelerinde relaksasyonu sağlar; trombositlerde de adezyon ve agregasyonu inhibe eder (15). Endotelden salınan diğer bir metabolit, ET-1, endotelin ailesinin kardiyovasküler sistemdeki predominant izoformudur (19). ET-1, bilinen en güçlü vazokonstriktörlerden biri olup (20), endotelden salınan NO'ye adeta zıt yönde hareket eder (15). Semptomatik aterosklerozu olmayan hiperkolesterolemili hastalarda yüksek ET-1 seviyeleri bulunmuştur (21). Öte yandan, endotelden salınan NO ve ET-1 gibi relaksasyon ve kontraksiyon maddeleri arasındaki dengesizliğin endotel hasarına yol açtığı bilinmektedir (15,19,22). Vasküler endotelial growth faktör (VEGF), ET-1'in gelişme ve çoğalmasını stimüle ederek anjiogenezde ve yeni gelişen kan damarlarının devamlılığında önemli bir rol oynamaktadır (19,23,24).

DHEAS, adrenal korteks ve karaciğerde sentezlenen ve androjenlerin öncül bileşiği olan dehidroepiandrosterona (DHEA) sülfat grubunun eklenmesi ile oluşmaktadır (25). Serum konsantrasyonları diğer steroid hormonlara göre yaklaşık 20 kat yüksek olan DHEAS'ın fizyolojik rolü halen tam anlamıyla bilinmemektedir (25,26), ancak anti-obeziter ve anti-diyabetik etkiye sahip olduğu ve ateroskleroz oluşumunu engellediği rapor edilmiştir (27-29). Bununla beraber, bu etkileri oluşturan mekanizma/mediatörler halen anlaşılabilir değildir. Bu çalışmada ilk olarak, ratlarda YYD ile beslenmenin TG, TK, HDL-K, leptin düzeylerini nasıl etkilediği ve -NO, ET-1 ve VEGF aracılığıyla-

endotel hasarına neden olup olmadığı incelendi. İkincil olarak, YYD verilen ratlara 2 farklı dozda uygulanan DHEAS'ın aynı parametrelerde yaratacağı farklılıklar sayesinde, olası anti-obeziter ve aterosklerozu önleyici etkilerini ve bu etkileri oluşturan mekanizmaların anlaşılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Ege Üniversitesi Deneysel Hayvan Laboratuvarı'ndan temin edilen ve Celal Bayar Üniversitesi Deneysel Hayvanları Etik Kurulu'na bu çalışmada kullanılması onaylanan, vücut ağırlıkları 129.8 ±30 gram olan 42 adet Sprague-Dawley cinsi dişi rat çalışmaya dahil edildi. Çalışma süresince ratlar, diüurnal ışık şartlarını (12 saat sürekli aydınlık, 12 saat sürekli karanlık) sağlayan bir ortamda tutuldu. Haftalık olarak ağırlıkları tartılarak kayıt edildi. Deneysel periyodun başında ratlar, bir hafta Tarih'ten (İzmir, Türkiye) alınan ve içeriğinde % 15 protein, % 2,5 yağ, % 15 sellüloz, % 14 kil, % 13 su bulunan standart pelletle beslendi (30). Sonrasında ratlar 2 gruba ayrıldı:

Grup I: Standart pelletle beslenen ratlar (kontrol, n=12).

Grup II: YYD ile beslenen ratlar (n=30).

19 hafta boyunca kontrol grubu ratlara standart pellet, grup II ratlara 100 gram standart diyetle 25 gram hayvansal bir yağ türü olan tereyağı eklenerek her gün taze hazırlanan YYD uygulandı. Uygulanan diyetle, toplam enerjinin ~% 65'i yağdan kaynaklanmaktaydı. Deneysel süresince gruplar ayrı kafeslerde tutularak, gruba uygun diyetleri ve suyla ad libitum beslendiler. Grup I'de bir, grup II'de üç adet rat ex oldu (n=38). Deneysel 20. haftasında Grup II ratlar (n=27) rastgele olarak 3 alt gruba ayrıldı. Yeni grup dağılımı aşağıda listelendi:

Grup I: Standart diyet+serum fizyolojik (SF) verilen ratlar (n=11).

Grup IIa: YYD+SF verilen ratlar (n=9).

Grup IIb: YYD+düşük doz DHEAS (1 mg/kg) verilen ratlar (n=9).

Grup IIc: YYD+yüksek doz DHEAS (10 mg/kg) verilen ratlar (n=9).

Kristalize DHEAS (D5297; Sigma, Almanya) steril deiyonize suda çözüldü (133). Her bir rat tartılarak, ağırlığı başına gereken SF veya DHEAS miktarı hesaplandı ve bir hafta boyunca düzenli olarak hergün aynı saatlerde (12.00-13.00) intraperitoneal (ip) olarak enjekte edildi. Son enjeksiyondan 24 saat sonra, ratlardan kardiyak ponksiyonla kan alındı ve +4 0C'ye ayarlı soğutmalı santrifüjde 1500 x g'de 20 dakika çevrilerek serumları ayrıldı. Kan örnekleri alındıktan hemen sonra, herhangi bir anestezi uygulanmadan ve hiçbir kimyasal madde verilmeden dekapite edilen ratların KC ve asendan aortalarından doku örnekleri alındı. Dokular derhal soğuk izotonikle yıkanarak kan ve diğer dokulardan temizlendi ve alüminyum folyoya sarılarak buz üzerinde laboratuvara ulaştırıldı. Serum ve

doku örnekleri analizlerin yapılacağı ana kadar -70 0C'de saklandı.

Analiz edilmek üzere yaş ağırlıkları 1 g olarak ayarlanan dokular soğukluğu muhafaza edilerek temiz cerrahi makasla parçalara ayrıldı. Cam tüpe aktarılan doku üstüne 2 mL fosfat tamponu (50 mM; pH:7.0) eklendi. Buz doldurulmuş plastik kap içerisine yerleştirilen cam tüpteki doku homojenizatörde (IKA Laborotecnic T 25 basic, Almanya) 16000 devir/dakika hızda homojenize edildi. Homojenatlar 1500 xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlardan NO, leptin, ET-1, VEGF ve doku protein düzeyleri çalışıldı. Serumda bu parametrelere ek olarak DHEAS, trigliserid (TG), total kolesterol (TK) ve HDL-kolesterol (HDL-K) analizleri yapıldı. Çalışmada kullanılan tüm solüsyonlar ya taze ya da stok olarak hazırlandı. Kullanılmayan stok solüsyonlar derin dondurucuda muhafaza edilirken, bunlardan dilüsyonla hazırlanan solüsyonlar buzdolabında +4 0C'de saklandı. Stok solüsyonları haftada bir yenilendi.

Leptin ölçümünde Quantikine® M Murine Mouse Leptin ELISA kiti (R&D Systems, USA), VEGF ölçümünde Quantikine® M Murine Mouse VEGF ELISA kiti (R&D Systems, USA) ve ET-1 ölçümünde TiterZyme® EIA human ET-1 kiti (Assay Designs Inc, USA) kullanıldı. Human ET-1 kitinin rat ET-1 düzeylerinin ölçülmesi için kullanılabilirliği üretici firma tarafından belgelendi. Doku protein ölçümlerinde Lowry metodu kullanıldı (31). Doku leptin, ET-1 ve VEGF konsantrasyonları doku protein değerlerine bölünerek sonuçlar pg/mg protein olarak verildi. NO'in unstabil yapısı ve kısa yarılanma ömrü ölçümünü zorlaştırdığından, stabil bileşikler olan nitrit ve nitrat miktarı Griess reaksiyonu ile ölçüldü (32). Serum ve

dokulardaki nitrit+nitrat sonuçları NO olarak değerlendirildi. Doku NO konsantrasyonları, yine doku protein değerlerine bölünerek sonuçlar µmol/g protein olarak verildi. Serum DHEAS düzeyleri, Coat-A-Count DHEA-SO₄ ticari kiti (DPC, USA) kullanılarak RIA tekniğiyle ölçüldü. Serum TG, TK ve HDL-K parametreleri COBAS® Integra 800 otoanalizöründe (Roche Diagnostics, Switzerland) spektrofotometrik yöntemle çalışıldı.

Bulguların istatistiksel analizinde 'SPSS for Windows 11.0' istatistik programı kullanıldı. Veriler 'Aritmetik Ortalama (Mean) ± Standart Hata (SE)' olarak verildi. Gruplar arası farklılıklar ve anlamlılık 'Mann Withney U testi' ile analiz edildi. p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

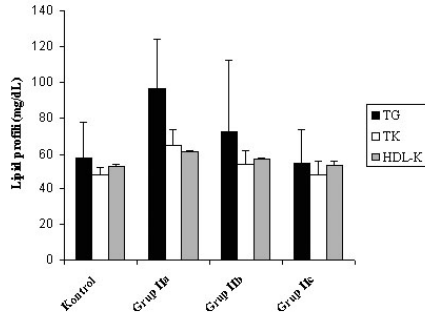
Çalışmanın başında kontrol grubu ratların (grup I) vücut ağırlığı 115.9±13.1 g, grup II ratların vücut ağırlığı 136.1±10.0 g idi. 20 haftalık beslenme periyodunun ardından kontrol grubu 188.1±26.7 g, grup II ratlar 194.4±23.4 g olarak tartıldı. Çalışma sonunda, vücut ağırlıkları açısından gruplar arasında herhangi bir fark bulunamadı (p>0.05). İp olarak uygulanan DHEAS'ın etkinliğini değerlendirmek üzere serumda DHEAS düzeyleri çalışıldı. Kontrol ve grup IIa (SF) ratlarda DHEAS seviyeleri sırasıyla 0.7±0.4 ve 0.8±0.3 µg/dL iken, grup IIb (1 mg/kg DHEAS) ve grup IIc (10 mg/kg DHEAS) ratlarda sırasıyla 2.9 ±1.0 ve 6.3±1.7 bulundu (Tablo 1) [a p<0.001 (grup IIc-I,IIa,IIb); a1 p<0.001 (grup IIb-I,IIa)]. Serum DHEAS konsantrasyonlarında doza-bağımlı anlamlı artış görülmesi, ratlarda DHEAS'ın ip olarak uygulanmasının etkin bir yöntem olduğu şeklinde yorumlandı.

Tablo 1. Serum leptin, ET-1, NO, VEGF, DHEAS, TG, TK ve HDL-K düzeyleri (Ortalama±SD).

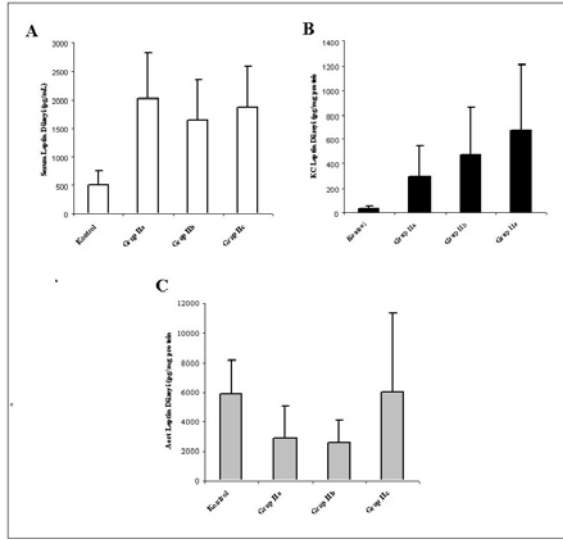
Parametreler	Grup I (n=11)	Grup IIa (n=9)	Grup IIb (n=9)	Grup IIc (n=9)	P
LEPTİN (pg/ mL)	499±268 ^{a,b}	2016±817	1644±699	1869±716	a p<0.001 Grup I-IIa,IIc b p<0.01 Grup I-IIb
ET-1 (pg/mL)	1.7±0.3	1.8±0.5	1.5±0.2	3.7±2.1 ^{b,c}	b p<0.01 Grup IIc-IIb c p<0.05 Grup IIc-I,IIa
NO (µmol/L)	111±25	123±44	133±38	167±27 ^{a,c}	a p<0.001 Grup IIc-I c p<0.05 Grup IIc-IIa,IIb
VEGF (pg/mL)	76.1±55	75.7±26.6	74.9±19.7	65.4±50.8	NS
TG (mg/dL)	57.7±20.1	96.6±27.3 ^b	72.8±39.4	54.4±19.3 ^c	b p<0.01 Grup IIa-I c p<0.05 Grup IIc-IIa
TK (mg/dL)	47.5±4.3	65.3±8.6 ^a	53.7±8.5 ^c	47.2±7.6	a p<0.001 Grup IIa-I,IIc c p<0.05 Grup IIb-I,IIa
HDL-K (mg/dL)	53.0±5.8	61.6±10.1	57.1±9.4	53.1±8.6	NS
DHEAS (µg/dL)	0.7±0.4	0.8±0.3	2.9 ±1.0 ^{a1}	6.3±1.7 ^a	a p<0.001 Grup IIc-I,IIa,IIb a1 p<0.001 Grup IIb-I,IIa

a,a1: p<0.001, b: p<0.01, c: p<0.05, NS: İstatistiksel olarak anlamsız.

[Endotelin-1 (ET-1), nitrik oksid (NO), vasküler endotelial growth faktör (VEGF), dehidroepiandrosteron-sülfat (DHEAS), trigliserid (TG), total kolesterol (TK), HDL-kolesterol (HDL-K)].



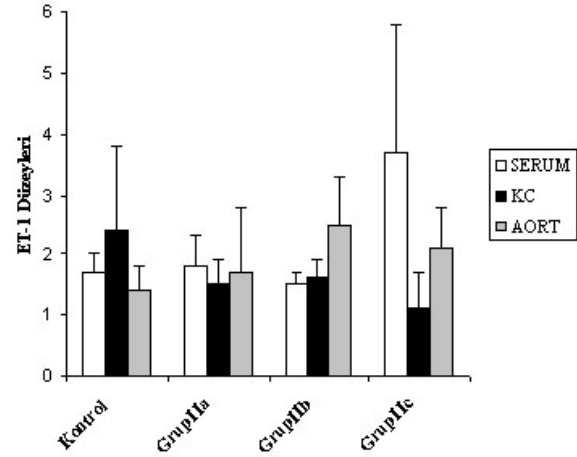
Şekil 1. YYD ve DHEAS'ın lipid profiline etkileri. YYD+SF verilen grup Ia' da serum TG ve TK seviyeleri, standart diyetle beslenen kontrole göre belirgin yüksekti (sırasıyla $p<0.01$, $p<0.001$). 1 mg/kg DHEAS verilen grup Ib'de TG azaldı ama anlamlı değildi ($p>0.05$). Aynı grupta TK düzeyleri anlamlı azaldı ($p<0.05$). YYD+10 mg/kg DHEAS, TG ve TK düzeylerini düşürdü (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.001$).



Şekil 2. YYD ve DHEAS'ın (A) serum, (B) KC ve (C) aort leptin düzeylerine etkileri. (A) Serum leptin düzeyleri, kontrole kıyaslandığında YYD verilen tüm gruplarda [grup Ia ve grup Ic'de ($p<0.001$), grup Ib'de ($p<0.01$)] anlamlı yüksekti. DHEAS uygulaması leptin düzeylerinde azalmaya neden olduysa da anlamlı değildi. (B) KC leptin düzeyleri, serum leptin seviyelerinde olduğu gibi YYD ile beslenen tüm gruplarda kontrole göre anlamlı arttı ($p<0.001$). (C) Aort leptin düzeyleri kontrol grubuna göre grup Ia'da ($p<0.05$), grup Ib'de ise ($p<0.01$) istatistiksel olarak anlamlı azaldı. Grup Ic'de leptin, grup Ib'ye göre artarak ($p<0.05$) kontrol düzeylerini buldu.

YYD+SF verilen grup Ia' da serum TG ve TK seviyeleri, standart pelletle beslenen kontrol grubuna göre belirgin yüksekti [sırasıyla $b p<0.01$ (grup Ia-I); $a p<0.001$ (grup Ia-I)] (Tablo 1, Şekil 1). YYD+10 mg/kg DHEAS verilen ratlarda TG düzeyleri, YDD+SF verilen ratlara göre yaklaşık % 43.7 oranında azalarak [$c p<0.05$

(grup Ic-Ia)] kontrol değerlerinin de altına geriledi (Tablo 1, Şekil 1). DHEAS verildiğinde serum TG de görülen düşüş paterni, serum TK seviyeleri için de geçerliydi ve TK değerleri 10 mg/kg DHEAS uygulamasıyla YDD+SF grubuna kıyasla yaklaşık % 27.7 azaldı [$a p<0.001$ (grup Ia-Ic)] (Tablo 1, Şekil 1). İlginc olarak, serum HDL-K değerleri YYD+SF (61.6 ± 10.1) ve YYD+1 mg/kg DHEAS (57.1 ± 9.4) alan gruplarda kontrole (53 ± 5.8) kıyasla bir miktar yüksekti, ancak anlamlı değildi (Tablo 1, Şekil 1). 10 mg/kg DHEAS verilmesiyle HDL-K seviyeleri (53.1 ± 8.6) kontrol grubu düzeylerine geriledi.



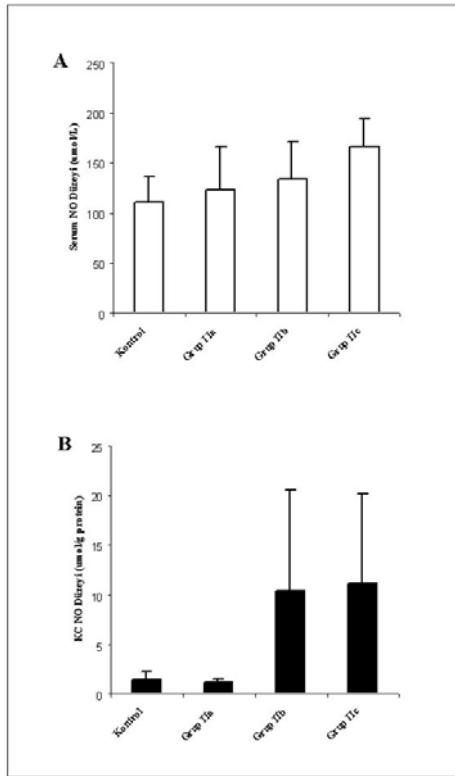
Şekil 3. YYD ve DHEAS'ın serum, KC ve aort ET-1 düzeylerine etkileri. YYD+SF verilen ratlar kontrole kıyaslandığında, serum ve tüm dokularda ET-1 düzeylerinde anlamlı farklılık görülmedi ($p>0.05$). YYD+10 mg/kg DHEAS uygulanan grup Ic ratlarda serum ET-1 düzeyleri, kontrol, grup Ia ve 1 mg/kg DHEAS uygulanan grup Ib'ye kıyasla anlamlı artmıştı (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.05$, $p<0.01$). KC ET-1 düzeyleri, grup Ic'nin kontrole göre ($p<0.01$), grup Ia ve grup Ib'ye göre ise ($p<0.05$) düzeyinde düşüktü. Grup Ib ve grup Ic'de aort ET-1, kontrole göre yüksek bulundu (sırasıyla $p<0.01$, $p<0.05$).

Serumda kontrole göre, YYD ile beslenen tüm gruplarda [$a p<0.001$ (grup I-Ia,Ic); $b p<0.01$ (grup I-Ib)] leptin düzeyleri anlamlı olarak arttı (Tablo 1, Şekil 2A). KC leptin düzeyleri, serum leptin değerlerinde olduğu gibi, YYD ile beslenen tüm gruplarda kontrole göre yüksekti [$p<0.001$ (grup I-Ia,Ib,Ic)] (Şekil 2B). DHEAS uygulaması, serum ve KC leptin düzeylerinde belirgin farklılık oluşturmadı (Şekil 2A, 2B). Aort leptin düzeyleri incelendiğinde, serum ve KC leptin düzeylerine zıt olarak, kontrole göre grup Ia ve grup Ib'de artış izlendi [sırasıyla $p<0.05$ (grup I-Ia), $p<0.01$ (grup I-Ib)] (Şekil 2C). Ancak grup Ic de leptin seviyeleri, kontrol düzeylerinin de üzerindediydi ve grup Ib'ye kıyasla yüksekti [$p<0.05$ (grup Ic-Ib)] (Şekil 2C).

YYD+SF verilen grup Ia ratlarda, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında serum ve tüm dokularda ET-1 düzeylerinde farklılık bulunamadı (Tablo 1, Şekil 3). 10 mg/kg DHEAS uygulanan grup Ic ratlarda, kontrol ve SF

alan grup IIa'ya göre ve 1 mg/kg DHEAS uygulanan grup IIb'ye göre serum ET-1 düzeyleri anlamlı arttı [sırasıyla c $p<0.05$ (grup IIc-I,IIa), b $p<0.01$ (grup IIc-IIb)] (Tablo 1, Şekil 3). Serum bulgularının aksine 10 mg/kg DHEAS verilen grupta KC ET-1 düzeyleri kontrol, grup IIa ve grup IIb'ye kıyasla belirgin azaldı [$p<0.01$ (grup IIc-I), $p<0.05$ (grup IIc-IIa,IIb)] (Şekil 3). 1 mg/kg ve 10 mg/kg DHEAS verilen gruplarda aort ET-1 seviyeleri, kontrole göre yüksekti [($p<0.01$ (grup IIb-I, $p<0.05$ (grup IIc-I)] (Şekil 3).

YYD+SF uyguladığımız grup IIa ratlarda kontrole göre, serum ve doku NO seviyelerinde anlamlı farklılık görülmedi (Tablo 1; Şekil 4A ve 4B). 10 mg/kg DHEAS verilen grup IIc ratlarda serum NO kontrol, grup IIa ve grup IIb'ye göre artmıştı [a $p<0.001$ (grup IIc-I), c $p<0.05$ (grup IIc-IIa,IIb)] (Tablo 1; Şekil 4A). KC NO düzeyleri, DHEAS alan grup IIb ve grup IIc ratlarda kontrol ve grup IIa'ya göre anlamlı yüksek tespit edildi [$p<0.001$ (grup IIb-I,IIa), $p<0.01$ (grup IIc-I,IIa)] (Şekil 4B). Aort dokusu NO düzeylerinde tüm gruplarda kontrol grubuna göre anlamlılık yaratmayan minimal yükseklikler görüldü ($p>0.05$) (data gösterilmedi).



Şekil 4. YYD ve DHEAS'ın (A) serum ve (B) KC NO düzeylerine etkileri. YYD+SF uyguladığımız ratlarda kontrole göre, serum ve tüm dokularda NO seviyelerinde anlamlı farklılık görülmedi ($p>0.05$). (A) 10 mg/kg DHEAS verilen grup IIc ratlarda serum NO düzeyleri kontrol, grup IIa ve grup IIb'ye göre yüksekti (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.05$, $p<0.05$). (B) KC NO düzeyleri, grup IIb'nin kontrole ve grup IIa'ya göre ($p<0.001$), grup IIc'nin ise aynı gruplara göre ($p<0.01$) düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu.

YYD+10 mg/kg DHEAS verilen grupta serum VEGF değerleri, diğer gruplara göre düşükse de anlamlı değildi (data gösterilmedi). Gruplararası karşılaştırmada KC VEGF değerlerinde herhangi bir farklılık bulunmadı (data gösterilmedi). Aort VEGF düzeyleri, muhtemelen kullandığımız kitin analitik ölçüm aralığının altında olduğundan tespit edilemedi.

Tartışma

Çalışmamızda ortaya çıkan ana sonuçlar şunlardır: (1) YYD ile beslenme ratlarda hipertrigliseridemi ve hiperkolesterolemi yaratmaktadır. (2) Düşük ve yüksek dozlarda DHEAS, TG ve TK düzeylerini düşürmektedir. (3) YYD, serum ve KC leptin seviyelerini arttırmaktadır. (4) YYD, ET-1, NO ve VEGF parametreleri üzerinden endotel fonksiyonuna etki göstermemektedir. (5) Yüksek doz DHEAS uygulanmasıyla serum ET-1 ve NO seviyeleri eş zamanlı artmaktadır. (6) Ne YYD, ne de DHEAS kullanımının VEGF düzeylerine herhangi bir etkisi bulunmamaktadır.

Literatürde ratlara 4 hafta ve hatta daha kısa süre ile YYD verilmesinin hipertrigliseridemiye yol açtığı bildirilmiştir (33-35). Başka bir çalışmada, bu sonuçlara zıt olarak, 8 hafta YYD verilen ratlarda yüksek TK ancak normal TG düzeyleri gösterilmiştir (36). Çalışmamızda 20 haftalık YYD, 11 ve 24 hafta boyunca YYD verilen ratlarda olduğu gibi (4,5), TG ve de TK düzeylerinde anlamlı artışa neden oldu. DHEAS uygulanmasıyla, YYD'in serum TG ve TK düzeylerinde yarattığı bu yükselmeler doza-bağımlı olarak azaldı. Bu sonuçları destekleyen başka yayınlarda da, DHEAS'ın ratlarda TG ve TK düzeylerini düşürdüğü bildirilmiştir (26, 37). 6 hafta boyunca içme suyunda verilen 0.8 mg/kg DHEAS Osborne-Mendel ratlarda karkas lipid, yağ deposu kitlesi ve retroperitoneal ve epididimal adiposit sayısını azaltmıştır (37). YYD ile beslenen maymunlarda DHEA'nın kolesterol düzeylerini düşürmediği bildirilse de (38), DHEA'nın plazma TG ve TK düzeylerini düşürdüğüne dair yayınlar da mevcuttur (26,39). DHEA'nın -muhtemelen DHEAS'ın- lipoprotein lipaz aktivitesini artırarak lipid-düzeylerini düşürdüğü ve bu mekanizma sonucunda anti-obeziter etki gösterdiği öne sürülmektedir (28). DHEAS'ın dokularda testosteron veya östradiol gibi çok daha aktif seks steroidlerine dönüştürülüp, androjen veya östrojen reseptörlerine bağlanarak etki göstermesi TG ve TK düzeylerini azaltmasında alternatif bir mekanizma olabilir (29). Deneysel çalışmalar, aksi yönde bilgi olsa da (4), YYD ile beslenmenin HDL-K düzeylerini arttırdığı yönündedir (35,40). Bu çalışmada da, bu çalışmalara paralel, YYD'in -istatistiksel açıdan anlamlı değilse de- HDL-K düzeylerini ~% 20 arttırdığı tespit edildi. Ancak, YYD ile indüklenen HDL-K 1 mg/kg DHEAS ile ~% 7 oranında azalırken, 10 mg/kg DHEAS ile ~% 13.8 azalarak standart diyetle beslenen ratlardaki seviyelere geriledi. HDL-K'daki bu düşüşten yola çıkarak, DHEAS'ın TK seviyelerini azaltırken selektif etki göstermediğini, TK seviyelerindeki kadar belirgin olmasa da HDL-K düzeylerini de azaltarak kolesterol metabolizmasını tek yönde etkilediğini düşünmek mümkündür.

YYD ile beslenerek obez yapılan sıçanlarda leptin düzeyleri yüksektir (41-45). Aksine, 4 haftalık YYD'in leptin düzeylerini standart diyetle beslenen ratlara göre anlamlı azalttığı da bildirilmiştir (46). Ancak, aynı çalışmada beslenme süresi 14 haftaya tamamlandığında leptin düzeyleri artmıştır (46). Bu rapordan da anlaşılacağı üzere, YYD ile beslenen ratlardaki leptin düzeyleri beslenme süresiyle doğrudan ilişkilidir. Bu araştırmada 20 hafta boyunca verilen YYD, serum ve KC leptin seviyelerini arttırdı. Bu durumun altında yatan olası mekanizma, YYD sonucu gelişen adipoz dokudan leptin sekresyonunun artışıdır (47,48). Araştırmamızda, YYD'in rat vücut ağırlıklarında herhangi bir artışa yol açmadan, hiperleptinemi oluşturması da bu hipotezi desteklemektedir. DHEAS'ın leptin üzerine etkileri toplu olarak değerlendirildiğinde serum leptin düzeylerini minimal azaltıp, KC leptin düzeylerini bir miktar yükselttiği ama bu yüksekliklerin anlamlı olmadığı tespit edildi. Aort leptin düzeyleri YYD ve 1 mg/kg DHEAS verilmesiyle, serum ve KC'dekinin aksine azaldı. Ancak 10 mg/kg DHEAS ile aort leptin seviyeleri tekrar kontrol grubu seviyelerini buldu. Bu bulgular, DHEAS'ın sözkonusu anti-obeziter etkilerinin (28,29) leptin salınımından bağımsız gelişebileceği ihtimalini ortaya koymaktadır.

YYD, direkt olarak endotel fonksiyonunu hasarlamaktadır (6-8,49). YYD ile beslenen farelerde serum ET-1 ve leptin, miyokardial ET-1 ve leptin reseptör mRNA düzeyleri artmıştır (41). Kolesterolde zengin diyet verilen ratlarda, indüklenebilir nitrik oksid sentetaz (iNOS) ve ET-1 seviyeleri eş zamanlı yükselmektedir (50). 2007 yılında yapılan bir çalışmada 12 hafta YYD ile beslenen domuzlarda, hiperleptinemiye eşlik eden azalmış koroner endotelium-bağımlı vazorelaksasyon ve artmış miyokardial mikrovasküler permeabilite bildirilmiştir (51). Bu sonuçlar, YYD'in yüksek leptin düzeyleri ile ilişkili, artmış vasküler oksidatif stres ve endotelial disfonksiyona neden olduğuna göstermektedir. Bütün bu raporların aksine -ve de eşlik eden hiperleptinemiye rağmen- YYD+SF uygulanan ratlarda, standart diyetle beslenenlere göre serum ve tüm dokularda hem ET-1, hem NO açısından istatistiksel düzeyde fark gözlenmedi. Bilinenin aksine tek başına YYD, ET-1, NO ve VEGF üzerinden endotel fonksiyonlarında belirgin bir etki yaratmamıştır. Kardiyovasküler hastalık gelişme riski yüksek postmenapozal kadınlarda, DHEAS'ın plazma ET-1, nitrit

ve nitrat seviyelerini değiştirmediği ve endotel-bağımlı vazodilatasyonu etkilemediği tespit edilerek, endotel fonksiyonu üzerine herhangi olumlu etkisi olmadığı iddia edilmiştir (52). Ancak, DHEA'nın -muhtemelen DHEAS'ın da- in vitro NO sentezini artırarak endotel fonksiyonunu iyileştirebildiği de rapor edilmiştir (53). Bu çalışmada, YYD+10 mg/kg DHEAS uygulanan grupta yüksek serum ET-1 ve NO, KC NO ve aort ET-1 düzeyleri mevcuttu. Aynı grupta aort NO düzeyleri arttıysa da, anlamlı değildi. KC' de ise aynı grupta ET-1 düzeyleri azalmıştı. DHEAS verilmesiyle ET-1 ve NO gibi zıt davranışlı moleküllerin eş zamanlı artışı, endoteliuma etkisinin sadece vazodilatasyon/vazokonstriksiyon mekanizması üzerinden açıklanamayacağı anlamına gelebilir.

Diyetteki yüksek yağ hipertrigliseridemi, hiperkolesterolemi ve hiperleptinemiye yol açar (4,5,33-35,41-45). Bu araştırmanın bulguları, obezite, koroner arter hastalığı ve metabolik sendrom gibi hastalıklarda ilaç tedavisinin yanı sıra diyetdeki yağ miktarının kısıtlanmasının önemini bir kez daha göstermektedir. DHEAS leptin salınımından bağımsız olarak, TG ve TK düzeylerini azaltarak lipid metabolizmasını düzenlemektedir. Bu çalışmada gerek 20 haftalık YYD'in, gerekse düşük ve yüksek doz DHEAS'ın endotel fonksiyonuna etkisini değerlendirmek üzere ölçtüğümüz NO, ET-1 ve VEGF aktiviterinde herhangi bir farklılık görülmedi. Bu nedenle, YYD'in endotel fonksiyonuna etkisinin çok daha kompleks bir süreç olduğu ve/veya endotel disfonksiyonu değerlendirmek için ek analizlere ihtiyaç olduğu düşünülebilir. Endotelial hasarı gösteren von Willebrand faktörü (vWF), endotelial disfonksiyon markırları solubl adezyon molekülleri (ICAM-1 ve VCAM-1), platelet aktivasyonunu değerlendirmede kullanılan P-selektin ve endotel disfonksiyonunu direkt olarak tespit edebilen brachial arter Doppler ultrasonu gibi analizlerin yapılması halinde YYD'in endotel fonksiyonuna etkileri daha iyi anlaşılabilir (54-56).

Son olarak, DHEAS'ın anti -obeziter ve ateroskleroz oluşumunu önleyici etkisini TG ve TK düzeylerini düşürerek, lipid metabolizması üzerinde yarattığı olumlu aktiviteyle açıklamak mümkündür. DHEAS'ın, özellikle HDL-K düzeylerini azaltıcı etkisi nedeniyle adeta anti-lipidemik bir ajan/suplemen olarak kullanımı sınırlı olabilir. DHEAS'ın bu tür bir amaçla kullanılabilmesi için, öncelikle insan vaka gruplarında yapılacak daha geniş ve daha uzun vadeli çalışmalara gereksinim olduğu açıktır.

Kaynaklar

- Schrauwen P, Westerterp KR. The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. *Br J Nutr* 2000; 84: 417-427.
- Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat Diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 2007; 15: 798-808.
- Song GY, Gao Y, Di YW, Pan LL, Zhou Y, Ye JM. High-fat feeding reduces endothelium-dependent vasodilation in rats: differential mechanisms for saturated and unsaturated fatty acids? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33: 708-713.
- Kalaivanisailaja J, Manju V, Nalini N. Lipid profile in mice fed a high-fat diet after exogenous leptin administration. *Polish J Pharmacol* 2003; 55: 763-769.
- Bahceci M, Tuzcu A, Akkus M, Yaldiz M, Ozbay A. The effect of high-fat diet on the development of obesity and serum leptin level in rats. *Eat Weight Disord* 1999; 4: 128-132.

6. Davis N, Katz S, Wylie-Rosett J. The effect of diet on endothelial function. *Cardiol Rev* 2007; 15: 62-66.
7. Hennig B, Toborek M, McClain CJ. High-energy diets, fatty acids and endothelial cell function: Implications for atherosclerosis. *J Am Coll Nutr* 2001; 20: 97-105.
8. Giannattasio C, Zoppo A, Gentile G, Failla M, Capra A, Maggi FM and et al. Acute effect of high-fat meal on endothelial function in moderately dyslipidemic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 406-410.
9. Kirma C, Akcakoyun M, Esen AM, Barutcu I, Karakaya O, Sağlam M, and et al. Relationship between endothelial function and coronary risk factors in patients with stable coronary artery disease. *Circ J* 2007; 71: 698-702.
10. Alexe DM, Syridou G, Petridou ET. Determinants of early life leptin levels and later life degenerative outcomes. *Clin Med Res* 2006; 4: 326-335.
11. Guzik TJ, Mangalat D, Korb R. Adipocytokines-novel link between inflammation and vascular function? *J Physiol Pharmacol* 2006; 57: 505-528.
12. Koerner A, Kratzch J, Kiess W. Adipocytokines: leptin-the classical, resistin-the controversial, adiponectin-the promising, and more to come. *Best Prac Res Clin Endocrinol Metab* 2005; 19: 525-546.
13. Zhang F, Chen Y, Heiman M, Dimarchi R. Leptin: structure, function and biology. *Vitam Horm* 2005; 71: 345-372.
14. Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med* 1999; 130: 671-680.
15. Sudano I, Spieker LE, Hermann F, Flammer A, Corti R, Noll G and et al. Protection of endothelial function: targets for nutritional and pharmacological interventions. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 47 (suppl 2): S136-150.
16. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation* 2004; 109: 27-33.
17. Lopez-Jaramillo P, Casas JP. Blockade of endothelial enzymes: new therapeutic targets. *J Hum Hypertens* 2002; 16: S100-103.
18. Desjardins F, Balligand JL. Nitric oxide-dependent endothelial function and cardiovascular disease. *Acta Clin Belg* 2006; 61: 326-334.
19. Böhm F. ET-1 and vascular function in atherosclerosis. *Uzmanlık Tezi*, Stockholm: The Karolinska Institute, 2002.
20. Lin CL, Winardi W, Jeng AY, Kwan AL. Endothelin-converting enzyme inhibitors for the treatment of subarachnoid hemorrhage-induced vasospasm. *Neurol Res* 2006; 28: 721-729.
21. Haak T, Marz W, Jungmann E, Hausser S, Siekmeier R, Gross W and et al. Elevated endothelin levels in patients with hyperlipoproteinemia. *Clin Investig* 1994; 72: 580-584
22. Katona E, Juhasz M, Varga Z, Paragh G, Fulesdi B, Pall D. The role and clinical importance of nitric oxide-endothelin system in hypertension. *Orv Hetil* 2006; 147: 1819-1824.
23. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4368-4380.
24. Tonello C, Giordano A, Cozzi V, Cinti S, Stock MJ, Carruba MO and et al. Role of sympathetic activity in controlling the expression of vascular endothelial growth factor in brown fat cells of lean and genetically obese rats. *FEBS Lett* 1999; 442: 167-172.
25. Bovenberg SA, van Uum SH, Hermus AR. Dehydroepiandrosterone administration in humans: evidence based? *Neth J Med* 2005; 63: 300-304.
26. Süzek H. Dehidroepiandrosterone-Sülfat (DHEAS)'ın erkek sıçanlarda (*Rattus norvegicus albinus*) serum lipid, lipoprotein (a) ve HDL subfraksiyonlarına etkisi. *Doktora Tezi*, Van:100. Yıl Üniversitesi, 1999.
27. Von Muhlen D, Laughlin GA, Kritiz-Silverstein D, Barrett-Connor E. The dehydroepiandrosterone and WellNess (DAWN) study: research design and methods. *Contemp Clin Trials* 2007; 28: 153-168.
28. Mauriege P, Martel C, Langin D, Lacaille M, Despres JP, Belanger A and et al. Chronic effects of dehydroepiandrosterone on rat adipose tissue metabolism. *Metabolism* 2003; 52: 264-272.
29. Nawata H, Yanase T, Goto K. Mechanism of action of anti-aging DHEA-S and the replacement of DHEA-S. *Mech Ageing Dev* 2002; 123:1101-1106.
30. Onur E. Defibrotidin aterojenik diyet uygulanan tavşanlarda beyin ve böbrek serbest radikal ve antioksidanlara etkisi. *Uzmanlık Tezi*, İzmir: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, 1999.
31. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
32. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990; 36: 1440-1443.
33. Ji H, Friedman M. Fasting plasma triglyceride levels and fat oxidation predict dietary obesity in rats. *Physiol Behav* 2003; 78: 767-772.
34. Naderali EK, Williams G. Prolonged endothelial-dependent and -independent arterial dysfunction induced in the rat by short-term feeding with a high-fat, high-sucrose diet. *Atherosclerosis* 2003; 166: 253-259.
35. Uhley V, Zhong S, Guo F, Buisson A, Savona L, Watkins A and et al. Differential gender response produced by meal and ad lib feedings of a high-fat diet in Osborne-Mendel rats. *Physiol Behav* 1997; 62: 617-622.
36. Huang BW, Chiang MT, Yao HT, Chiang W. The effect of high-fat and high-fructose diets on glucose tolerance and plasma lipid and leptin levels in rats. *Diabetes Obes Metab* 2004; 6: 120-126.
37. Lea-Currie YR, Wen P, McIntosh MK. Dehydroepiandrosterone-sulfate reduces adipocyte hyperplasia associated with feeding rats a high-fat diet. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997; 21: 1058-1064.
38. Christopher-Hennings j, Kurzman ID, Haffa AL, Kernitz JW, Macewen EG. The effect of high-fat diet and dehydroepiandrosterone (DHEA) administration in the rhesus monkey. *In vivo* 1995; 9: 415-420.
39. Golda V, Hilgertova J. Effect of dehydroepiandrosterone on lipemia, glucose tolerance, insulinemia, insulin binding to erythrocytes in SHR/N-cp lean rats of Koletsky rats. *Acta Medica* 1997; 40: 31-35.

40. Aoyama T, Fukui K, Takamatsu K, Hashimoto Y, Yamamoto T. Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (yellow KK). *Nutrition* 2000; 16: 349-354.
41. Adiarto S, Emoto N, Iwasa N, Yokoyama M. Obesity-induced upregulation of myocardial endothelin-1 expression is mediated by leptin. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 353: 623-627.
42. Leobiwitz SF, Dourmashkin JT, Chang GQ, Hill JO, Gayles EC, Fried SK and et al. Acute high-fat diet paradigms link galanin to triglycerides and their transport and metabolism in muscle. *Brain Res* 2004; 1008: 168-178.
43. Cha MC, Chou CJ, Boozer CN. High-fat diet feeding reduces the diurnal variation of plasma leptin concentration in rats. *Metabolism* 2000; 49: 503-507.
44. Ahren B. Plasma leptin and insulin in C57B1/6J mice on a high-fat diet: relation to subsequent changes in body weight. *Acta Physiol Scand* 1999; 165: 233-240.
45. De Schepper J, Zhou X, De Bock S, Smits J, Louis O, Hooghe-Peters E and et al. Study of serum leptin in cafeteria-diet-overfed rats. Influence of diet, insulin and corticosterone. *Horm Res* 1998; 50: 271-275.
46. Ainslie DA, Proietto J, Fam BC, Thorburn AW. Short-term, high-fat diets lower circulating leptin concentrations in rats. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 438-442.
47. Gao J, Ghibaudi L, Heek M, Hwa JJ. Characterization of diet-induced obese rats that develop persistent obesity after 6 months of high-fat followed by 1 month of low-fat diet. *Brain Res* 2002; 936: 87-90.
48. Halaas JL, Boozer C, Blair-West J, Fidahusein N, Denton DA, Friedman JM. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 8878-8883.
49. Vogel RA, Corretti MC, Gellman J. Cholesterol, cholesterol lowering, and endothelial function. *Prog Cardiovasc Dis* 1998; 41: 117-136.
50. Aliev G, Shi J, Perry G, Friedland RP, Lamana JC. Decreased constitutive nitric oxide synthase, but increased inducible nitric oxide synthase and endothelin-1 immunoreactivity in aortic endothelial cells of donryu rats on a cholesterio-enriched diet. *Anat Rec* 2000; 260: 16-25.
51. Galili O, Versari D, Sattler KJ, Olson ML, Mannheim D, McConnell JP and et al. Early experimental obesity is associated with coronary endothelial dysfunction and oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H904-911.
52. Silvestri A, Gambacciani M, Vitale C, Monteleone P, Ciaponi M, Fini M and et al. Different effect of hormone replacement therapy, DHEAS and tibolone on endothelial function in postmenopausal women with increased cardiovascular risk. *Maturitas* 2005; 50:305-311.
53. Perrini S, Laviola L, Natalicchio A, Giorgino F. Associated hormonal declines in aging: DHEAS. *J Endocrinol Invest* 2005; 28: 85-93.
54. Varughese GI, Patel JV, Tomson J, Blann AD, Hughes EA, Lip GY. Prognostic value of plasma soluble P-selectin and von Willebrand factor as indices of platelet activation and endothelial damage/dysfunction in high-risk patients with hypertension: a sub-study of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial. *J Intern Med* 2007; 261: 384-391.
55. Song Y, Manson JE, Tinker L, Rifai N, Cook NR, Hu FB and et al. Circulating levels of endothelial adhesion molecules and risk of diabetes mellitus in an ethnically diverse cohort of women. *Diabetes* 2007; Epub ahead of print.
56. Cortes Rodriguez R, Fernandez de la Puebla Gimenez RA, Morote Ibarrola G, Caballero Villarraso J, Lopez Miranda J, Perez-Jimenez F. Endothelial dysfunction is associated with insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis. *Med Clin (Barc)* 2007; 128: 414-416.