

Enalaprilin Diyabetik Sıçan Mide Dokusunda Ghrelin Ekspresyonuna Etkileri

Gökhan ARTAŞ¹, Tuncay KULOĞLU²

¹Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

²Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

ÖZET

Amaç: Ghrelin, insülin salgılanması ve glukoz metabolizması üzerine etkili, büyük miktarda mideden salgılanan peptid yapılı bir hormondur. Bu çalışmada, streptozotosin (STZ) ile oluşturulan deneysel diyabet modelinde enalaprilin, sıçan mide dokusundaki ghrelin ekspresyonu üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada, 24 adet 8 haftalık Wistar albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanları her grupta 6 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna deney süresi olan 6 hafta boyunca hiçbir uygulama yapılmadı. Tampon grubuna sadece 0,1 M fosfat-sitrat tamponu intraperitoneal (i.p) olarak enjekte edildi. Diyabet grubuna 50 mg/kg tek doz STZ 0,1 M fosfat-sitrat tamponunda çözülürerek i.p olarak uygulandı. Diyabet+enalapril grubuna ise 50 mg/kg tek doz STZ 0,1 M fosfat-sitrat tamponunda çözülürerek i.p olarak uygulanmasından sonra diyabetin oluşumunu takiben enalapril 5 mg/kg/gün oral olarak verildi. Deney sonunda sıçanlar anestezi altında dekapite edildi ve mide dokuları çıkartıldı. Rutin takipler yapılarak dokular parafin bloklara gömüldü. Bloklardan alınan kesitlere ghrelin ekspresyonu için avidin-biotin-peroksidaz yöntemi uygulandı. Ghrelin ile pozitif boyanmış hücreler, eyepiece gratikül ile sayılarak istatistiksel analizleri yapıldı.

Bulgular: Ghrelin pozitif hücrelerin sayısı, kontrol ve tampon grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermedi. Diyabet grubunda, kontrol ve tampon gruplarına göre belirgin azalma görüldü. Diyabet+enalapril grubundaki ghrelin pozitif hücrelerde, diyabet grubuna göre anlamlı bir artış vardı.

Sonuç: Deneysel diyabetin sıçan mide dokusunda ghrelin pozitif hücre sayısını azalttığı, tedavi olarak verilen enalaprilin bu hücrelerin sayısını arttırdığı, ileride yapılacak daha kapsamlı çalışmalarla diyabetik gastroparezis patofizyolojisinin aydınlatılmasında ghrelinin de görev alabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Diabetes mellitus, Mide, Ghrelin, Enalapril.

ABSTRACT

The Effects of Enalapril on Ghrelin Expression at Diabetic Rat Stomach Tissue

Objective: Ghrelin is a peptid hormone that is released largely from stomach and has effects on insulin secretion and glucose metabolism. The aim of this study was to determine the effects of enalapril on ghrelin expression at streptozocin (STZ) induced diabetes mellitus stomach tissues in rats.

Material and Method: We used 24 male Wistar albino rats that were 8 weeks age. The rats were divided into 4 groups that have 6 animals in each groups. No application was made to control group. To the buffer group, only 0,1 M phosphate-citrate buffer was injected intraperitoneally (i.p). To the diabetic group 50 mg/kg STZ solved in phosphate-citrate buffer was injected. In diabetes+enalapril group, 50 mg/kg STZ was injected and enalapril was given 5 mg/kg/day orally after development of diabetes. Finally rats were decapitated and stomach tissues were removed. With routine procedures, tissues were embedded in paraffine blockes. For ghrelin expression "avidin-biotin-peroxidase" method was applied. Ghrelin positive cells were counted with eyepiece gratucule and statistical analysis was performed.

Results: Statistically, the number of ghrelin positive cells did not show significant difference between control and buffer group. In comparison with control and buffer group there was decrease at diabetic group. In comparison with diabetic group, there was significant increase at diabet+enalapril group.

Conclusion: Experimental diabetes decreases ghrelin positive cells, enalapril increases ghrelin positive cells at rat stomach. It was concluded that with more further comprehensive studies, ghrelin may contribute to the elucidation of pathophysiology of diabetic gastroparesis.

Key Words: Diabetes mellitus, Stomach, Ghrelin, Enalapril.

Diyabet Mellitus (DM), insülin sekresyonu, insülinin etkisi veya her ikisindeki bozukluklardan kaynaklanan, özellikle hiperglisemi ile karakterize metabolik bir bozukluktur (1).

DM, metabolik anormalliklerin görüldüğü morbidite ve mortaliteye neden olan bir hastalık olup akut ve kronik komplikasyonlarla seyredir (2). Uzun süreli hastalık, damarların yapısını bozar (3). Bununla

¹ Yazışma Adresi: Dr. Gökhan ARTAŞ, Fırat Üniversitesi Hastanesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye
Tel: 0 424 2333555
Geliş Tarihi/Received: 02.04.2014

e-mail: gartas79@yahoo.com
Kabul Tarihi/Accepted: 23.05.2014

birlikte diyabetin yaygın görülen bir komplikasyonu olan fizyolojik obstruksiyon yokluğunda semptom oluşturan, gecikmiş mide boşalması olarak da tarif edilen gastroparezi tip 1 diyabetik hastalarda %27-65, tip 2 diyabetli hastalarda ise yaklaşık % 30 oranında görülmektedir (4).

Oksidatif stres; vücuttaki oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar lehine değişmesiyle meydana gelen çeşitli moleküler değişiklikleri ifade eder (5, 6). Oksidatif stresin özellikle yaşlanma, diyabet, üremi, kardiyovasküler hastalıklar, malnütrisyon ve kanser gibi durumlarda önemi gösterilmiştir (7).

Ghrelin, peptid yapıda bir hormon olup, 1999 yılında keşfedilmiştir (8). 28 aminoasit içeren ghrelinin, iştahın ve vücut ağırlığının fizyolojik olarak düzenlenmesinin yanı sıra, insülin ve glukoz metabolizmasında da önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür (9-11). Ghrelin dolaşımdaki glukoz seviyelerini büyüme hormonu (BH) salınımıyla, insülin direncini artırarak ve glukoneogenezisi stimüle ederek ayarlar (12). Bazı çalışmalarda ghrelinin normal ve diyabetik sıçanların pankreasından insülin sekresyonunu uyardığı tespit edilmiş olup DM'li sıçanların langerhans adacıklarındaki ghrelin immünreaktif hücre sayısının da arttığı bildirilmiştir (13).

Glukozun intravenöz uygulanması, insan ve kemiricilerde ghrelin seviyelerini baskılamak, insanlarda oral olarak verilen glukozun, insülin bağımsız olarak ghrelin seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir (14, 15).

Enalapril anjiyotensin-I'i anjiyotensin-II'ye hidrolize eden anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörü olup insülin direncini düşürmesi ve antidiyabetik etkilerinden dolayı tedavide sık olarak kullanılmaktadır (16, 17).

Bu çalışmada deneysel diyabetik sıçan mide dokusunda ghrelin ekspresyonu üzerine enalaprilin etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 31.10.2007 tarih ve 03 sayılı kararı ile etik yönden uygun bulunarak Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM) biriminde ve Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji laboratuvarında yapıldı. Çalışmada Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden (FÜDAM) temin edilen 24 adet erişkin, Wistar albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanları her grupta 6 hayvan olacak şekilde 4 eşit gruba ayrıldı.

Kontrol grubu: Bu gruba deney süresi olan 6 hafta boyunca hiçbir uygulama yapılmadı.

Tampon grubu: Bu gruba sadece 0,1 M fosfat-sitrat tamponu intraperitoneal (i.p) olarak enjekte edildi.

Diyabet grubu: Bu gruba 50 mg/kg olacak şekilde tek doz STZ 0,1 M fosfat-sitrat tamponunda (pH: 4,5) çözülürülerek i.p olarak uygulandı. Açlık kan glukoz düzeyi 250 mg/dl'yi geçen sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi.

Diyabet + enalapril grubu: Bu gruba 50 mg/kg olacak şekilde tek doz STZ 0,1 M fosfat-sitrat tamponunda (pH: 4,5) çözülürülerek i.p olarak uygulanmasından sonra diyabetin oluşumunu takiben enalapril 5 mg/kg/gün oral olarak uygulandı. Kan glukoz düzeyleri çalışma süresince glukometre ile ölçüldü.

Tüm gruplardaki sıçanlar 6 haftalık deney sonunda ketamin (75mg/kg)+xylazine (10mg/kg) anestezisi altında dekapite edildiler. Hayvanların mide dokuları % 10'luk formaldehitte tespit edilerek rutin doku takibi sonrasında parafine gömüldü. 5µm kalınlığındaki kesitler, hematoksilin-eozin ve 4 µm kalınlığındaki kesitler de avidin-biotin-peroksidaz yöntemi uygulanarak ghrelin (Ghrelin goat poliklonal IgG, Sc-10368, Santa Cruz Biotechnology, California, USA) ekspresyonu için immünohistokimyasal olarak boyanıp ışık mikroskopunda değerlendirildi. Ghrelin ile pozitif boyanmış hücreler, her bir spesmeden rastgele seçilen 5 alanda eyepiece gratikül (1X1 mm) kullanılarak sayıldı.

Elde edilen veriler ortalama±standart sapma olarak belirlendi. Tüm istatistiksel analizler SPSS version 21 programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası değerlendirme One-way ANOVA, grup içi değerlendirmede ise paired t testi kullanıldı.

BULGULAR

Kan glukoz değerleri için yapılan istatistiksel analiz sonucunda; kontrol ve tampon grupları ile karşılaştırıldığında diyabet ile diyabet+enalapril gruplarına ait sıçanların kan glukoz değerlerinde deneyin sonunda başlangıca göre anlamlı bir artış vardı (p<0.001). Diyabet grubu ile diyabet+enalapril grubu arasında değişiklik görülmedi (p>0.05). (Tablo 1).

Tablo 1. Deney hayvanlarının başlangıç ve final kan glukoz değerleri.

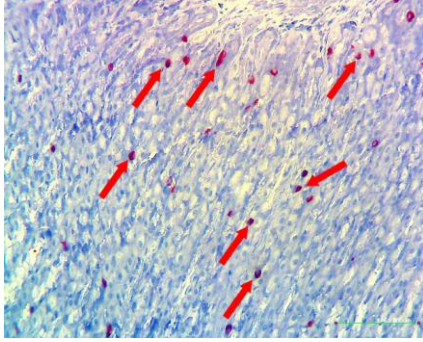
	Kontrol (n=6)	Tampon (n=6)	Diyabet (n=6)	Diyabet+ Enalapril (n=6)
Başlangıç kan glukozu (mg/dl)	95,25±2,62	93,50±4,65	91,75±2,50	92,00±5,47
Final kan glukozu (mg/dl)	97,50±1,29	94,50±4,65	432,75±1,70 ^a	428,75±8,53 ^a

Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

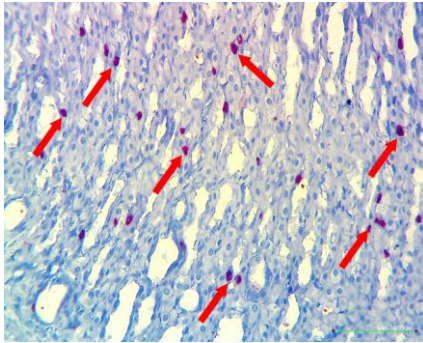
^a Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı (p<0.001).

Ghrelin pozitif hücreler için yapılan istatistiksel analizde kontrol ve tampon grupları arasında (Resim 1, 2) farklılık izlenmedi (p>0.05). Kontrol ve tampon

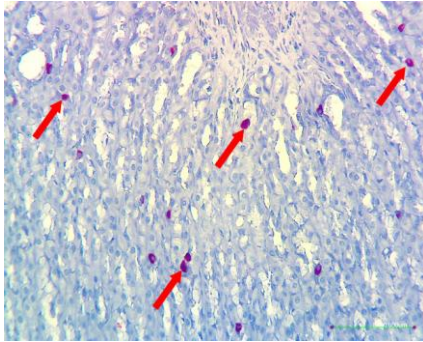
grupları ile karşılaştırıldığında diyabet grubunda belirgin azalma görüldü (Resim 3) ($p<0.001$). Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında diyabet+enalapril grubunda anlamlı bir artış vardı ve kontrole yakındı (Resim 4) ($p<0.001$) (Tablo 2).



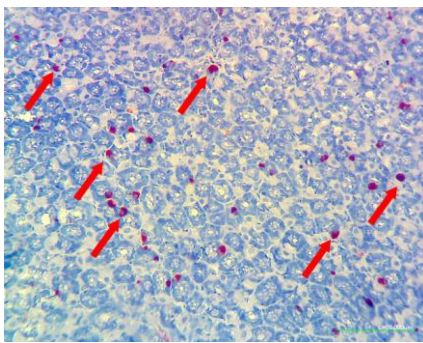
Resim 1. Kontrol grubu mide dokusunda ghrelin pozitif hücreler (→).



Resim 2. Tampon grubu mide dokusunda ghrelin pozitif hücreler (→).



Resim 3. Diyabet grubu mide dokusunda azalmış ghrelin pozitif hücreler (→).



Resim 4. Diyabet + enalapril grubu mide dokusunda ghrelin pozitif hücreler (→).

Tablo 2. Ghrelin pozitif hücre sayıları.

	Kontrol (n=6)	Tampon (n=6)	Diyabet (n=6)	Diyabet+ Enalapril (n=6)
Ghrelin pozitif hücre sayısı	11,00±2,58	10,50±1,29	4,00±,81 ^{ab}	9,75±1,25 ^c

Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre,

^b Tampon grubuna göre,

^c DM grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.001$).

TARTIŞMA

DM, günümüz insanının yaşam şartlarından dolayı tüm dünyada hızla yayılan, yüksek mortalite ve morbidite riski taşıyan bir hastalıktır. Yapılan çalışmalarda deneysel olarak diyabet oluşturulan ratlarda ve diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin (ROS) ve lipid peroksidasyonun önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin diyabet etiolojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir (18).

DM, artmış ROS üretimi, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersizliği ve sonuç olarak artmış oksidatif stresle bağlantılıdır (19, 20). Artmış ROS üretiminin hiperglisemi haricindeki nedenleri iskemi, artmış mitokondrial kaçak, katekolamin oksidasyonu ve lökositlerdir (19).

Kardiyovasküler, serebrovasküler ve nefrotik komplikasyonlar DM'nin en önemli mortalite ve morbidite nedenleri arasındadır (21). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda yağ dokusundan kaynaklanan adipokinlerin obezitenin komplikasyonları olan hiperlipidemi, DM, hipertansiyon, ateroskleroz ve kalp yetmezliği gibi hastalıkların patogenezinde rol oynadıkları gösterilmiştir (1).

Ghrelin oksintik bezlerden salgılanmakta olup bu bezler mide korpus ve fundusunun iç yüzeyinde bulunurlar ve mide proksimalinin % 80'ini oluşturur (22, 23). Ghrelin sekresyonunun düzenlenmesindeki en önemli faktör beslenmedir. Plazma seviyeleri açlıkta artar ve gıda alımından sonra düşer (24, 25). Ghrelinin besinlerin kullanımı ve metabolizmaya ait hormon salgılanmasında da etkili olduğu bilinmektedir (26).

Tip II DM'de ve insülin direncine sahip DM'li hastalarda ghrelin seviyeleri düşük bulunmuştur (27, 28). Masaoka ve ark. (29) yaptıkları çalışmalarında STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda dolaşımdaki ghrelin düzeylerini yüksek bulmakla beraber mide ghrelin seviyelerini ise düşük bulmuşlardır. Bu durumun mideden dolaşıma salınan ghrelin düzeyindeki artışa bağlı olabileceği ve muhtemel negatif enerji dengesine ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir.

ACE inhibitörleri ve anjiyotensin reseptör blokörleri gibi renin anjiyotensin sistem inhibisyonu yapan ilaçlar, insülin direncini belirgin düşürmeleri ve antidiyabetik etkilerinden dolayı, günümüzde DM gelişimi açısından metabolik pozitif etkileri olan popüler ajanlar olmuşlardır (16).

Enalapril ve bu gruptaki diğer antihipertansif ilaçlar, anjiyotensin-I'i anjiyotensin-II'ye hidrolize eden ACE'yi inhibe ederler. ACE inhibitörleri, aynı zamanda güçlü bir vazodilatatör olan bradikininini aktive ettiği için vazodilatasyona sebep olurlar. Hem güçlü bir vazokonstriktör olan anjiyotensin-II'nin azalması, hem de bradikininin artması yoluyla böbrek ve kalp üzerindeki yükü azaltarak olumlu yönde etki ederler (17). ACE inhibitörleri antioksidan etkilidirler ve nikotinamid adenin dinükleotidfosfat (NADPH) oksidaz enzimini inhibe ederek okside düşük yoğunluklu lipoprotein düzeyini düşürürler (30-32). Kheradmand ve ark. (33) yaptıkları çalışmalarında ghrelinin antioksidan özelliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında deneysel diyabet oluşturulan sıçan mide dokusunda ghrelin pozitif hücrelerde belirgin azalma izlendi. Enalapril verilen grupta ise belirgin olarak artış bulundu. Bu gruptaki artmış ghrelin hücre sayısı enalaprilin antioksidan etkisi aracılığıyla gerçekleşmiş olabilir.

Gastroparezi olarak adlandırılan gecikmiş mide boşalması DM hastalarında sık görülmekte olup

retinopati, nöropati ve nefropati gibi komplikasyonlarla birlikte göstermektedir (34). Çalışmamızda, diyabetik sıçan mide dokusundaki azalmış ghrelin seviyeleri gastropareziyi başlatan bir neden olarak değerlendirilmiştir. Ghrelinin intravenöz uygulanmasının sıçanlarda bazal gastrik asit sekresyonunu ve gastrik motiliteyi doza bağlı olarak arttırdığı, subkutan uygulanmasının bazal gastrik asit sekresyonuna etki göstermediği bildirilmiştir (35-38).

Sonuç olarak; deneysel diyabetin sıçan mide dokusunda ghrelin pozitif hücre sayısını azalttığı, bunun da muhtemelen negatif enerji dengesi ve oksitativ strese bağlı olabileceği ayrıca tedavi olarak verilen enalaprilin ghrelin pozitif hücre sayısını arttırdığı, bunu da enalaprilin antioksidan etkisi aracılığıyla gerçekleştirebileceği düşünülmüştür. DM'nin önemli bir komplikasyonu olan diyabetik gastroparezi patofizyolojisinin aydınlatılmasında ghrelinin de rol alabileceği kanaatine varılmış olup ileride yapılacak daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Yenigün M. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2001; 237-43.
2. Hawa MI, Picardi A, Costanza F, et al. Frequency of diabetes and thyroid autoantibodies in patients with autoimmune endocrine disease from Cameroon. *Clin Immunol* 2006; 118: 229-32.
3. Altuntaş Y. Diabetes mellitus'un tanımı, tanısı ve sınıflaması. Yenigün M (editör). Her yönüyle diabetes mellitus. 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2001; 51-62.
4. Parkman HP, Yates K, Hasler WL, et al. Similarities and differences between diabetic and idiopathic gastroparesis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011; 9: 1056-64.
5. Ronco C, La Greca G. Vitamin E bonded membrane, a further step in dialysis optimization. *Contrib Nephrol* 1999; 127: 1-31.
6. Sies H. Oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; 82: 291-5.
7. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Türk Biyokimya Dergisi* 2006; 31: 51-6.
8. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-60.
9. Muccioli G, Tschöp M, Papotti M, Deghenghi R, Heiman M, Ghigo E. Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur J Pharmacol* 2002; 440: 235-54.
10. Jarkovska Z, Hodkova M, Szamova M, et al. Plasma levels of active and total ghrelin in renal failure: a relationship with GH/IGF-I axis. *Growth Horm IGF Res* 2005; 15: 369-76.
11. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5992.
12. Muller AF, Janssen JA, Hofland LJ, et al. Blockade of the growth hormone (GH) receptor unmasks rapid GH-releasing peptide-6-mediated tissue-specific insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 590-3.
13. Adeghate E, Ponery AS. Ghrelin stimulates insulin secretion from the pancreas of normal and diabetic rats. *J Neuroendocrinol* 2002; 14: 555-60.
14. McCowen KC, Maykel JA, Bistran BR, Ling PR. Circulating ghrelin concentrations are lowered by intravenous glucose or hyperinsulinemic euglycemic conditions in rodents. *J Endocrinol* 2002; 175: 7-11.
15. Briatore L, Andraghetti G, Cordera R. Acute plasma glucose increase, but not early insulin response, regulates plasma ghrelin. *Eur J Endocrinol* 2003; 149: 403-6.
16. Gress TW, Nieto FJ, Shahar E, Wofford MR, Brancati FL. Hypertension and antihypertensive therapy as risk factors for type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis Risk in Communities Study*. *N Engl J Med* 2000; 342: 905-12.
17. Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm* 2007; 13: 9-20.
18. Pitkanen OM, Martin JM, Hallman M, Akerblom HK, Sariola H, Andersson SM. Free radical activity during development of insulin dependent diabetes mellitus in the rat. *Life Science* 1992; 50: 335-9.
19. Pfaffly JR. Diabetic complications, hyperglycemia and free radicals. *Diabetic complications* 2001; 77: 1-18.
20. Van Dam PS, Bravenboer B. Oxidative stress and antioxidant treatment in diabetic neuropathy. *Neuroscience Research Communications* 1997; 21: 41-8.
21. Tuzun M. *Endokrinoloji El Kitabı*. İzmir: Ege Üniversitesi, 2004.

22. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. Çavuşoğlu H, Yeğen BÇ (Çeviri Editörleri). 11. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2006: 795-6.
23. Sachs G, Zeng N, Prinz C. Physiology of isolated gastric endocrine cells. *Annu Rev Physiol* 1997; 59: 234-56.
24. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001; 50: 1714-9.
25. Tschöp M, Wawarta R, Riepl RL, et al. Postprandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 2001; 24: 19-21.
26. Itoh FT, Komatsu T, Kushibiki S, Hodate K. Effects of ghrelin injection on plasma concentrations of glucose, pancreatic hormones and cortisol in Holstein dairy cattle. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2006; 143: 97-102.
27. Purnell JQ, Weigle DS, Breen P, Cummings DE. Ghrelin levels correlate with insulin levels, insulin resistance, and high-density lipoprotein cholesterol, but not with gender, menopausal status, or cortisol levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 5747-52.
28. Pöykkö SM, Kellokoski E, Hörkkö S, Kauma H, Kesäniemi YA, Ukkola O. Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 2546-53.
29. Masaoka T, Suzuki H, Hosoda H, et al. Enhanced plasma ghrelin levels in rats with streptozotocin-induced diabetes. *FEBS Lett* 2003; 541: 64-8.
30. Berry C, Anderson N, Kirk AJ, Dominiczak AF, McMurray JJ. Renin angiotensin system inhibition is associated with reduced free radical concentrations in arteries of patients with coronary heart disease. *Heart* 2001; 86: 217-20.
31. Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol* 2005; 4: 5.
32. Onozato ML, Tojo A, Goto A, Fujita T, Wilcox CS. Oxidative stress and nitric oxide synthase in rat diabetic nephropathy: effects of ACEI and ARB. *Kidney Int* 2002; 61: 186-94.
33. Kheradmand A, Alirezaei M, Birjandi M, 2010. Ghrelin promotes antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in the rat ovary. *Regul Pept* 2010; 162: 84-9.
34. Camilleri M, Bharucha AE, Farrugia G. Epidemiology, mechanisms, and management of diabetic gastroparesis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011; 9: 5-12.
35. Levin F, Edholm T, Ehrström M, et al. Effect of peripherally administered ghrelin on gastric emptying and acid secretion in the rat. *Regul Pept* 2005; 131: 59-65.
36. Edholm T, Levin F, Hellström PM, Schmidt PT. Ghrelin stimulates motility in the small intestine of rats through intrinsic cholinergic neurons. *Regul Pept* 2004; 121: 25-30.
37. Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, et al. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 905-8.
38. Nakazato M, Murakami N, Date Y, et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; 409: 194-8.