T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# DENEYSEL DİYABETTE DİŞİ SIÇAN AORTUNDA TGF β1 EKSPRESYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ ve AORT KATMANLARININ ÖLÇÜMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

**Gökhan CÜCE**

**DOKTORA TEZİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (TIP)**
**ANABİLİM DALI**

**Danışman**

**Prof. Dr. Serpil KALKAN**

**KONYA- 2010**

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# DENEYSEL DİYABETTE DİŞİ SIÇAN AORTUNDA TGF β1 EKSPRESYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ ve AORT KATMANLARININ ÖLÇÜMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

**Gökhan CÜCE**

**DOKTORA TEZİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (TIP)**
**ANABİLİM DALI**

**Danışman**

**Prof. Dr. Serpil KALKAN**

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 09202041 proje numarası ile desteklenmiştir.

**KONYA- 2010**

## ii. ÖNSÖZ

Doktora eğitimimin ve tez hazırlığının her aşamasında desteğiyle her türlü zorlukların üstesinden gelmemi sağlayan Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Hasan Cüce'ye, doktora eğitimim boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen sayın hocalarım Prof. Dr. Selçuk Duman, Prof. Dr. Aydan Canbilen ve Doç Dr. Tahsin Murad Aktan'a teşekkürlerimi arz ederim.

Tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yard. Doç. Dr. Hasan Esen'e ve Histoloji- Embriyoloji Anabilimdalı'nda birlikte eğitim aldığımız bütün arkadaşlarıma, tezimle ilgili bütün harcamaları karşılayan Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne, sevgi ve özveriyle bugünlere gelmemi sağlayan ve her zaman yanımda olan aileme teşekkürü borç bilirim.

## iii. İÇİNDEKİLER


| | | Sayfa |
|---|---|---|
| **1. GİRİŞ** | | 1 |
| 1.2. | Dolaşım Sistemi Histolojisi | 2 |
| 1.2.1. | Kan Damarları Bileşenleri | 2 |
| 1.2.2. | Kan Damarları Genel Yapısı | 4 |
| 1.2.3. | Arterler | 5 |
| 1.2.4. | Elastik Arterler | 6 |
| | Tunika İntima | 7 |
| | Tunika Media | 8 |
| | Tunika Adventisya | 8 |
| 1.2.5. | Aortun Yapısı | 8 |
| 1.3. | Dolaşım Sistemi Embriyolojisi | 9 |
| 1.3. | Kalbin Gelişimi | 9 |
| 1.3.1. | Damarların Gelişmesi | 10 |
| 1.4. | Aorta Anatomisi | 11 |
| 1.4.1. | Pars Thoracicae Aortae | 11 |
| 1.4.2. | Pars Abdominalis Aortae | 12 |
| 1.5. | Diabetes Mellitus | 12 |
| 1.5.1. | Tip 1 Diabetes Mellitus | 13 |
| 1.5.2. | Tip 2 Diabetes Mellitus | 14 |
| 1.5.3. | Diabetes Mellitus'un Patogenezi | 14 |
| 1.5.4. | Ateroskleroz | 15 |
| 1.5.5. | Deneysel Diyabet | 16 |
| 1.6. | TGF β1 | 19 |

**2. GEREÇ ve YÖNTEM** 21

2.1. Gruplar ve Deneysel Diyabet Modeli 21

2.2. Histolojik Doku Takibi ve Boyaları 22

Hematoksilen 22

Verhoeff- Van Gieson 22

İmmünohistokimyasal Metod 23

2.3. Histolojik ve Morfometrik Analiz 24

2.4. Histopatolojik Analiz 24

2.5. İstatistiksel Analiz 24

**3. BULGULAR** 25

3.1. Histolojik Değerlendirme 25

3.2. Histopatolojik Değerlendirme 25

3.3. Morfometrik Değerlendirme 28

3.4. TGF β1 Ekspresyon Sonuçları ve Değerlendirilmesi 30

**4. TARTIŞMA** 34

**5. SONUÇ ve ÖNERİLER** 40

**6. ÖZET** 42

**7. SUMMARY** 43

**8. KAYNAKLAR** 44

**9. EKLER** 50

**10.ÖZGEÇMİŞ** 51

## iv. SİMGELER VE KISALTMALAR

**A** : Arter

**AD** : Diyabetli Grubunun Abdominal Aortu

**AEC** : 3-Amino-9-Etilkarbazol

**AGE** : İlerlemiş Glikolizasyon Son Ürünleri

**AK** : Kontrol Grubunun Abdominal Aortu

**ATP** : Adenozin Trifosfat

**Ca** : Kalsiyum

**$CO_2$** : Karbondioksit

**DNA** : Deoksiribo Nükleik Asit

**ECM** : Ekstrasellüler Matriks

**ELİSA** : Enzyme- Linked Immunosorbent Assay

**GLUT2** : Pasif Glukoz Taşınmasından Sorumlu Protein

**LAP** : Latecy Associated Peptid

**LDL** : Düşük Dansiteli Lipoprotein

**LETO** : OLEFT Ratlarının Kontrol Grubu

**NAD** : Nİkotinamid- Adenin Dinükleotit

**NO** : Nitrik Oksit

**$O_2$** : Oksijen

**OLEFT:** Seçici Çiftleştirme ile Konjenital Diyabet Oluşturulan Rat Modeli

**ROS** : Reaktif Oksijen Radikali

**SH** : Sülfidril Grubu

**SOD** : Süperoksit Dismutaz

**STZ** : Streptozotosin

**TD** : Kontrol Grubunun Torakal Aortu

**TGF** : Transforming Growth Faktör

**TGF β1** : Transforming Growth Faktör Beta 1

**TK** **:** Diyabetli Grubun Torakal Aortu

**VECs** **:** Vasküler Endotel Hücreleri

**Vit** **:** Vitamin

**VSMCs :** Vasküler Düz Kas Hücresi

# 1.GİRİŞ

Diabetes mellitus günümüzde hala giderek artan önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Hastalığın insidansının ve prevalansının hızlı bir şekilde artması, insan sağlığı için önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Hastalık vücutta çok sayıda ve ciddi komplikasyonların ortaya çıkması ile karakterizedir. Bu komplikasyonlar diyabetli bireylerin yaşamında önemli sorunlara neden olmaktadır (King 2008). Diyabetin komplikasyonları birçok organ ve dokuyu etkilemekte; retinopati, nöropati, nefropati, periferal vasküler hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar ve felce neden olabilmektedir (Vinik ve Vinik 2003).

Diyabette ölümlerin ana sebebi makroanjiyopati ve büyük damarların hastalıklarıdır (Squadrito ve Cucinotta 1991). Hastalıkta kontrol edilemeyen hiperglisemi damar duvarında intimal kalınlaşma ve aterosklerozise neden olmaktadır ( Popov ve Constastinescu 2008). Hiperglisemi, vasküler hücrelerin fonksiyonlarını; koagülasyon faktörleri, adhezyon molekülleri, büyüme faktörleri ve enzimler gibi çeşitli faktörlerin üretimini değiştirerek modifiye etmektedir. Diyabette vasküler değişikliklerde yer alan büyüme faktörleri içerisinde TGFβ1 olumlu bir aday olarak öne çıkmaktadır. Son çalışmalarda TGFβ1'in diyabetin nefropati ve makrovasküler komplikasyonlarında önemli rolleri olduğu belirtilmektedir (Pueyo ve ark 2004).

TGFβ1'in normal vasküler yapıyı sürdüren ve aterosklerozdan koruyan önemli bir sitokin olduğu ve hem aterosklerotik hem de anti-aterosklerotik özelliğe sahip olduğuna dair farklı görüşler bulunmaktadır (Ortega ve ark 2007, Watanabe ve ark 2007). Dolayısıyla TGFβ1'in hala diyabetik vasküler hastalıklardaki rolü tam olarak aydınlatılamamıştır.

Çalışmamızda kontrol ve deneysel diyabet oluşturulmuş sıçan gruplarında abdominal ve torasik aortta multifonksiyonel bir sitokin olan TGFβ1 ekspresyonu incelendi. Ayrıca damar duvarında tunika intima ve tunika media tabakalarının kalınlığı oküler mikrometre ile ölçüldü ve aralarındaki ilişkinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Literatürde deneysel diyabette aortun farklı segmentlerinde TGFβ1 ekspresyonunu ortaya koyan ve damar duvar kalınlıkları ile ilişkisini karşılaştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Diyabette damar duvarı yapısında meydana gelecek değişikliklerin ortaya çıkarılması ve TGFβ1 ekspresyonu ile ilişkisinin değerlendirilmesi gelecekte hastalığın doku ve organlar üzerinde oluşturacağı yapısal değişikliklerin yorumlanmasına ışık tutacaktır.

### 1.2. Dolaşım Sistemi Histolojisi

Çok hücreli organizmalar $O_2$, besin materyalleri ve hormonların dokulara dağıtılması, $CO_2$ ve dokuların diğer metabolizma ürünlerinin toplanması ve bunların boşaltım organlarına iletilebilmesi için bir mekanizmaya gereksinim duyarlar. Omurgalılarda bu önemli fonksiyon kalp damar sistemi ile gerçekleştirilir. Bu sistem kardiyovasküler sistem olarak isimlendirilir. Kaslardan oluşan bir pompa olan kalp ve iki devamlı tubuler damar sisteminden oluşmaktadır. Bu sistemlerden bir tanesi olan pulmoner dolaşım, akciğerlere kanı getirme ve götürme işlevini, diğeri olan sistemik dolaşım ise vücudun diğer tüm organ ve dokularından toplama ve dağıtma işlevini gerçekleştirir. Bu iki dolaşım sistemi içinde sırasıyla kan kalpten geniş arterlere, küçük arterlere, arteriollere, kapillerlere, venüllere, küçük venlere ve geniş venlere pompalanır ve kalbe geri döner. Kan ile solunum havası ve diğer dokular arasında ince duvarlı kapillerler ve venüller arasında değişim gerçekleşir. Çoğu organda kan damar sisteminin kapiller ağı, lenfatik sistemin kapiller pleksusuyla paralel gitmektedir. Lenf sistemi dokular arası sıvıları kan dolaşımına tekrar geri verir (Bloom ve Fawcett 1968).

#### 1.2.1. Kan Damarları Bileşenleri

Kan damarlarının tabakalı yapısı iki fonksiyonel faktörün etkisinde kalarak bulunduğu alana göre farklılıklar gösterir. İlki mekanik faktörlerdir, özellikle kan basıncı büyük damarlarda etkisini göstererek elastik ve musküler doku bileşenlerinin düzenlenmesini ve miktarını belirler. İkincisi metabolik faktörler olup dokuların lokal ihtiyaçlarına göre bir şekillenme söz konusudur. Özellikle kan-doku

alışverişine aracılık eden mikrodamarlarda yani kapillerler ve postkapiller venüllerde gerçekleşir. Bu seviyede sadece yapısal elementler olarak endotel ve bazal lamina bulunmaktadır. İzole edilmiş anatomik yapılar şeklinde bulunan büyük damarların aksine kapillerler ve venüller yapısal ve fonksiyonel olarak destekledikleri dokunun bir parçası gibi gözükürler.

Endotel: Kan damarlarının iç yüzeyi tek katlı yassı hücrelerden oluşan bir tabaka ile örtülüdür. Endotel hücreleri (VECs) birbirlerine sıkı ve ara hücreler arası bağlantılar ile bağlanmışlardır. Sıkı bağlantılar, bitişik endotel hücreleri arasındaki mekanik bağlantıyı sağlarlar ve hücreler arası boşluğa geçirgenliği kontrol ederler. Ara bağlantılar ise hücreler arasında iletişimi sağlar. Her vasküler bölüm karakteristik olarak organize olmuştur ve damar uzunluğu boyunca endotel bağlantıları çeşitli derecelerde değişken geçirgenliği yansıtır. Endotel hücreleri poligonal şekillidir. Endotel hücreleri ve onların uzamış belirgin çekirdekleri damarın uzun ekseni boyunca yerleşmiştir (Weiss ve Greep 1977). Anjiyotensin I endotel hücreleri tarafından Anjiyotensin II'ye dönüştürülür. Bradikinin, serotonin, prostoglandinler, norepinefrin ve trombin gibi maddelerin biyolojik olarak tepki vermeyen bileşiklere dönüştürülmesini sağlar. Lipoproteinleri trigliseridlere ve kolesterole parçalar. Bunu yüzeyinde bulunan enzimler aracılığı ile yapar. Nitrik oksit (NO), endotelinler gibi damar gerginliği üzerine etkili bazı maddelerin üretilmesinde görevlidir.

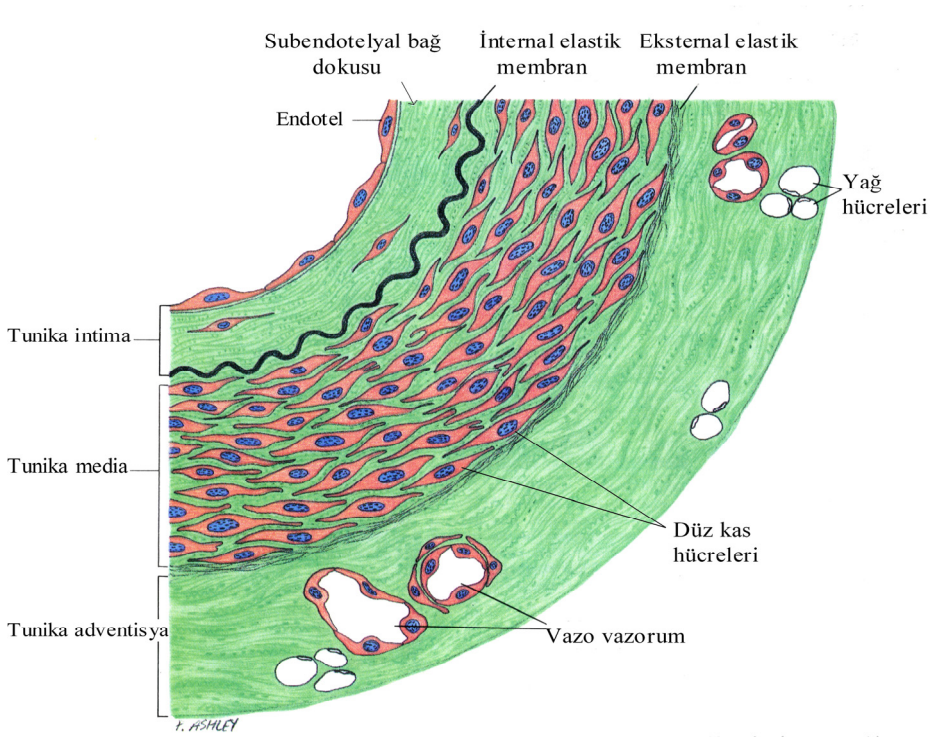
Damar Düz Kas Hücreleri (VSMCs): Perisitli venüller ve kapiller dışında bütün damarlarda düz kas hücreleri mevcuttur. Tunika media tabakasında sarmal oluştururlar ve çok sayıdadırlar (Junqueira ve Carneiro 2009). Çeşitli uyarımlara kasılma ya da gevşemeyle cevap verirler. Kollajen, elastin ve proteoglikan sentezleyebilme yenetekleri bulunur. Ayrıca büyüme faktörleri ve sitokinleri salgılama özellikleri de bulunmaktadır (Kumar ve ark 2003).

Damar Bağ Dokusu: Kan damarlarının duvarlarında lokalizasyona göre değişebilen oranlarda bağ dokusu bileşenleri bulunmaktadır. Kollajen lifler kas hücrelerinin arasına ve adventisyaya dağılmış olarak bulunurlar. Subendotelyal tabakada çok az oranda bulunurlar.

Elastik lifler kalbe yakın damarların duvarında bol miktarda bulunur. Damarın kasılmasında ve gevşemesinde rolleri bulunmaktadır. Lameller şeklinde organize olarak tüm media tabakası boyunca uzanırlar.

Ekstrasellüler madde heterojen jel yapısındadır ve damar duvarlarının fiziksel özelliklerini desteklemektedir. Difüzyonu zorlaştırdığı düşünülmektedir. Arterlerin içerdiği glikozaminoglikan miktarı venöz damarlardan daha yüksektir (Junqueira ve Carneiro 2009).

### 1.2.2. Kan Damarlarının Genel Yapısı




Şekil 1.1. Kan damarı genel yapısı ve organizasyonu (Leeson ve ark 1988)

Tunika İntima: Endotel, bazal lamina ve subendotelyal tabakalardan oluşur. Subendotelyal tabaka küçük arteriyollerde bulunmamaktadır, düz kas hücresi bulundurabilir, gevşek bağ dokusu yapısındadır.

Tunika Media: Düz kas hücrelerinin oluşturduğu konsantrik tabakalardan oluşur. Kas hücrelerinin arasında elastik, retiküler lifler ve proteoglikanlar bulunmaktadır. Ekstraselüler matriks (ECM) genellikle düz kas hücreleri tarafından sentezlenir.

Tunika Adventisya: Bağ dokusundan oluşur. Tip 1 kollajen ve elastik liflere sahiptir. Sorumlu oldukları organın bağ dokusuyla birleşir.

Media ile diğer iki tabaka arasında elastik liflerden oluşan elastik membranlar bulunur. Membrana elastika interna, intima ile media tabakaları arasında bulunan laminadır. Membrana elastika eksterna daha büyük arterlerde media ile adventisya tabakaları arasında bulunan laminadır. Membrana elastika eksterna, membrana elastika internadan daha incedir.

Vazo Vazorum: Büyük damarlarda medianın dış bölümünde ve adventisyada çok miktarda bulunur. Vazo vazorum, damarın damarı olarak bilinir. Çapı büyük arterlerin beslenmesi, diffüzyonun yeterli olmaması ve zorlaşması nedeniyle vazo vazorumlarla sağlanır. Venlerde arterlere göre daha çok sayıda olması, venöz kanın bileşiminden kaynaklanmaktadır. Lenfatik kapillerler sadece arterlerin adventisyasında mevcuttur (Junqueira ve ark 1993).

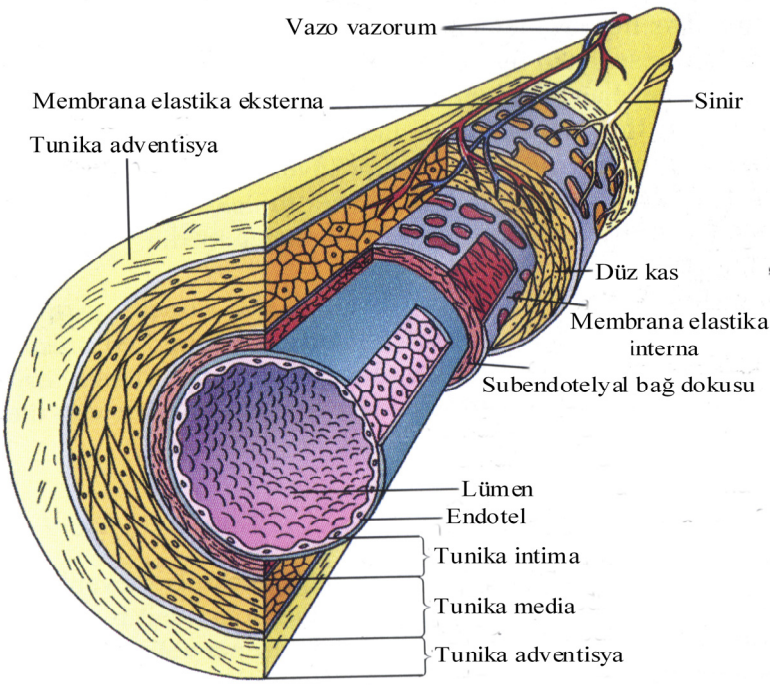
### 1.2.3. Arterler

Kanı kalpten kapillerlere taşıyan arterler 3 grupta incelenir.

Elastik Arter (İletici Arter): Arterlerin en büyükleridir. Kalpten muskuler arterlere kan taşımasından dolayı iletici arterler de denir. Yapısında elastik lif bol bulunur. Esneklik sağlayarak arterlerin gerilmesini ve aynı zamanda sistol ve diyastol sırasında kan basıncının devamlılığını sağlar.

Müsküler arter: (Dağıtıcı Arter) : Elastik arterler dışındaki arterlerin hepsi bu grupta bulunmaktadır. Yapısının büyük çoğunluğunu düz kaslar oluşturmaktadır.

Arteriyoller: Çapı 100 mikrometreden küçük arterlerin hepsine arteriyol ismi verilir. Sonlandığı noktada metarteriyol ismini alır. Kanın kapillerlere aktarıldığı bölümdür. Termoregülasyon ve kan basıncının ayarlanmasında fonksiyonları bulunmaktadır.

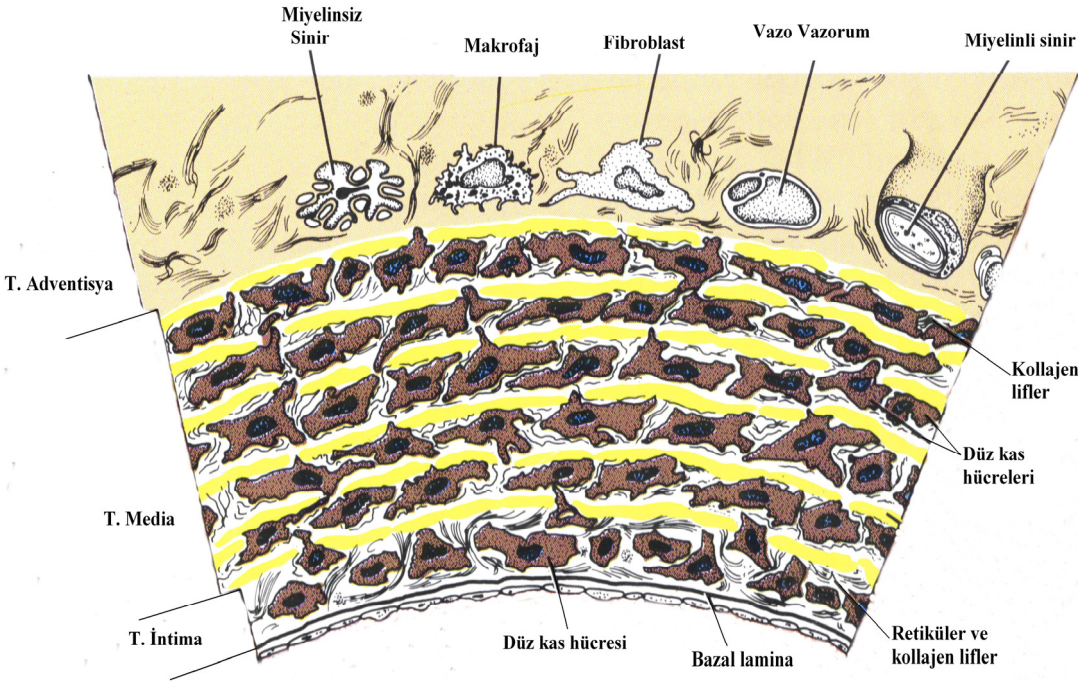



Şekil 1.2. Tipik Arter yapısı (Gartner ve Hiatt 1997)

Kapillerler: 8-10 mikrometre çapında en küçük damarlardır. Perisitler tarafından kuşatılmış endotel hücreleri ve üzerine oturduğu bazal laminadan oluşurlar. Venüllerle beraber kan akımı ve dokular arasında alışverişi sağlar. Devamlı, pencereli ve sinüzoidal olmak üzere 3 tip kapiller bulunmaktadır (Gartner ve Hiatt 2009) .

### 1.2.4. Elastik Arterler

Aorta ve aortun büyük dalları a. subklavia, a. pulmonalis, a. karotis kommunis büyük arterler grubuna dâhildir. Çapları 7 mm'den fazladır. Elastik arterlerde damar duvarı çapına oranla daha incedir.




Şekil 1.3. Elastik arterin yapısındaki hücreler ve hücre dışı matriks bileşenleri görülmektedir (Ross ve ark 1989)

**Tunika İntima**

Müsküler arterlere göre daha kalın bir intima tabakasına sahiptir.

Endotel: Poligonal şekle sahip endotel hücreleri mitozla çoğalıp sürekli yenilenmektedir. Sahip oldukları sitoplazmik uzantılar mediadaki düz kas hücreleriyle miyoendoteliyal bağlantılar yaparlar böylece kan ve media tabakaları arasında bir köprü gibi görev yaparak madde alışverişini kolaylaştırmaktadır.

Subendotel: Esas olarak kollajen liflerden oluşmuştur. Damarın kasılma ve gevşemesinde rol alırlar. Kollajen liflerin longitudinal seyirli olması avantaj sağlamaktadır. Bileşenleri arasında elastik lifler çok sayıda, kolajen lifler ve düz kas hücreleri ise daha az sayıda bulunmaktadır. İntima ve media sınırında elastik lifler birleşerek membrana elastika internayı oluşturur. Büyük elastik arterlerin media tabakasında elastik liflerin çok sayıda bulunması nedeni ile membrana elastika interna ayrımı kesin olarak yapılamaz.

**Tunika Media**

Bol miktarda bulunan elastik lifler birleşerek belli aralıklarla elastik membranları oluştururlar. Pencereli elastik membranların arasında düz kas hücreleri ve kollajen lifler bulunur. Yaşlanmayla birlikte elastik membranların sayısı artmaktadır (Kalaycı 1986). Düz kas hücreleri elastik, retiküler, kollajen lifleri ve proteoglikanları sentezler (Ottowa Üniversitesi 2010).

**Tunika Adventisya**

Elastik lifler arasına yerleşmiş kalın kollajen lif demetleri içerir. Kollajen lifden zengin elastik liften fakirdir. Çok ince ve gevşek bağ dokusu yapısındadır (Kalaycı 1986).

Düz kas hücreleri tunika mediada elastik membranların arasına girer ve muskuloelastik bir yapı oluşturur. Bu sistem kan damarlarının çapını düzenler. Ayrıca tunika mediaya, adventisyada bulunan vazo vazorumun kapillerleri girmez, beslenmesi diffüzyonla gerçekleşir. Genel olarak kalpten uzaklaştıkça elastik liflerin miktarı artar (Artan 1982).

**1.2.5. Aortun Yapısı**

Aort damar duvarında uzunluğu artmış olan düz kas hücreleri kollajen I, II ve IV ile komşu elastik lamelle bağlantı kurar. İnternal elastik membran ayırımı yapılamaz. Elastik lamellerle döşeli olduğu için ayrı bir eksternal elastik lameli bulunmamaktadır. Adventisyası vazo vazorum, sinir lifleri, adipositler ve lenfatiklere sahiptir. Abdominal aortta anevrizma ve dilatasyon daha kolay gelişir (Ovalle ve Nahirney 2009) . Kalpten gelen kanın basıncı çok yüksektir. Arterlerin sistol sırasında elastik laminaları genişler ve böylece kan basıncını düşürürler. Diyastol sırasında da geri gelerek arteriyel basıncın ve kan akımının periferde devamı sağlanır (Kierszenbaum 2006) .

## 1.3. Dolaşım Sistemi Embriyolojisi

### 1.3.1. Kalbin Gelişmesi

Çok hızlı gelişen embriyoda kardiyovasküler sistem ilk olarak şekillenen sistemdir. Hızlı bir şekilde gelişen embriyonun doğal olarak besin ihtiyacı da artmaktadır. 3,5 haftaya kadar difüzyonla beslenen embriyo, artık difüzyonla besin ihtiyaçlarını karşılayamaz hale gelir. Besin ihtiyaçları embriyoda yeni bir sistemin yani damar sisteminin gelişmesini tetikler.

İlk olarak epiblastta yer alan hücreler göç eder ve bukkofarengeal membran ve nöral katlantıların önünde lateral plak mezoderminin splanknik tabakasına yerleşirler ve kardiyak miyoblastlara dönüşürler. Eş zamanlı olarak mezodermde oluşan kan adacıklarından kan hücreleri ve kan damarları şekillenir. Oluşan bu hücre topluluklarının bir araya gelmesiyle at nalını andıran myoblastların çevrelediği ve endotelle döşenmiş endokardiyal kalp tüpleri oluşur. Artık bu alan kardiyojenik alan olarak isimlendirilir ve bu alanın üstündeki embriyo içi boşluk zamanla perikardiyal boşluğu oluşturur. Embriyonun iki tarafında, ortasına yakın ve paralel olarak şekillenen kan adacıklarından gelişen damar çiftine dorsal aorta denilmektedir.

Bukkofaringeal bölge ve nöral plakların önünde yerleşmiş olan kardiyojenik alan, embriyonun sefalik yönde katlanmasıyla yer değiştirir. Kalp ve perikardiyal boşluk önce servikal alana sonra da toraksa doğru kayar. Lateral yöne katlanma, iki taraflı bulunan primordial kalbin kaudal uçları hariç olmak üzere birleşmesine sebep olur. Kalp tüpünde çıkış kanalları ve ventriküler bölgeleri oluşturacak genişlemeler şekillenir (Sadler 2005) .

Tübüler kalpte şekillenen genişlemeler ve daralmalarla kalbin parçaları oluşur. Bulbus kordis, ventriküller ve atriumların oluşmasından sonra trunkus arteriozus ve sinus venozus oluşur. Trunkus arteriozus kaudalde bulbus kordis, kraniyalde de aortik kese ile devam eder. Aortik kese ise aortik arklara dallanır (Moore 1988).

Pulmoner arterin kökleri, proksimal bölümleri ve aorta trunkus arteriozusdan oluşur. Orta parça olarak isimlendirilen konus kordis ise her iki ventrikülün çıkış kanallarını oluşturur (Sadler 2005).

Dorsal aorta ilk etapta sağda ve solda birer olmak üzere bir çift şekillenmişti. Bu dorsal aort çiftinin kuyruğa yakın kısımları birleşerek tek alt torasik ve abdominal aortu meydana getirir. Geri kalan kısımdan soldaki asıl aortu oluşturur, sağdaki atrofiye uğrar (Moore ve Persaud 2009).

Arka duvara dorsal mezokardiyum ile asılı olarak durmakta olan kalpte, mezenterin orta kısmının dejenerasyonu ile perikardiyal boşluğun sağ ve sol kenarları arasında transvers perikardiyal sinüs denilen bir yapı oluşur ve ardından kalp kranial ve kaudal ucundan asılı halde bulunan bir tüp şeklini alır (Moore ve Persaud 2002). Kalp tüpü gelişirken aynı anda bombeleşir. Dıştaki myokard tabakası hyaluronik asitten zengin bir ekstrasellüler matriks sentezleyerek kalınlaşmaya başlar. Böylece endotel tabakasından ayrılır. Aynı anda epikardiyumu oluşturmak için mezoteliyal hücreler sinus venozustan kalbin üzerine doğru hareket ederler. Kalbin üç tabakalı yapısı endokard, miyokard ve epikard şekillenmiş olur (Sadler 2005).

### 1.3.2. Damarların Gelişmesi

Anjiogenez 3. haftanın başında bağlantı sapı, vitellüs kesesi ve koryonu saran ekstraembriyonik mezodermde başlar. Kan damarı oluşumunun belirtisi 17. günde vitellüs kesesinin ekstraembriyonik splanknoplörik mezoderminde, endoderm germ yaprağının gelişmesinden sonra dikkat çeker. Mezenşim kökenli anjioblastların birleşmesi sonucu kan adacıkları oluşur. Kan adacıklarındaki intersellüler alanlar birleşerek bir lümen oluştururlar. Adacıkların periferinde bulunan anjioblastlar endotel hücrelerine, adacıkların ortasındaki hücreler ise hemositoblastlara dönüşürler.

Bu yapılar daha sonra birbirleriyle birleşerek bir damar ağı oluştururlar. 3. hafta sonunda vitellus kesesi, bağlantı sapı ve koryon villuslarında vaskülarize olur. Bunlar daha sonra tomurcuklanarak yeni damarları oluştururlar (Şeftalioğlu 1998).

Beşinci haftada kalbin bulbus duvarındaki mezenşim hücreleri çoğalmaya başlar. Böylece bulbus kabartıları oluşmaya başlar. Aynı kabartılar trunkus arteriyozusta da şekillenir. Bulbus ve trunkus kabartıları 180 derece burulup kaynaşarak aortiko pulmoner septum meydana gelir (Moore ve Persaud 2009). Aortiko pulmoner septum tarafından bulbus aorta ve a. pulmonalis olarak iki bölüme ayrılmış olur. Aorta sol kalbe, a. pulmonalis sağ kalbe açılır (Kayalı 1984).

## 1.4. Aorta Anatomisi

Aorta ve trunkus pulmonalis, kalpten çıkan 2 büyük damardır. Trunkus pulmonalis akciğerlere venöz kanı götürür, aorta ise besin ve oksijenden zengin olan kanı vücuda dağıtır. Aorta vücudun en büyük atardamarıdır. Aort sol ventrikülün conus arteriosus denen kısmından çıkar. 3 parçaya ayrılır. Pars ascendens aortae, arkus aortae, ve pars descendens aortae (Odar 1979). Pars descendens aortae göğüs ve karın boşluğundan geçerken farklı isimler alır. Göğüs boşluğunda pars thoracicae aortae ve karın boşluğunda ise pars abdominalis aortae olarak isimlendirilir ve iki bölümde incelenir (Gövsa 2003).

### 1.4.1. Pars thoracicae aortae

Aorta descendes'in ilk parçası pars thoracicae olarak isimlendirilir. (Çimen 1991). Aortik arktan diyaframa kadar uzanır. İlk olarak vertebral sütunun hafifçe solunda uzanır. Diyaframa doğru orta hatta yaklaşır. Çevreleyen yapıları insandakine benzerdir, bir tek sıçanlarda kalıcı sol vena cava superior kalbe ulaşmak için aortayı çapraz geçer ve vena azygos aortanın sağında değil soluna doğru uzanır.

### 1.4.2. Pars abdominalis aortae

Diyaframı deldiği noktadan başlar ve sağ ve sol kommon iliak arterlere bölündüğü yerde biter. Vertebral sütunun orta hattı boyunca, vena cava inferiorun hafifçe solunda ve sol renal veni çapraz geçer (Greene 1963).

## 1.5. Diabetes Mellitus (DM)

İnsülinin yokluğu, azlığı veya etkisinin bozulması sonucu ortaya çıkan, lipid, karbonhidrat ve protein metabolizmasını etkileyen; makro ve mikro vasküler komplikasyonların eşlik ettiği kronik seyirli bir metabolizma hastalığıdır (Kuzuya ve ark 2002). Polipeptid karakterli bir hormon olan insülin 30 amino asite sahip B, 21 aminoasite sahip A zincirlerinin sahip olduğu sülfidril gruplarında (SH), disülfür köprülerinin kaynaşmasıyla oluşur (Vardı ve ark 2003). Kan glukoz konsantrasyonu insülin tarafından düzenlenir. Pankreasın Langerhans adacıklarının beta hücreleri insülinin kaynağıdır. Üretildikten sonra kana salgılanır. Kan dolaşımındaki insülin konsantrasyonu ve kan glukoz konsantrasyonu bir denge içindedir (Murray ve ark 1993). Kan glukozunun ayarlanmasındaki ikinci süreçte bir kısım dokular görevlidir. İnsülin; adipoz doku, müsküler doku ve karaciğer hücrelerinde bulunan insülin reseptörlerine bağlanarak glukozun bu doku ve organlar tarafından alınmasını sağlar (Ayvaz 2003).

Glukozun karaciğer ve kaslarda glikojen şeklinde depolanmasını insülin sağlar. Yağ dokusunda insülin glikojene çevrilemeyen fazla karbonhidratı da yağlara dönüştürerek yağ dokusunda depo edilmesini sağlar. Hücreler tarafından aminoasitlere alınan insülinin, bu aminoasitlerin proteinlere çevrilmesi üzerinde önemli bir etkisi bulunmaktadır. Ayrıca hücre içinde daha önce sentezlenmiş proteinlerin devamlılığını sağlar ve protein yıkımını önler (Guyton ve Hall 1996). İnsülinin bu etkileri dikkate alındığında; eksikliğinde hiperglisemi ve fazlalığında ise hipoglisemi oluşmaktadır (Demirkazık ve Gültürk 2006). Diabetes mellitus tip I (insüline bağımlı) ve tip II (insüline bağımlı olmayan) olmak üzere iki gruba ayrılır (Haas 1998).

### 1.5.1. Tip 1 Diabetes Mellitus

Tip 1 diyabet pankreasta bulunan insülin üreten beta hücrelerinin otoimmün bir süreç sonunda zedelenmesi ile meydana gelmektedir (Kuzuya ve ark. 2002, Wang ve She 2008). Beta hücre yıkımı sonucunda insülin azlığı veya yokluğu oluşur. Ancak insülin reseptörlerinde insüline karşı normal cevap göze çarpar (Haas 1998).

Kronik hipergliseminin oluşabilmesi için beta hücrelerinin % 90'dan fazlasının tahrip olması gerekmektedir. Kronik hiperglisemi oluşumuna kadar geçen süreç içinde, bu süreci etkileyen üç ana faktörden söz edilebilir.

Çevresel faktörler: diyet, stres, viruslar ve toksinlerdir.

Genetik faktörler: çevresel faktörler, genetik olarak yatkın bireylerde beta hücrelerine yönelik otoimmun hasar ve bunu izleyerek oluşan inflamatuvar olayları başlatır.

Otoimmunite: Tip 1 DM'li hastalarda sağlam kalan adacıklarda insülitis tespit edilmiştir. Fakat diğer endokrin hücreler ve ekzokrin hücreler hasar görmemiştir. Bu histopatolojik tablonun otoimmun bir mekanizma sayesinde oluştuğunun ispatıdır (Ayvaz 2003).

Genellikle çocukluk ve adolesan yaşta başlayan hastalıkta vakaların büyük bir çoğunluğu 30 yaşın altındadır. Tip 1 DM kendi içinde iki gruba ayrılır. Otoimmün (Tip 1A) tipte pankreas beta hücresinin değişik unsurlarına karşı otoantikorlar bulunur: 38 K ve 52 karboksipeptidaz H (K-CPH), insülin, tirozin fosfataz, adacık hücresi otoantikorları ve glutamik asit dekarboksilaz antikorları bunlardan bazılarıdır. Hastaların çoğunluğunda bu antikorlar teşhis sürecinde bulunabilir ancak pankreasın tahribatıyla yok olurlar (Orhan ve Özbey 2002). Beta hücrelerinden insülin sekresyonunu azaltan sitokinlerin faaliyetleri ile de otoimmun Tip 1 DM gelişebilmektedir. İdiyopatik DM'ta (Tip 1B) otoimmun beta hücresi yıkımı yoktur ve immünolojik veriler elde edilemez. İnsülin düzeyleri düşmüştür ve insüline karşı direnç de bulunmaz (Abacı ve ark 2007).

### 1.5.2. Tip 2 Diabetes Mellitus

Tip 2 diyabet ise azalmış insülin sekresyonu ve azalmış insüline direncin oluşturduğu kombinasyonlarla karakterizedir. İnsülinin etkisi kaybolmuştur (Ize ve Sperling 2005). İnsülin rezistansı ve bozulmuş glukoz toleransı Tip 2'nin oluşmasında önde gelen sebeplerdir. Obeziteyle yakından ilişkilidir. Her obezde tip 2 diyabet gelişmemesine rağmen genetik duyarlılık ve çevresel faktörler arasındaki etkileşim sonucu ortaya çıkabilir. Yağ dokusu tarafından salınan birçok hormon ve yangı faktörü, diyabet gibi birçok bulaşıcı olmayan hastalıkla ve obezite arasında bir ilişkinin olduğunu göstermektedir. Belirgin lipoliz ve sonrasında oluşan yağ asitleri insülinin sinyal yolunu bloklayabilir (Reinmann ve ark 2009). Tip 2 DM'nin görülme sıklığı mortalite ve morbidite oranlarını arttırmaktadır. DM başlığı altındaki hastaların % 90'ı bu gruptadır. Hastalar içinde yaş ortalaması orta yaş olarak belirtilmiştir (Azezli ve Orhan 2008). Tip 2 DM yıllarca teşhis edilemeyebilir çünkü çoğunlukla diyabetin sert ve fark edilebilir semptomları ortaya çıkmadan seyredebilir (Alberti ve Zimmet 1998).

### 1.5.3. Diabetes Mellitus'un Patogenezi

DM'de kronik hipergliseminin makro ve mikrokomplikasyonların oluşmasındaki süreçte rol aldığı belirtilmektedir (Huebschmann ve ark 2006). Hiperglisemi sürdükçe kan damarlarının duvarlarında glukozun kollajen, hemoglobin ve proteinlerle oluşturduğu glikolizasyonun bir sonucu olarak, kimyasal olarak geri dönüştürülemeyen glikolizasyon son ürünleri oluşur (Öztürk ve ark 2002). Fizyolojik koşullarda glikozillenmiş proteinlerden reaktif oksijen radikallerinin oluştuğu sanılmaktadır ( Özgüneş ve Atasayar 2009)**.** Fizyolojik olarak serbest radikaller vücutta bulunan antioksidan enzimlerle etkisiz hale getirilir. Bu enzimlerden bazıları katalaz, SOD, glutatyon peroksidazdır. Ayrıca karotenler, flavonoidler, vitamin E ve C de serbest radikalleri etkisizleştirme sürecine katılmaktadır. Hastalık harici antioksidanlar ve serbest radikaller arasındaki denge korunur. Hipergliseminin bir sonucu olarak glukoz ototoksikasyonu ve protein glikozilasyonu ile serbest radikallerin miktarı artar ve denge bozulur. Biyolojik moleküller etkilenir ve oksidatif stres oluşur. DNA, lipid, protein ve karbonhidrat yapıları etkilenir (Vardı ve

ark 2007). Oksidatif stresin artmasının doğal bir sonucu olarak da antioksidanların koruyucu kapasitesi azalır ve reaktiflerin oluşum hızı artar. Artan hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerinin doku bütünlüğünün bozulması ve hasarını hızlandırdığı belirtilmektedir (Vardı ve ark 2005).

Hiperglisemi, glikolizasyon son ürünleri ve lipoksidasyonla; vasküler duvarda aterosklerozis, intimal kalınlaşma ve immuninflamatuvar reaksiyon oluşma olasılığını arttırmaktadır. Hipergliseminin indüklediği glikasyonla; dolaşımdaki ve hücrelerdeki lipid ve proteinlerin oksidatif modifikasyonu vasküler patolojinin temelidir (Popov ve Constantınescu 2008). DM'ta kan glukoz seviyesinin dikkatli takibi diyabetin kronik komplikasyonlarının gelişmesini ve ilerlemesini baskılayacaktır (Kuzuya 2000).

### 1.5.4. Ateroskleroz

Diyabetin en büyük komplikasyonlarından biri olan ateroskleroz ölümlerin % 71,1'inden sorumludur (Ishibashi ve ark 2002). Aterom plağının oluşumunda endoteli de içeren bir harabiyet olması ilk görülen bulgudur (Nebıgil ve Sarıoğlu 1985). Endotel disfonksiyonu sonucu düşük dansiteli lipoproteinler geçirgenliği artan endotelyal hücre tabakasından subendotelyal matrikse sızar ve birikmeye başlar (Stirban ve ark 2008). Monositler endotel hücrelerinin arasından geçerek endotel hücrelerinin altına yerleşir. Burada makrofajlara dönüşürler ve okside olmuş düşük dansiteli lipoproteinleri (LDL)'leri fagosite ederek köpük hücrelerine dönüşürler. Makrofajlar; monositler ve düz kas hücreleri için kemotaktik olan sitokinleri salgılar, endotel hücreleri ve düz kas hücreleri için büyüme faktörleri ve düz kas hücrelerini kontraktil hücreden salgı yapan hücre fenotipine dönüştüren faktörler salgılar. Ayrıca düz kas hücreleri intima tabakasında toplanarak lipidleri içine alır ve köpük hücrelerine dönüşürler. Hiperkolesteroleminin devamında; monosit ve lenfosit adhezyonu, düz kas hücrelerinin intimaya göçü, makrofaj ve düz kas hücrelerinde lipid birikiminin sonucunda yağlı çizgilenmeler 'fatty streak' oluşur. Düz kas hücrelerinin sayıca çoğalması 'fatty streak'i 'fibrofatty ateroma'ya çevirir. Bu aşamadan itibaren intimal plak; bağ dokusu içinde düz kas hücreleri ve fibroblastlar tarafından kuşatılmış köpük hücrelerinden oluşur (Ross 1992).

Alandaki biriken lipoproteinler okside olarak modifikasyona girerler. Fibröz plaklar ekstrasellüler matriksin sentezi ve yeniden oluşumu, hücre ölümü ve dejenerasyonuyla büyürler (Kumar ve ark 2003). Damar lümenine doğru büyüyen plak kan akımını engeller. Bazı bireylerde sebepleri tam anlaşılamamış olarak plaklar sağlam değildir ve oynaktır. Bu plaklar akut rüptura eğilimli olup, trombus oluşumuna sebep olur ve etkilenen damar tıkanır. Lümen tekrar kanalize edilmezse infarktüs oluşabilir. Doku kaybı (nekroz) çok oluşursa ölüme sebebiyet verir (Grainger 2007). Plakların büyük çoğunluğu kalsifiye olur. Plakların ülserasyonu oluşabilir, hemoraji ve anevrizmal dilatasyonla son bulabilir. Aterosklerotik plak abdominal aortta torasik aorta göre daha fazla tutulur (Kumar ve ark 2003).

### 1.5.5. Deneysel Diyabet

Deney hayvanı modelleriyle çalışma araştırmacılara birçok kolaylık sağlamaktadır. Bunlar arasında istatiksel değerlendirmenin kabul edilebilmesi için istenilen sayıda örnekleme yapılabilmesi, fenotipi etkileyen çevresel faktörler için kontrol gruplarının kullanılabilmesi, hastalıklar için genetik ayrıştırma yapılabilmesi sayılabilir. İnvivo deneyler, insanlarda görülen hastalıkların deney hayvanlarında oluşturulması ile çalışılır. Hayvanlarda beslenme veya toksik maddelerle istenilen organlarda patolojik değişikler yapılabilmektedir. Pankreasta oluşturulan hasara bağlı olarak diyabet modellerinin geliştirilmesi bunlardan bir tanesidir (Öntürk ve Özbek 2007). Deney hayvanlarında oluşturulan diyabet insanlarda diyabete bağlı oluşan komplikasyonları araştırabilmek için uygun bir alan sağlar. Böylece diyabetteki fizyolojik ve patolojik değişiklikler taklit edilerek yeni tedavi yöntemleri geliştirilebilir (Demirkazık ve Gültürk 2006). Literatürde birçok diyabetik hayvan modeli tanımlanmıştır.

I. Tip-1 Diyabet Modelleri

A. Kimyasal yolla meydana getirilen Tip-1 diyabet modelleri: Streptozotosin (STZ), çinko şelatörleri, diyet nitrozaminleri, alloksan.

B. Spontan Tip-1 diyabet olan hayvan modelleri: Obez olmayan diyabet modelleri (NOD), BB (Bio-Breeding) sıçan, fare, Macaca nigra maymunu, Keeshand köpeği, Çin hamsteri, kobay.

C. Virüsle meydana getirilen modeller

D. Transgenik Tip-1 diyabet modelleri

II. Tip-2 Diyabet Modelleri

A. Spontan modeller: Çok yüksek hiperglisemili modeller ve yumuşak hiperglisemili modeller.

B. Eksperimental modeller: Alloksan ve STZ ile kimyasal olarak oluşturulan modeller, pankreatektomi ve hipotalamik lezyon oluşturarak meydana getirilen cerrahi modeller, hormonlar, diyet, anti-insülin hormonların yüksek dozları, hiperinsülineminin süresinin uzun sürmesi.

C. Transgenik modeller (İrer ve Alper 2004).

Alloksan ve STZ diyabet araştırmalarında kullanılan en önemli diyabetojenik kimyasallardır. İkisi de toksik glukoz analoglarıdır. Hücre toksisitesi farklı yollardan gerçekleşse de beta hücresi seçicilik mekanizması aynıdır.

Pankreatik beta hücrelerinin spesifik nekrozisinin sonucu olarak hayvanlarda alloksan diyabet oluşturmaktadır. Alloksanın indirgenmiş ürünü olan diyalurik asitin hayvanlarda diyabetojenik olduğu gösterilmiştir (Kawada 1992). Alloksanın diyabetik faaliyetinin hücre içi $Ca^{2+}$ homeostazındaki bozukluklar için önemli bir basamak teşkil ettiği önerilmektedir. Bu görüş in vitro ve in vivo çalışmalarda doğrulanmıştır. Alloksan sitosolik serbest $Ca^{2+}$ konsantrasyonunu pankreatik Beta hücrelerinde arttırmaktadır. Bu olay ekstrasellüler sıvıdan $Ca^{2+}$ girişi, hücre içi depolardan aşırı $Ca^{2+}$ mobilizasyonu ve sitoplazmadan sınırlı eliminasyonuyla gerçekleşmektedir. Alloksanın etkisiyle içeri giren $Ca^{2+}$ pankreatik beta hücrelerinin depolarizasyonuna sebep olur. Depolarize olan hücre membranları

voltaj bağımlı $Ca^{2+}$ kanallarını açar ve hücre içine giren $Ca^{2+}$ miktarı artar. Böylece alloksan uygulamasından sonra beta hücrelerinde ani insülin salınımı sitosolik $Ca^{2+}$ konsantrasyonlarındaki ani artışın sebeplerinden biri olabilir. Bu iyonun artmış konsantrasyonu ROS ile birlikte pankreatik beta hücrelerinin hasarına yol açmaktadır. Alloksanın etkileri gerekli SH gruplarının oksidasyonu, glukokinazon inhibisyonu, serbest radikallerin üretimi ve hücre içi $Ca^{2+}$ homeostazının bozulmasıdır (Szkudelski 2001).

Streptozotosin antimikrobiyal bir ajandır ve kemoterapötik alkilleyici bir ajan olarak da kullanılır. Pankreatik beta hücrelerinde spesifik nekroza sebep olmaktadır ve o zamandan beri hayvanlarda DM oluşturmak üzere seçilen kimyasal ajan olmuştur (Kawada 1992). STZ insulin salgılayan beta hücrelerine toksik etkisi (Kang ve ark 2007) nedeniyle insüline bağımlı olan Tip 1 diyabet için kullanılan kimyasal bir ajandır (Kergoat ve Portha 1985). İrritan olduğundan dolayı uygulamalarda dikkatli olunmalıdır (İrer ve Alper 2004). Glukoza benzer ve hücreye glukoz taşıyıcı protein olan GLUT2 tarafından taşınır fakat diğer glukoz taşıyıcılar tarafından ekspresse edilmez. Beta hücrelerindeki toksisitesi, bu hücrelerin diğer hücrelere nazaran çok sayıda GLUT2 reseptörü bulundurmasındandır (Wikipedia 2010)

STZ bir nitrozüre analoğudur ve N-methyl-N-nitrosourea – nitroüre (MNU) yarımıdır ve heksoza bağlıdır. STZ'nin toksisitesi metilnitrosourea parçasının alkilleyici özelliğinden dolayıdır. STZ'den DNA molekülüne metil grubunun transferi hasara yol açar, gelişen bir dizi olay dizisi sonrasında DNA parçalanır. Protein glikolizasyonu ilaveten hasar verici faktör olabilir. DNA tamiri için poli (ADP-riboz) polimeraz stimüle edilir. Bu hücresel $NAD^{+}$ ve arkasından ATP depolarını azaltır. Hücresel enerji depolarının boşalmasının sonucunda beta hücresi nekrozuna sebep olur.

STZ proteinleri metilasyona uğratır. DNA metilasyonu beta hücre ölümünden sorumludur, fakat muhtemelen protein metilasyonu; STZ'ye maruz kalmadan sonra beta hücrelerinin fonksiyonel defektlerine yol açar. Alternatif hipotez olarak, STZ'nin alkilleyici özelliğiyle ilgisi olmadan hem N-methyl-N-nitrosourea (MSU) hem streptozotosin nitro grubu içerir ve nitrik oksiti serbest bırakırlar (Lenzen 2008).

STZ'nin beta hücrelerine toksik etkisine nitrik oksitin aracılık ettiği belirtilmiştir (Turk ve ark 1993). Tip 1'de yangılı beta hücrelerinde nitrik oksit sentezi artar ve ayrıca adacıklara sızan makrofajlar da bol miktarda NO üretir (El-Mahmoudy ve ark 2005, Hrabák ve ark 2006).

### 1.6. Tranforming Growth Faktör Beta1

İnsan dokularında ekstrasellüler matriks olarak bilinen sentezlenmiş protein ağı ve hücreler arasında normal homeostazı sağlamak için karışık ve dengeli etkileşimler gerekmektedir. Bu yardımcı etkileşimler spesifik hücre yüzey reseptörleri gibi davranan çok sayıda sitokini içerir. Hücreler ve ekstrasellüler maddeler arasındaki denge bozulduğu zaman sonuçta hastalıklar oluşur (Blobe ve ark 2000). Sitokinlerin üretim sonrası faaliyetleri; kendi kaynak hücresi, komşu hücreler ve damar sistemi ile hedef dokulardaki hücrelerde özel membran reseptörleri ile etkileşime girmesi sonucu açığa çıkar. Sitokinlerin proliferasyon, farklılaşma ve aktivasyonu sağlama gibi etkileri çeşitli hücre tiplerinde değişmektedir (Gündüz ve Er 2000).

Yangı, büyüme, hasar ve iyileşme gibi birçok süreçte aktif rol alırlar. Hormon değildirler. TGF ailesinin 5 üyesi vardır (β1 - β5). Memelilerde TGF β1'in üç izoformu saptanmıştır. Bunlar TGF β1, β2, β3'dür (Güner ve ark 1997). Vasküler dokularda TGF β1; endotel hücrelerinde, vasküler düz kas hücrelerinde, makrofajlarda ve kan plateletlerinde bulunur ve bu hücrelerden inaktif latent bir kompleks halinde sentezlenerek latency associated peptit (LAP) ismini alır (Minami ve ark 2000, Yasuda ve ark 2001). TGF β1 T hücreleri tarafındandan da üretilir (Güner ve ark 1997). Biyolojik etkisini başlatabilmek için 25 kDa'lık reseptör bağlayıcı bölgenin LAP'dan ayrılması gerekmektedir. Biyolojik olarak aktif hale geçmesi için bu süreç zorunludur (Yasuda ve ark 2001).

TGF-β1 Tip I ve Tip II reseptörlerine bağlanarak sinyal iletimini sağlar (Soyöz ve Özçelik 2007). TGF β1 çok fonksiyonlu bir sitokindir, hücre büyümesini, farklılaşmasını, göçünü ve ekstrasellüler matriks üretimini de etkiler (Minami ve ark 2000, Pascual ve ark 2007). Geçmiş çalışmalarda TGF β1'in vasküler hücre

apoptozisini düzenlediği ve böylece vasküler duvarı yeniden biçimlendirdiği kanıtlamıştır (Minami ve ark 2000). Genetik çalışmalarda TGF β1'in ve onun reseptörlerinin embriyonik vasküler şekillenme, damar duvarının bütünlüğünün bakımı, korunması ve onarımında rollleri olduğu ortaya çıkmıştır ( Pepper 1997).

Embriyogeneziste damarlara son şekli trombosit kaynaklı büyüme faktörü ( PDGF) ve transforming growth faktör β (TGF β) tarafından verilir (Sadler 2005). Anjiogenezin gelişimini kontrol altında tutar. TGF β1 koruyucu rolünü birçok düzeyde gösterir. Vasküler hücre proliferasyonunu kontrol, farklılaşmanın devamı, antiinflamatuvar ve immunmodülatör etkinin artışını da kontrol eder (Wang ve ark 2008).

## 2.GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda 24 adet 3 aylık 250- 300 gr ağırlığında Sprague-Dawley türü dişi sıçan kullanıldı. Tüm sıçanlar Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edildi. Çalışma için Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nin Etik kurulunun 2008/ 45 no'lu kararında geçen etik kurul onayı alındı**.**

### 2.1. Gruplar ve deneysel diyabet modeli

Dişi sıçanlar 2 farklı gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol grubu, ikinci grup ise deneysel diyabet grubu olarak seçildi. Kontrol grubuna 10, deneysel diyabet grubuna ise 14 hayvan ayrıldı. Deneysel diyabet ikinci grupta; pH'ı 4,5 olan 0,01 M'lık sodyum sitrat tamponunda çözülmüş Streptozotocin'in 50 mg/kg intraperitoneal olarak tek enjeksiyonla verilmesiyle oluşturuldu. Kontrol grubuna ise sadece % 0,9'luk serum fizyolojik 50 mg/kg intraperitoneal olarak verildi.

Bir hafta sonra gruplardan kan glukoz seviyeleri kuyruk veninden alınan bir damla kandan Plusmed (pM 1-300) şeker ölçüm cihazı ile ölçüldü. Kan glukoz seviyesi 270 mg/dl ve üstü olanlar diyabetik olarak kabul edildi. Her iki grup 60 gün boyunca 20-22 °C'de 12 saat karanlık/aydınlık barınaklarda sıçan pelet yemiyle ad libitum olarak beslendi ve başka hiçbir işlem yapılmadı. 30. ve 60. günler kan glukoz seviyeleri ölçülerek diyabetin sürekliliği kontrol edildi. 60 gün içinde kontrol grubunda 3, diyabetik gruptan ise 7 sıçan öldü ve deney gruplarından çıkarıldı. 60 gün sonunda kontrol grubunda 7 ve diyabetik grupta 7 sıçan olmak üzere sıçanlara Ketamin/ksilazin kombinasyonu 50/10 mg/kg intraperitonal uygulanarak ötenazi yapıldı. Her bir gruba ait sıçanların abdominal ve torasik aortları çıkarıldı ve böylece 4 adet inceleme grubu oluşturuldu. %10'luk formalin içinde tespit edildi.

AD: Diyabetli sıçanlarda abdominal aorttan alınan doku örneği grubu
AK: Kontrol Grubunda abdominal aorttan alınan doku örneği grubu
TD: Diyabetli sıçanlarda torasik aorttan alınan doku örneği grubu
TK: Kontrol Grubunda torasik aorttan doku alınan örneği grubu

## 2.2.Histolojik Doku Takibi ve Boyaları

Alınan doku örnekleri dehidratasyon amaçlı alkol serilerinden geçirildi ve ksilol ile şeffaflaştırıldı. Dokular etüvden çıkarılan sıvı parafin içine alınarak bir gün boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra etüvde eritilen parafinden alınan dokular parafin bloklara alındı ve her bir bloktan 4-5 mikron kalınlığında parafin kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen Eozin ve Verhoeff- Van Gieson elastik lif boyası ile boyandı. Değerlendirmeler Olmypus BH-2 ışık mikroskobunda gerçekleştirildi.

### Hematoksilen- Eozin

Parafin kesitler 30 dakika ksilolde bekletilip parafinden arındırıldı. Kesitler % 96'lık ve % 90'lık alkol serilerinden geçirilerek 5 dk çeşme suyunda yıkandı. 3 dakika Harris hematoksilen'de bekletildi, çeşme suyunda morarıncaya kadar yıkandı. Boyanın fazlalığının giderilmesi için asit alkole batırılarak çıkarıldı, çeşme suyunda yıkandı, parlaklık için amonyaklı suda çalkalandı. Eozinde 3 dk bekletilip çeşme suyunda yıkandı. % 90 ve % 96'lık alkol serilerinde geçirilerek ksilende 30 dk bekletildi. Kesit üzerleri entellan ile kapatıldı. Kollajen lifler pembe, çekirdek mavi-mor renge boyandı (Stevens 1990).

### Verhoeff – Van Gieson

Kesitlerin deparafinizasyonu ve distile suda hidratasyonu yapıldı. Kesitler Verhoeff elastik çalışma solüsyonunda 15 dk bekletildi. Akarsuda 20 dk yıkandı. Distile sudan geçirildi. % 2 ferrik klorid solüsyonunda birkaç dakika bekletildi. % 5 sodyum tiosülfat solüsyonunda 1 dk bekletildi. 5 dakika akarsuda yıkandı. Distile sudan geçirildi. Van gieson solüsyonunda 1 dakika tutuldu. % 96 ve absolü alkolden hızlıca geçirildi. İki değişik ksilolde şeffaflandırıldı ve entellan ile kapatıldı. Elastik lifler ve çekirdek siyah ve kahverengi, kollajen kırmızı ve diğer yapılar sarı renkte boyandı (Bradbury ve ark 1990).

**İmmünohistokimyasal Metot**

İmmunohistokimya için Genway marka Anti-TGF beta (TB21) IgG 20-272-193974 primer antikoru 1/100 oranında antikor diluent ile sulandırılarak kullanıldı.

1) Aort kesitleri immunohistokimyasal boyama için 16 saat 60 C°'lik etüvde tutuldu.

2) 30'ar dakika iki saat değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi.

3) Absolü, %96 ve %90'lık azalan dereceli alkol serilerinden geçirildi.

4) Endojen peroksidazı maskelemek için kesitler karanlıkta % 3'lük $H_2O_2$'de 5 dk bekletildi. 3 defa PBS'den geçirildi.

5) Antijenin geri dönüşümünü sağlamak için kesitler, içinde EDTA tamponu (pH=8) olan şaleye konarak mikrodalga fırında 5'er dakikalık periyotlarla 3 kere bekletildi. Mikrodalga fırından çıkarılan kesitler oda sıcaklığında 20 dakika soğumaya bırakıldı.

6) Kesitlere 20 dakika Scy Tek marka ultra block uygulandı.

7) 1/100 oranında sulandırılmıs primer antikorla TGF Beta1 (Genway) ile bir saat inkübe edildi.

8-) 20 dakika Ultra Tek Anti-Polvalent Biotinylated sekonder antikoru uygulandı.

9) 20 dakika Ultra Tek Horseradish Peroxidase uygulandı.

10) 20 dakika kromojen (Scy Tek marka AEC Substrat System) dokulara uygulandı. (20 ml AEC kromojen + 1 ml AEC substrat iyice karıstırıldı) Distile su ile çalkalandı.

11) 5 dakika Mayer Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı. 3 dk çeşme suyunda yıkandı.

12)DPX Mountant (Biostatin Ready Reagents) kapama maddesi ile kapatıldı.

Değerlendirme kriterlerinde boyanmanın yaygınlığına göre 4 grup oluşturuldu.

Negatif: Hiç boyanma yok

+1: Zayıf boyanma var

+2:Orta derecede boyanma var

## 2.3. Histolojik ve Morfometrik Analiz

Preparatlarda damarların histolojik yapıları incelendi. Işık mikroskobunda aort damarlarının intima ve media tabakalarının kalınlıkları ölçüldü. Ölçümler oküler mikrometre ile yapıldı. İntima kalınlığı olarak lümen ve ilk elastik lamina arası ölçüldü.

Media kalınlığı için ise ilk elastik laminanın bitiminden media ve adventisya sınırındaki son elastik laminanın bitimine kadar olan aralık ölçüldü. Her bir damarın 10 farklı yerinden yapılan ölçümlerin ortalaması alındı.

## 2.4. Histopatolojik Analiz

Damarlarda aterosklerotik lezyon başlangıç gelişiminin varlığı değerlendirildi.

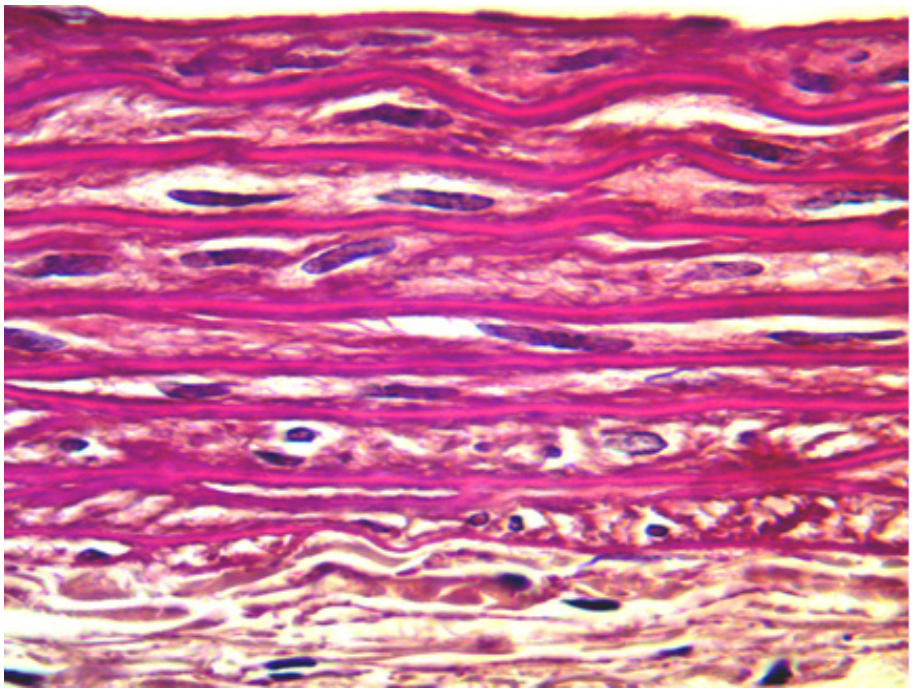
## 2.5. İstatistiksel analiz

TGF β1 Ekspresyonunun istatistiksel olarak değerlendirilmesi Mann-Whitney U Testi ile yapılmıştır. Torasik ve Abdominal aort intima ve media kalınlıklarının istatistiksel olarak değerlendirilmesinde two sample t testi kullanılmıştır.

# 3. BULGULAR

## 3.1. Histolojik Değerlendirme

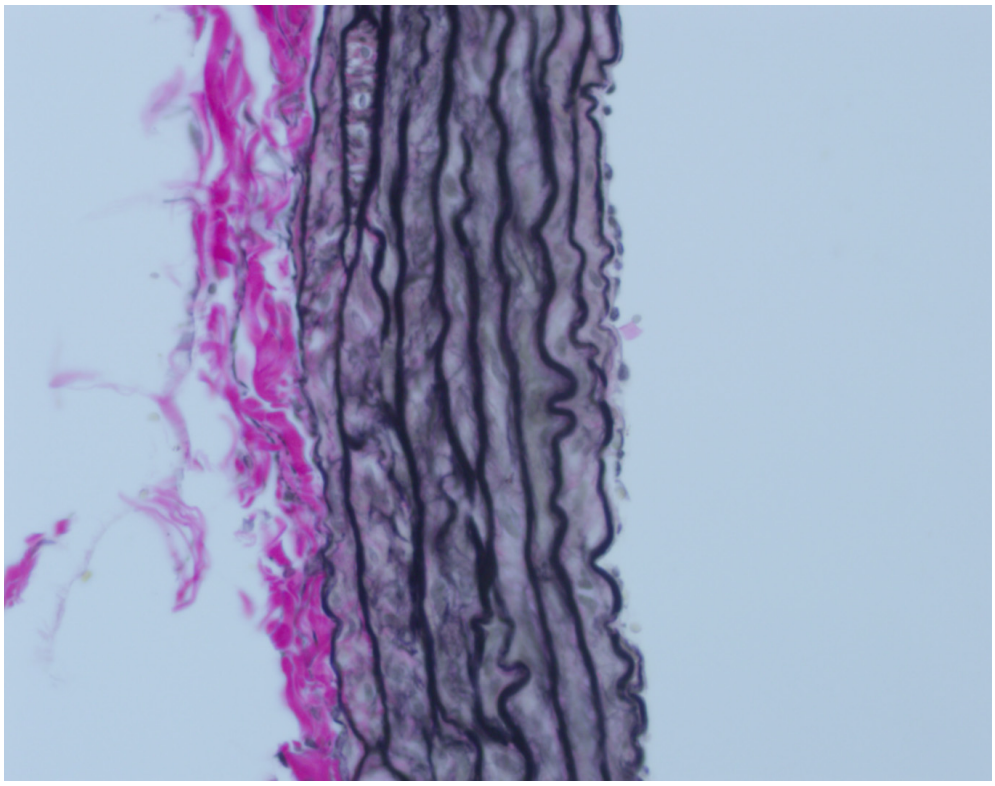
Aort preparatlarının değerlendirilmesinde; intima tabakasına ait endotel hücreleri, elastik liflerin birleşmesiyle oluşan belirgin elastik lameller ve aralarında yerleşmiş olan düz kas hücreleri normal elastik arter histolojik yapısına sahipti (Resim 3.1.).



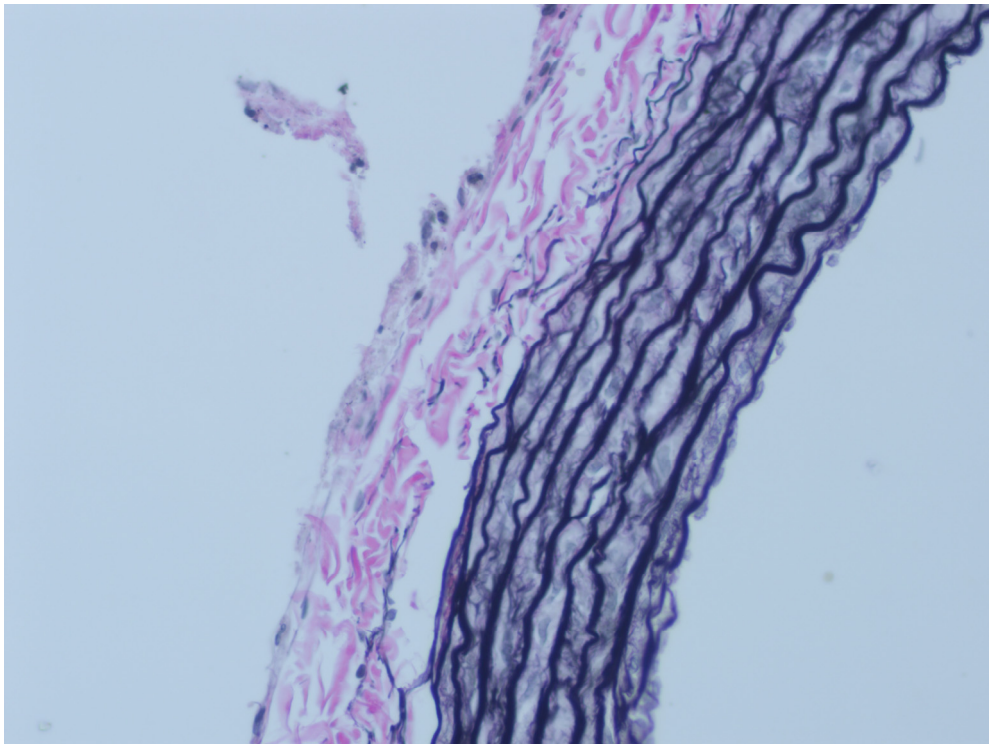
Resim 3.1. TK5, Hematoksilen Eozin, x 100. Kontrol grubunda endotel hücrelerinin çekirdekleri ve elastik lameller arasına yerleşmiş olan düz kas hücreleri görülmektedir.

## 3.2. Histopatolojik Değerlendirme

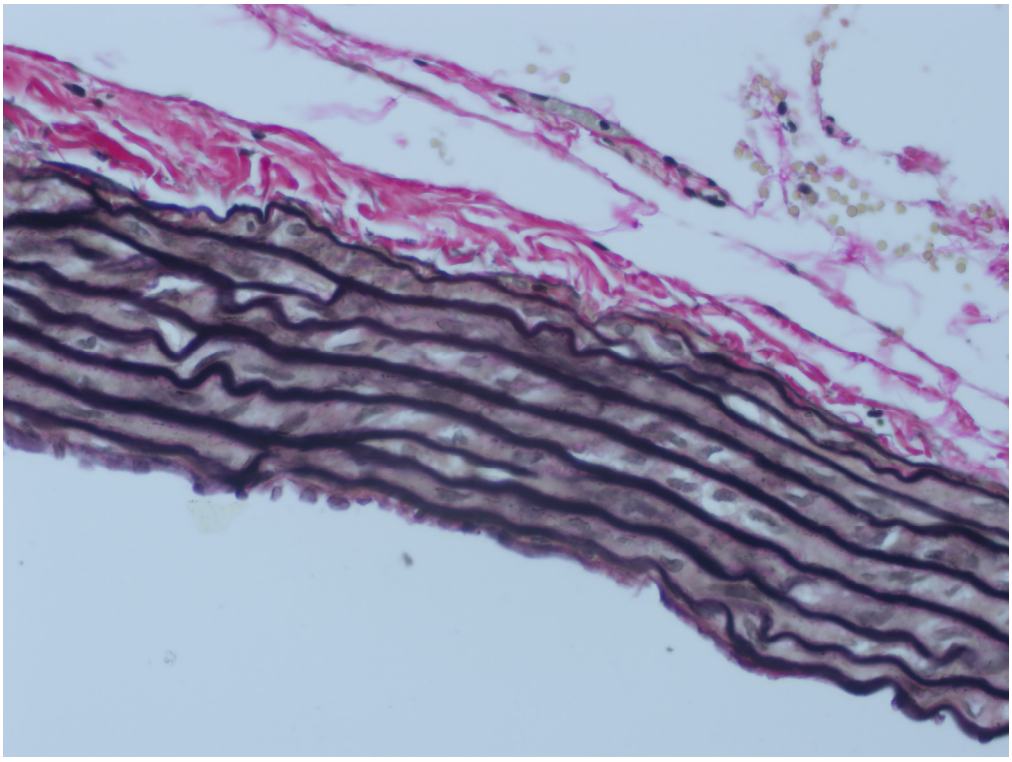
Diyabetli sıçan grubundan oluşturulan TD ve AD gruplarına ait preparatlar incelendiğinde kontrol grubundan oluşturulan TK ve AK gruplarına göre elastik lamel diziliş ve düzenlenmesinde bir farklılık gözlenmedi. Ayrıca AD ve TD gruplarının hiçbirinde aterosklerotik lezyona da rastlanmadı. (Resim 3.2. ve Resim 3.5.)



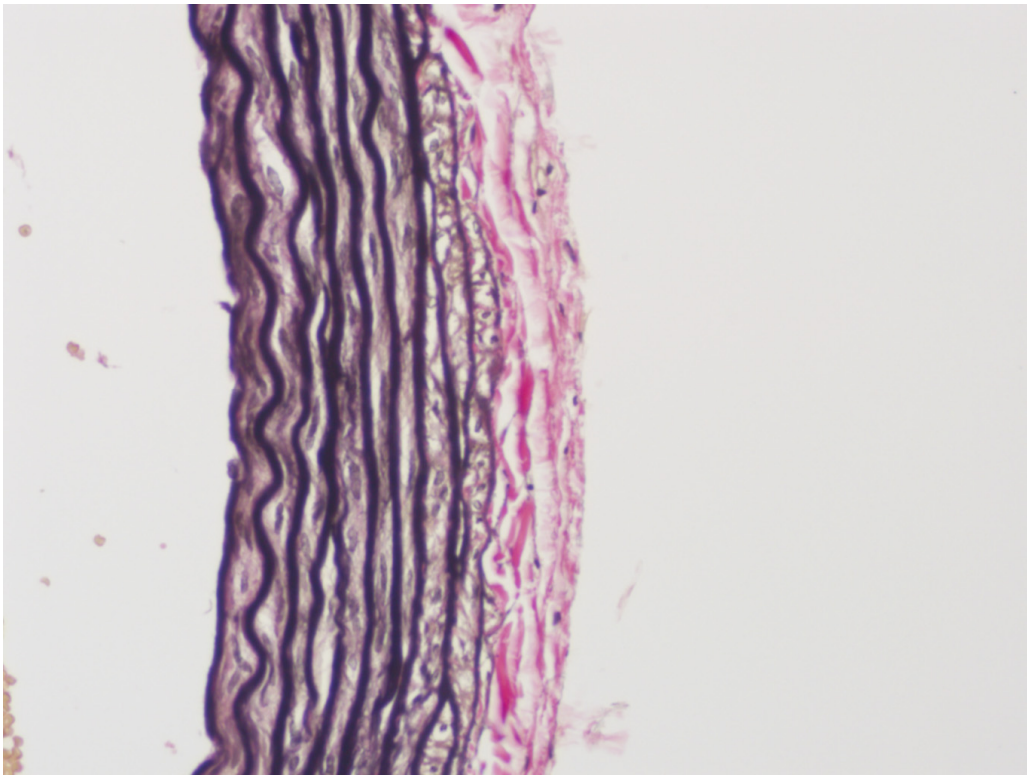
Resim 3.2. AD5, Verhoeff Van Gieson, x 40



Resim 3.3.  AK3, Verhoff Van Gieson, x 40, normal endotel yapısı



Resim 3.4. TK6, Verhoff Van Gieson, x 40



Resim 3.5. TD 7, Verhoff Van Gieson, x 40

### 3.3. Morfometrik Değerlendirme

Verhoff Van Gieson ile boyalı 28 adet preparatta, oküler mikrometre ile intima – media tabakaları ölçüldü.

Tablo 3.1. AK, AD, TK ve TD grupları intima – media tabakaları kalınlık ölçüm sonuçları (μm).

| GRUP ve NUMARA | MEDİA | İNTİMA | GRUP ve NUMARA | MEDİA | İNTİMA |
|---|---|---|---|---|---|
| AK1 | 92,74 | 4,2 | TK1 | 93,96 | 5,65 |
| AK2 | 90,72 | 3,5 | TK2 | 108,4 | 3,7 |
| AK3 | 88,29 | 4,1 | TK3 | 100,44 | 4,5 |
| AK4 | 99,79 | 4,42 | TK4 | 85,86 | 3,2 |
| AK5 | 92,34 | 5,4 | TK5 | 103,68 | 4 |
| AK6 | 93,96 | 2,67 | TK6 | 97,2 | 5,4 |
| AK7 | 89,1 | 4 | TK7 | 89,1 | 4,4 |
| AD1 | 97,2 | 5,24 | TD1 | 85,86 | 6,82 |
| AD2 | 84,24 | 3,92 | TD2 | 100,44 | 3,4 |
| AD3 | 98,29 | 4,81 | TD3 | 105,3 | 3,3 |
| AD4 | 89,1 | 3,3 | TD4 | 87,48 | 3,8 |
| AD5 | 98,82 | 6,54 | TD5 | 89,1 | 7,7 |
| AD6 | 102,6 | 4,86 | TD6 | 108,4 | 6,2 |
| AD7 | 95,58 | 6,31 | TD7 | 111,78 | 5,13 |

.

AD ve AK gruplarına ait media kalınlıkları kendi arasında, TD ve TK gruplarına ait media kalınlıkları istatistiksel olarak kendi arasında karşılaştırıldı. Grupları arasında two sample t- testi yapıldı. AK ve AD, TK ve TD grupları arasında media kalınlık ölçümlerinde istatistiksel açıdan anlamlı fark çıkmadı (0,21 > 0,05 ve 0,39>0,05, Tablo 3.2. ve Tablo 3.3.).

Tablo 3.2. Abdominal aort media kalınlıklarının kontrol ve diyabet gruplarına göre ortalamaları ve P değeri.

| | ABDOMİNAL AORT MEDİA KALINLIK ORTALAMALARI | ORTALAMA STANDART HATA |
|---|---|---|
| Kontrol Grubu | 92,42 μm | 1,4 |
| Diyabet Grubu | 93,69 μm | 2,4 |
| P | 0,21 | |

Tablo 3.3. Torasik aort media kalınlıklarının kontrol ve diyabet gruplarına göre ortalamaları ve P değeri.

| | TORASİK AORT MEDİA KALINLIK ORTALAMALARI | ORTALAMA STANDART HATA |
|---|---|---|
| Kontrol Grubu | 96,95 µm | 3 |
| Diyabet Grubu | 98,34 µm | 4,1 |
| P | 0,39 | |

.

AK ve AD gruplarında intima tabakası ölçümleri arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildi (0,052 > 0,05, Tablo 3.4). Aynı şekilde TK ve TD gruplarında intima tabakası ölçümleri arasındaki fark da anlamlı çıkmadı (0,16 > 0,05, Tablo 3.5).

Tablo 3.4. Abdominal aort intima kalınlıklarının kontrol ve diyabet gruplarına göre ortalamaları ve P değeri.

| | ABDOMİNAL AORT İNTİMA KALINLIK ORTALAMALARI | ORTALAMA STANDART HATA |
|---|---|---|
| Kontrol Grubu | 4,04 µm | 0,32 |
| Diyabet Grubu | 5 µm | 0,44 |
| P | 0,052 | |

Tablo 3.5. Torasik aort intima kalınlıklarının kontrol ve diyabet gruplarına göre ortalamaları ve P değeri.

| | TORASİK AORT İNTİMA KALINLIK ORTALAMALARI | ORTALAMA STANDART HATA |
|---|---|---|
| Kontrol Grubu | 4,407 µm | 0,33 |
| Diyabet Grubu | 5,19 µm | 0,67 |
| P | 0,16 | |

### 3.4. TGF β1 Ekspresyonu Sonuçları ve Değerlendirilmesi

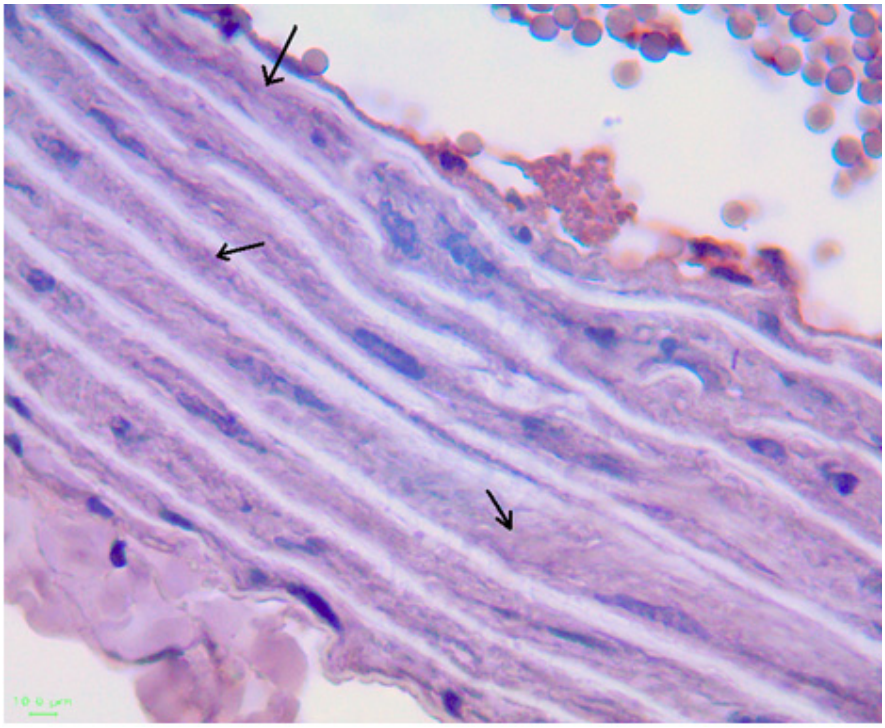
Tablo 3.6. Deney grupları TGF β1 ekspresyonu

| GRUP ve NUMARA | TGF β1 Ekspresyonu | GRUP ve NUMARA | TGF β1 Ekspresyonu |
|---|---|---|---|
| AD1 | Neg | TD1 | +1 |
| AD2 | Neg | TD2 | +2 |
| AD3 | Neg | TD3 | +2 |
| AD4 | +1 | TD4 | +1 |
| AD5 | +1 | TD5 | +1 |
| AD6 | Neg | TD6 | +1 |
| AD7 | Neg | TD7 | +1 |
| AK1 | Neg | TK1 | Neg |
| AK2 | +1 | TK2 | Neg |
| AK3 | Neg | TK3 | Neg |
| AK4 | Neg | TK4 | +1 |
| AK5 | +2 | TK5 | +1 |
| AK6 | Neg | TK6 | Neg |
| AK7 | Neg | TK7 | Neg |

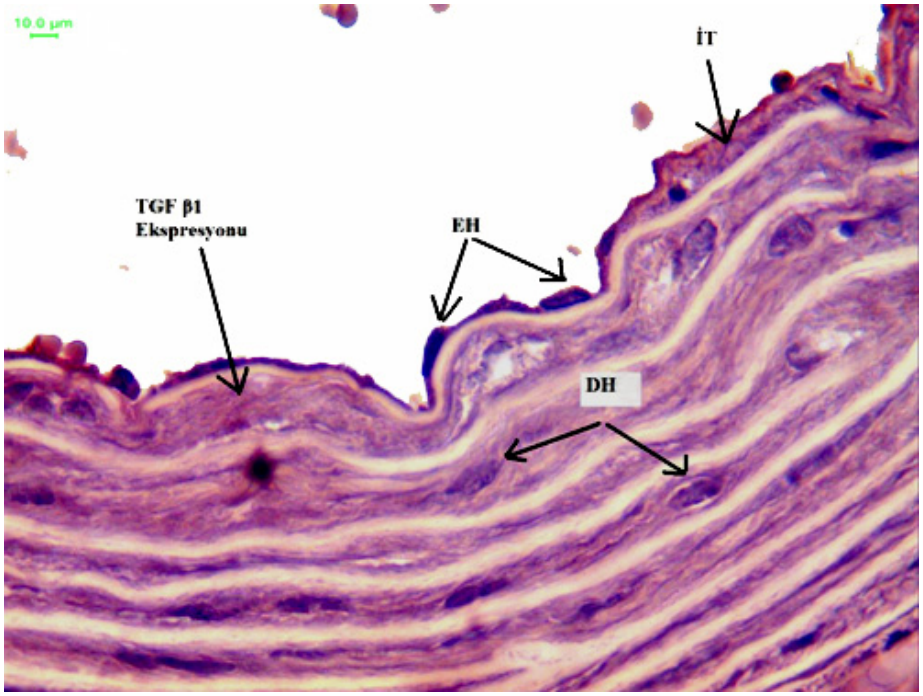
TGF β1 Ekspresyonunun istatistiksel olarak değerlendirilmesi Mann-Whitney U Testi ile yapılmıştır. TGF β1 ekspresyonu TK ve TD grupları arasında anlamlı çıkmıştır, $P= 0,011 < 0,05$. TGF β1 ekspresyonu AK ve AD grupları arasında anlamlı çıkmamıştır, $P= 0,902 > 0,05$.

Tablo 3.7. Gruplar arası P değerleri, * = P< 0,05

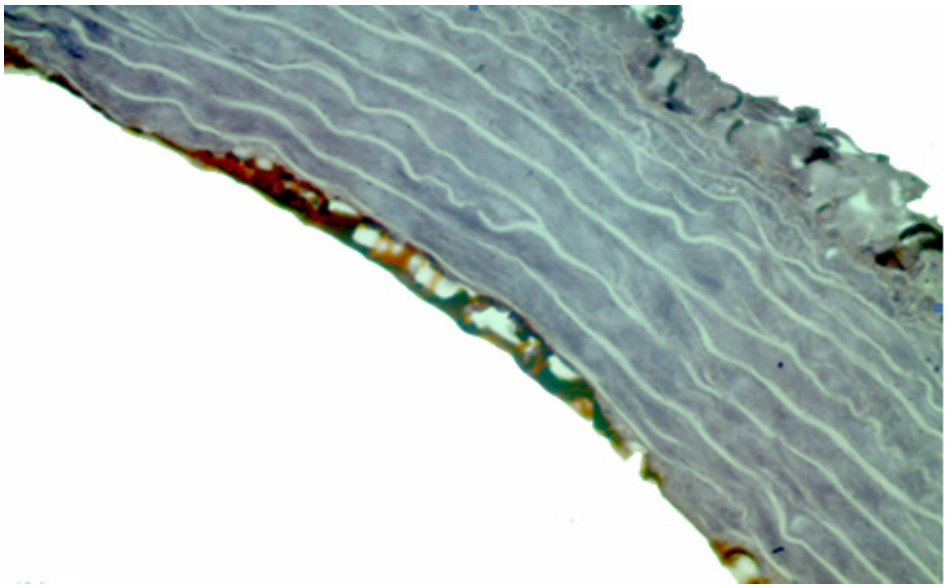
| | Abdominal Aortta TGF β1 Ekspresyonu | Torasik Aortta TGF β1 Ekspresyonu |
|---|---|---|
| Kontrol ve Diyabet Grupları Arası P Değeri | 0.902 | 0.011* |



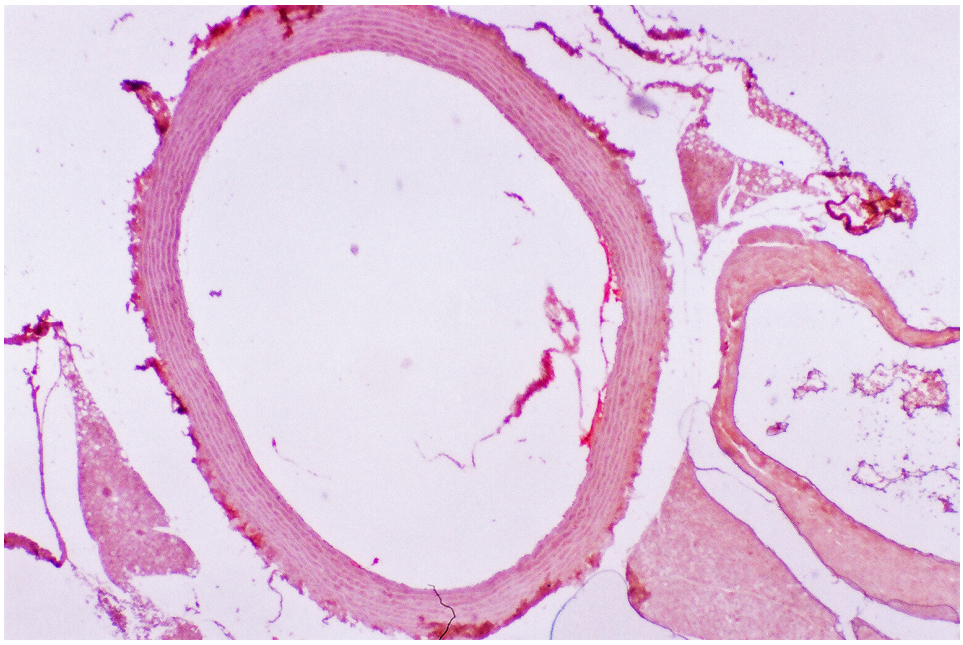
Resim 3.6. TD5, x 100, oklar: +1 ekpresyonu göstermektedir.



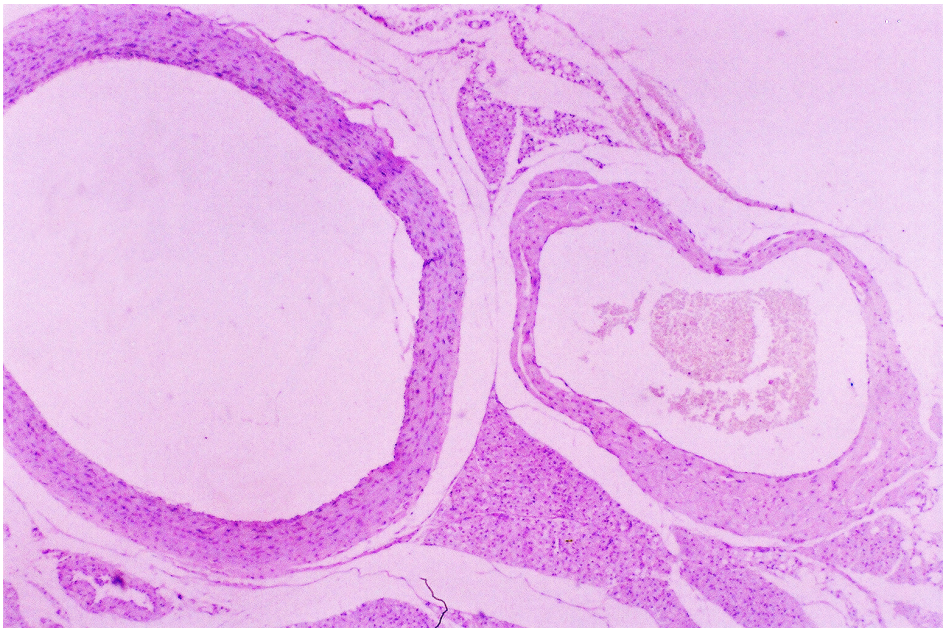
Resim 3.7. TD2, tüm alanda yaygın +2 ekpresyon gözlenmiştir.
**İT**: İstatistiksel açıdan anlamsız olan intimal kalınlaşma, x 100
**DH:** Düz kas hücreleri
**EH**: Endotel hücreleri



Resim 3.8. AK4, x 40, negatif ekspresyon gözlenmiştir.



Resim 3.9. TD7, +1 ekspresyon



Resim 3.10. TD7, negatif kontrol görünümü.

## 4. TARTIŞMA

Diyabetin intima ve media tabakalarında kalınlaşmaya sebep olduğu, hiperglisemi, hiperinsülinemi ve ilerlemiş glikozilasyon son ürünlerinin (AGE) diyabetik makroanjiyopatiyi arttırdığı rapor edilmiştir (Hosomi ve ark 2001).

Astrand ve ark (2007) insanlarda abdominal aortadaki intima-media kalınlığını damar duvar kalınlığı olarak kabul etmişler ve bu kalınlığın diyabet hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Yüksek glukoz seviyelerinin aortik duvarın yıkılmasından ve ayrışmasından sorumlu olan metalloproteinazları inaktive ettiğini belirtmişlerdir. Aort duvar kalınlığının artmasıyla metalloproteinaz aktivitesinin düşmesinin birbirini tamamlayıcı işaretler olduğunu bildirmektedirler. Diyabetli hastalarda artmış intima-media tabakalarının kalınlığının abdominal aortada ateroskleroz gelişimiyle ilgili olduğunu ve anevrizma gelişim riskini düşürdüğü ifade edilmiştir.

Harrington ve ark (2010) ultrason kullanılarak ölçtükleri aort intima-media kalınlığının Tip 1 diyabetik çocuklarda kontrollere göre anlamlı derecede yüksek çıktığını, aynı gruplarda ise karotid intima-media kalınlığının kontrollere göre anlamlı bir artış göstermediğini ve aort intima-media kalınlığının karotid intima-media kalınlığına göre ateroskleroz için preklinik bir gösterge olduğunu düşünmektedirler. Otopsi çalışmalarında histolojik olarak incelenen aort örneklerinde intima tabakasında yağ birikiminin ve fibroplastik intimal kalınlaşmanın plak oluşumunun erken aşamaları olduğunu ifade etmişlerdir. Bizim çalışmamızda intima tabakasında yağ birikimine ve köpük hücrelerine rastlanmamıştır.

Kovanecz ve ark (2009) yaptıkları bir araştırmada diyabetin süresi ve sıçanların yaşı farklı olmasına rağmen bizim sonuçlarımızla aynı olan bulgular elde etmişlerdir. 5 ay süre ile diyabet oluşturulan 7 aylık sıçanlarda yaptıkları çalışmalarında devam eden hipergliseminin sonucu olarak aortun media tabakasında düz kas hücre içeriğinde kesin bir azalmanın olduğunu belirtmişlerdir. Böylece diyabet oluşturulan sıçan grubunda aort intima-media kalınlığının kontrol grubuna

göre anlamlı bir artış göstermediğini belirtmişlerdir. Sonuç olarak daha uzun diyabet hastalığında arterlerde oluşacak fibrozisin belirgin hale gelebileceğini düşünmektedirler. Aynı çalışmada kontrol ve diyabet grupları arasında TGF β1 ekspresyonu arasında anlamlı bir fark olmadığını belirtmişlerdir. Aortta intima-media kalınlığında da bir artış gerçekleşmediği için prosklerotik bir faktör olarak tanımladıkları TGF β1'in ekspresyonunda farklılık çıkmamasının sebebini tartışmamışlardır. Fakat diyabetli sıçanlarda aortada aşırı kollajen birikiminin olduğununun belirtilmesi, metalloproteinaz aktivitesini düşüren TGF β1'in ekspresyonunda farklılıklar olmamasına ters düşmektedir. Zegarska ve ark (2003) TGF β1'in metalloproteinaz aktivitesini düşürerek kollajen birikimini arttırdığını belirtmektedirler. Kovanecz ve ark (2009)'nın çalışma sonuçları, bizim çalışmamızda abdominal aort TGF β1 ekpresyon sonuçları ile uyuşmaktadır fakat biz çalışmamızda TGF β1'in anti-aterosklerotik bir sitokin olarak görev yaptığından dolayı fark oluşmadığını düşünmekteyiz.

Hosomi ve ark (2001) yaptıkları bir araştırmada 5, 15 ve 30 haftalık OLEFT ve LETO sıçanları kullanmışlardır. 5 haftalık olan OLEFT sıçanlarının LETO sıçanlarına göre torasik aort damar duvarının media tabakasında bir kalınlık artışı olmadığını fakat 15 haftalıklar arasında anlamlı bir artış olduğunu ve tüm gruplarda torasik aort media çapında yaşlanma ile beraber önemli bir artış gerçekleştiğini göstermişlerdir. Diyabetin farklı yaş gruplarındaki sıçanlar üzerindeki etkisinin değişebildiği bu çalışma ile gösterilmek istenmiştir.

Fukuda ve ark (2005) yaptıkları bir araştırmada, bizim çalışmamızdan farklı olarak diyabetin süresini uzun tutmuşlar ve oluşturdukları deneysel diyabette 26 haftalık zaman periyodu içinde ağırlığının % 10'nunu kaybeden sıçana düşük doz insülin tedavisi uygulamışlardır. Diyabette kardiyovasküler yapısal değişikliklerin diyabetin başlangıcından 6 ay sonra gerçekleştiğini belirtmişlerdir. 6,5 ay deneysel diyabet oluşturdukları sıçan grubunda, diyabetik sıçan aort media tabakasının kalınlığının kontrol grubunun aort media tabakasının kalınlığına göre önemli bir artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Medial kalınlaşma ve kalsifikasyondan dolayı ilerlemiş aterosklerotik sürecin damar duvarında daralmayı sağladığını belirtmektedirler. ECM proteinlerinin tortulaşmasının artması ve düz kas hücrelerinin

proliferasyonunun diyabete bağımlı vasküler hipertrofi ve yeniden şekillenmenin yapısal ve fonksiyonel anahtarları olduğunu belirtmişlerdir. Glukozun uyardığı artmış ekstrasellüler protein sentezinin (kollajen 4 ve fibronektin gibi) diyabetin hedef organlarda oluşturduğu komplikasyonlara aracılık ettiğini ifade etmişlerdir. Fibronektinin ECM'de predominant bir protein olduğunu ve hücre adhezyonu, doku tamiri gibi çeşitli hücresel olaylarda önemli rolleri olduğunu belirtmişlerdir. Diyabette artmış fibronektin sentezini etkileyen faktörler arasında fibrojenik proteinler olan Endotelin, TGF β1 ve anjiyotensin II'nin olduğunu belirtmişlerdir. Bu proteinlerin ECM'yi arttırıcı etkileri yaygın olarak kabul edilmektedir. Ayrıca 6,5 ay süre ile Tip 1 diyabet oluşturulan sıçan damar duvarında TGF β1 seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gösterdiğini bulmuşlardır. Fukuda ve ark (2005) çalışmalarında TGF β1 ile diğer sitokinlerin ECM'yi arttırdığı sonucunu çıkarmışlardır.

Akgün ve ark (2007) 6-6,5 aylık erkek sıçanlarda deneysel Tip 1 diyabet oluşturduktan 60 gün sonra sıçanları sakrifiye etmişler ve sıçanlardan alınan torasik aortlarda yaptıkları morfolojik ölçümlerde tunika intima tabakasında diyabetli hayvanlarda kontrollere göre bir kalınlık artışının olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda tunika intima ve media tabakalarında diyabet ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark artışı çıkmadı. Bu yönüyle çalışmamıza ters düşmektedir. Fakat bizim 3 aylık onların ise 6- 6,5 aylık sıçanları kullanmasının çalışma bulgularını etkilediğini düşünmekteyiz.

Birçok çalışma hipergliseminin diyabetin kronik komplikasyonlarının patolojisinde önemli olduğunu belirtmektedir. Yükselmiş glukozun birçok farklı hücreyi aktive ederek ECM sentezini uyardığını bildirilmektedir. Bu süreci TGF β 'nın stimüle ettiği düşünülmektedir (Yasuda ve ark 2001, Flores ve ark 2004, Pueyo ve ark 2004, Yener ve ark 2007). TGF β hücrelerin proliferasyonunu ve farklılaşmasını, embriyonik gelişmeyi, yara iyileşmesini ve anjiyogenezi düzenler. TGF β'nın üretiminin artıp, azalması birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Bunlar arasında aterosklerozis, böbreklerin fibrozisi, karaciğer ve akciğer bulunur ( Blobe ve ark 2000).

TGF β1'in aterosklerozu içeren vasküler hastalıkların fizyopatolojisinde çok önemli roller oynadığı düşünülmektedir (Minami ve ark 2000). TGFβ1'in normal vasküler yapıyı sürdürmek için gerekli olan aterosklerozdan koruyucu bir sitokin olduğu ileri sürülüyor. Nitekim TGFβ1'i nötralize eden bir antikorun varlığında damar duvarında aterosklerozun hızlandığı rapor edilmiştir (Ortega ve ark 2007, Oyadomari ve ark 2001, Watanabe ve ark 2007).

Farklı olarak TGFβ1'in aterosklerotik bir sitokin olduğu hakkında da çeşitli görüşlü bulunmaktadır. Arterlerin intimal kalınlaşmasını, ekstrasellüler matriks proteinlerinin sentezini arttırarak sağladığı belirtilmiştir (Kanzaki ve ark 2003). TGF β'nın kollajenlerin sentezini başlatarak ve metalloproteinaze sentezini inhibe ederek ateroskleroza zemin hazırladığı belirtilmiştir (Zegarska ve ark 2003). Sharma ve ark (2003) TGF β1'in patolojik süreçlerin başlamasını sağladığı ileri sürülmektedir

TGF β çeşitli hücre tiplerinde ECM sentezini, onların hücre içi sinyal yolunu (Smadlar) uyararak sağlamaktadır. TGF-Beta reseptörlere bağlandıktan sonra ortak Smadları ( Smad2 ve Smad3) aktive etmektedir. Bu proteinlerin daha sonra Smad4'e bağlandığı, hücre çekirdeğine transloke olduğu ve hedef gen ekspresyonunu düzenlediği vurgulanmıştır. TGF β 'nın sinyal yolu aktivasyonu, inhibe edici Smadların (İSmad- Smad6, Smad7) ekspresyonuyla da sonuçlanabilir. İSmadlar Smad2 ve Smad3'ü inhibe etmektedirler. Çalışmalarında yüksek glukozun Smad sinyal yolunu aktive ettiği, Smad2 ve Smad3 fosforilasyonunun ve nüklear translokasyonun gerçekleşmesi ve bunun da kollajen 1 mRNA ve protein ekspresyonunu kültüre edilmiş VECs'de ve VSMCs'de arttırmasıyla anlaşılmıştır. Bu sonuçlar medyumda 24 saatte TGF β üretiminin artmasıyla desteklenmiştir çünkü TGF β nötralize edici antikorun eklenmesiyle yüksek glukozun indüklediği Smad2 nüklear translokasyonunun, Smad2 ve Smad3 fosforilasyonunun ve kollajen tip 1 mRNA ve protein ekspresyonunun da bloklandığı belirtilmiştir. Tam tersine, normal glukoza maruz bırakılan hücrelerde TGF β nötralizan antikorunun varlığında veya yokluğunda Smad2 ve Smad3 fosforilasyonunda, kollajen tip 1 mRNA ve protein ekspresyonunda önemli bir artış gözlenmemiştir. Smad3'ün fibroziste kritik bir rolü bulunduğu ve fibronektin aktivasyonunu yükselttiği belirtilmektedir. Bu çalışmada yüksek glukozun TGF β üretimini uyararak Smad2 ve Smad3'ü aktive

ettiği ve vasküler hücrelerde kollajen matriks üretimini arttırdığı düşünülmektedir. Yüksek glukozun TGF β üretimini arttırdığı belirtilmektedir (Li ve ark 2003).

Yener ve ark (2007) çalışmalarında gestasyonel diyabetli hastaların serumlarında tip 2 diyabetli hastaların serumlarına göre yüksek, kontrol grubunun serumlarına göre ise çok yüksek TGF β1 seviyelerine rastlamışlardır. TGF β1 ekspresyonunu etkileyen çeşitli faktörlerin olduğunu, hipergliseminin ekspresyonun ana tetikçisi olduğu ve diyabetli hastaların normal hastalara göre daha yüksek TGF β1 seviyelerinin olduğu belirtmişlerdir. Glukozun TGF β1 ekspresyonunu arttıran anahtar bir mediatör olduğu düşüncesini desteklemektedirler.

Itoh ve ark (1993) düz kas hücre proliferasyonuna aracılık eden faktörlerin kimliklerinin tam açıklanamadığını belirtmiş ve yaptıkları araştırmada TGF β1'in kültüre edilmiş sıçan aort düz kas hücrelerinin proliferasyonu üzerine kuvvetli inhibitör etkisi bulunduğunu ayrıca anti-TGF β1 nötralize edici antikoru kullandıkları zaman hücre sayısında önemli bir artış gerçekleştiğini (%50) belirtmektedirler. TGF β1'in kültüre edilmiş düz kas hücrelerinin hipertrofisini indüklediğini ifade etmişlerdir. Anjiyotensin II'nin bFGF ve TGF β1'in aktivasyonunu kültüre edilmiş düz kas hücrelerinde düzenlediğini belirtmişlerdir. Düz kas hücrelerinin göçü ve hızlı proliferasyonunun bFGF, TGF β1 ve anjiyotensin II ekspresyonlarının etkileşim altında bulunduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarında kültüre edilmiş düz kas hücrelerinde otokrin büyüme faktörlerinin ekspresyonları ve faaliyetleri arasındaki karmaşık etkileşimi ortaya çıkarmaya çalışmışlardır.

Rumble ve ark (1997) Tip 1 diyabet oluşturdukları sıçanları 7 gün, 3 hafta ve 8 ay sonunda sakrifiye etmişler ve diyabetik mezenterik arter duvarında her grupta artmış TGF β1 ekspresyonuna rastlamışlardır. Bunu da glukozun aracılık ettiği protein kinaz C'nin aktivasyonuna ve ilerlemiş glikolizasyon son ürünlerinin etkisiyle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. TGF β1'i ECM'nin yayılışına aracılık eden bir prosklerotik sitokin olarak tarif etmişlerdir.

Yasuda ve ark (2001) çalışmalarında TGF β1'in latent bir formda sentezlendiğini ve etki gösterebilmesi için biyolojik olarak aktifleşmesi gerektiğini

belirtmişlerdir. TGF β1'in lokal biyoyararlanımının bir çok faktör tarafından etkilenebileceğini ve bunların çevredeki glukoz konsantrasyonu, latent TGF β1 aktivasyonu, TGF β1'in matriks proteoglikanlarına bağlanması ve TGF β1'in otoindüksiyonu olarak belirtilmiştir. Glukozun aktif TGF β1 seviyelerini plazmin veya diğer proteazların salınımı üzerinden arttırabileceğini, bundan dolayı uygun mediyada yüksek glukoz tarafından aktif TGF β1 konsantrasyonlarında artış meydana gelebileceğini belirtmişlerdir. Fakat aort düz kas hücre kültüründe kullandıkları fötal sığır serumunda bol miktarda TGF β1 bulunmasına rağmen ELISA ile ölçtükleri TGF β1 seviyesinde artış meydana gelmediğini yani TGF β1'in aktif formunun oluşmadığını belirmişlerdir. Bunu TGF β1'in yarı ömrünün kısa olması ve glukozun kısa bir süre için TGF β1 transkripsiyon aktivitesini uyarmasına bağlamışlardır. Bu açıklama bizim çalışmamızda abdominal aortta TGF β1'in negatif ekspresyonunu izah eden sebeplerden bir tanesi olabilir.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Literatürde insanlarda yapılan çalışmalarda intima media kalınlık artışının diyabetli gruplarda kontrol gruplarına göre anlamlı çıkması, insan ömrünün fizyolojik olarak uzun sürmesi, kolesterol yönünden zengin diyetle beslenmesi, yaş ve hastalıkla birlikte artan hareketsizlik, sigara, stres gibi birçok faktöre bağlıdır. Sıçanlarda deneysel diyabet ile ilgili yapılan araştırmalarda ise intima ve media tabakalarında diyabetten ziyade yaşla birlikte anlamlı bir artış gözlenmiştir. Genetik markerlerin değişkenliği yüzünden her canlının risk prolifi farklılığı ve diyabetin komplikasyonlarında değişik yorumlara yol açabileceği de unutulmamalıdır.

Çalışmamızda sıçanlarda oluşturulan 60 günlük diyabet süresinin aortun farklı segmentlerinde intima-media tabakalarında kalınlaşmaya sebep olabilecek patolojik değişiklikler için yeterli bir süre olmadığı sonucuna ulaştık. Deneysel diyabet gruplarının hiperglisemi etkisinde kalma süresini ve yaşam süresini uzatabilmek için kontrollü insülin tedavisinin yapılmasının, insanlarda oluşan diyabetik kronik komplikasyonlara benzer ölçüde yaklaşık veriler ve başarılı sonuçlar elde edilmesine sebep olabileceği ve böylece daha sağlıklı sonuçlara ulaşılabileceği kanaatindeyiz.

Çalışmamızda TGF β1'in diyabetik sıçanlarda torasik aort damar duvarında ekspresyonu kontrollere göre yüksek çıkmıştı. Hipergliseminin TGF β1 ekspresyonunu tetiklediği ve TGF β1'in anti prosklerotik bir sitokin olarak torakal aortta görev yaptığı düşünülebilir. Abdominal aortta ise diyabet ve kontrol grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark çıkmamıştı. TGF β1 sinyal iletimi aksaklığının direk hastalığa yol açtığına dair bulguların bulunduğunu belirtmiştik. Aterosklerotik plağın abdominal aortta torasik aorta göre daha fazla tutulduğu göz önüne alınırsa abdominal aortun patolojik mekanizmalara daha duyarlı olması ve patolojik süreçlerin daha önce başlamasının TGF β1 ekspresyonunu etkilediği düşünülebilir. Literatürde TGF β1 üretimindeki azalmaların aterosklerozla sonuçlanabileceği belirtilmişti. Abdominal aortta ekpresyonunun negatif olması ve

aterosklerotik sürece yatkın olması, zaman içinde (yaşlanma) gelişebileceği düşünülerek buna uygun bir zemin hazırlandığı şeklinde yorumlanabilir. TGF β1'in normal damar duvarının yapısını sürdürebilmek için aterosklerozdan koruyucu bir sitokin olarak görev yaptığını düşünülebilir. TGF β1'in yarılanma ömrünün kısa olması da ekspresyonu etkileyen diğer bir faktör olabilir.

# 6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Deneysel Diyabette Dişi Sıçan Aortunda TGF β1 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi ve Aort Katmanlarının Ölçümlerinin Karşılaştırılması**

**Gökhan Cüce**

**Histoloji Embriyoloji (TIP) Anabilim Dalı**

**DOKTORA TEZİ / KONYA – 2010**

Bu çalışmada deneysel diyabetin multifonksiyonel bir sitokin olan TGF β1'in abdominal ve torasik aorta duvarındaki ekspresyonuna ve aorta duvarında tunika intima ve tunika media kalınlıklarına etkisi incelenmiştir.

Çalışmamızda 24 adet 3'er aylık 250- 300 gr ağırlığında Sprague-Dawley türü dişi sıçan kullanıldı. Diyabet ve kontrol olmak üzere iki grup oluşturuldu. Deneysel diyabet grubuna streptozotosin 50 mg/kg intraperitoneal olarak tek enjeksiyonla verilerek oluşturuldu. Kontrol grubuna ise serum fizyolojik 50 mg/kg intraperitoneal olarak verildi. Başka hiçbir uygulama yapılmadan 60. gün sonunda anestezi altında iki grubun da abdominal ve torakal aorta damarları çıkarıldı. Kontrol torasik (TK), diyabetli torasik (TD), kontrol abdominal (AK) ve diyabetli abdominal (AD) olmak üzere 4 adet inceleme grubu oluşturuldu. Dokuların rutin histolojik takibi yapıldı. Elde edilen parafin bloklardan 4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen Eozin ve Verhoeff Van Gieson elastik lif boyaları ile boyandı. Işık mikroskobunda abdominal ve torasik aort damarlarının intima ve media kalınlıkları ölçüldü. Ölçümler oküler mikrometre ile yapıldı İmmunohistokimya boyaması için Genway Anti-TGF beta (TB21) IgG 20-272-193974 primer antikoru kullanıldı. İntima ve media kalınlık ölçümlerinde AD ve AK grupları, TD ve TK grupları kendi aralarında değerlendirildi ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. TGF β1 ekspresyonunda ise TD grubunda TK grubuna göre anlamlı bir artış gözlendi. AD ve AK grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

Çalışmamızda 60 günlük diyabet süresinin diyabetin aortun farklı segmentlerinde intima-media tabakalarında kalınlaşmaya sebep olabilecek patolojik değişiklikler için yeterli bir süre olmadığını düşünmekteyiz. Deneysel diyabet gruplarının hiperglisemi etkisinde kalma süresini ve yaşam süresini uzatabilmek için kontrollü insülin tedavisi yapılmasının insanlarda oluşan diyabetik kronik komplikasyonlara benzer yaklaşık veriler ve başarılı sonuçlar elde edilmesine sebep olabileceği düşünülmektedir. TGF β1'in abdominal aorta duvarında ekpresyonunun negatif olması ve abdominal aortun ateroskleroz gelişimine yatkın olması, zaman içinde (yaşlanma ile) gelişebileceği düşünülerek buna uygun bir zemin hazırlandığı şeklinde yorumlanabilir. Torasik aorta duvarında ise hücre adezyonu ve doku tamiri gibi hücresel olayları düzenlediği şeklinde yorumlanabilir.

**Anahtar Sözcükler**: Aorta, Diyabet, intima media kalınlığı, TGF β1.

# 7. SUMMARY

## Evalution of TGF β1 Expression and Compare of Measurement of Aort Layers on The Aorta of Female Rats in Experimental Diabetes

In this study, it was aimed to investigate the effects of experimental diabetes on TGF β1 expression which is a multifunctional cytokin on abdominal and thoracic aortic wall, tunica intima and tunica media thickness in aorta wall. Twenty four three months old female Sprague Dawley rats weighing 250 to 300 g were used in this study. The rats were divided into two groups each. They were non-diabetic and streptozotocin (STZ)-induced diabetic group. In the diabetic group, diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of 50 mg/kg STZ that was prepared in a 0.1 M citrate buffer solution, pH 4.5. Non-diabetic rats were injected saline only. At the end of the 60. day without any other application 2 of the groups were taken under anesthesia, the abdominal and thoracic arteries were removed. Four study groups toracic control (TC), thoracic diabetic (TD), abdominal control (AC) and abdominal diabetic (AD) were formed. 4 micron paraffin sections belong to aortic tissue were performed after routine histologic process. Hematoxylin Eosin and Verhoeff's elastic staining were performed. Evaluations were performed under a light microscope. Abdominal and thoracic intima thickness and media thickness of aorta were measured with the oculometer. For immunohistochemistry staining Anti-TGF beta (TB21) IgG 20-272-193974 primary antibody was used. In the evaluation of intima and media thickness measurements there were no significant statistical differences between AD and AC groups and TD and TC groups. TGF β1 expression showed a significant increase in TD group compared to TC. AD and AC did not differ significantly.

In our study we think that 60 day duration of diabetes is not enough time for the pathological changes could lead to thickening in different segments of the aortic intima-media layers. In human studies tunica intima and tunica media thickness of the aorta increased significantly with diabetes compared with the control groups because of many factors such as human life is longer than experimental models as physiologically, with cholesterol-rich diet nutrition, physical inactivity increased with age, disease, smoking and stress. To extend to time of staying under the effects of hiperglisemia and to prolong to life for experimental diabet groups, controlled insulin therapy can be done thus its thought to may cause that approximately similar data and succesful results will be obtained like diabetic cronic complications occur in people. TGF β1 expression was negative in the wall of the abdominal aorta and abdominal aorta is predisposed to the development of atherosclerosis, it could be developed with overtime (aging), it can be interpreted for preparing an appropriate basis for the development of atherosclerosis. In the toracic aorta wall, it can be interpreted that TGF β1 coordinates the cellular events such as cell adhesion and tissue repair.

**Key Words**: Aorta, Diabetes, intima-media thickness, TGF β1.

# 8.KAYNAKLAR


1. Abacı A, Böber E, Büyükgebiz A. Tip 1 Diyabet. Güncel Pediatri, 2007;5:1-10.

2.Akgün DK, Bolkent S, Yanardag R, Tunali S. Vanadyl sulfate protects against streptozotocin induced morphological and biochemical changes in rat aorta. Cell Biochem Funct, 2007;25: 603–609.

3.Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabet Med, 1998; 15(7): 539-53.

4.Artan ME. Histoloji 2, 1. Baskı, İstanbul, İstanbul Üniversitesi Basımevi, 1982, 9.

5.Astrand H, Rydén-Ahlgren A, Sundkvist G, Sandgren T, Länne T. Reduced aortic wall stress in diabetes mellitus. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2007;33(5):592-8.

6.Ayvaz G, Diyabetes Mellitus Patogenezi, In: İliçin G, Biberoğlu K, Süleymanlar G Ünal S, editors. İç Hastalıkları, 1.Baskı, Ankara, Güneş Kitabevi, 2003, 2295-2296.

7.Azezli A, Orhan Y. Şişmanlık ve Diabetes Mellitus, In. Editors: Orhan Y, Bozbora A. Obezite Medikal ve Cerrahi Tedavisi, 2. Baskı, İstanbul, İstanbul Medikal Yayıncılık, 2008, 143.

8.Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor (beta) in human disease. N Engl J Med. 2000; 342: 1350-8.

9.Bloom W, Fawcett DW. A Textbook of Histology, Ninth Edition, Saunders Company. 1968, 358-365-366.

10.Bradbury P, Gordon KC, Connective tissues and stains, In: Bancroft JD, Stevens A, Turner DR. Theory and Practise of Histological Technigues. Third Edition, NewYork, Longman Group, 1990,136-137.

11.Çimen A. Anatomi. 2. Baskı. Bursa, Uludağ Üniversitesi Basımevi, 1991; 199.

12.Demirkazık A, Gültürk S. Diyabetin iskelet kası üzerine etkileri. C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi, 2006;28(4):133-135.

13.El-Mahmoudy A, Shimizu Y, Shiina T, Matsuyama H, El-Sayed M, Takewaki T. Successful abrogation by thymoquinone against induction of diabetes mellitus with streptozotocin via nitric oxide inhibitory mechanism. Int Immunopharmacol, 2005; (1):195-207.

14.Flores L, Näf S, Hernáez R, Conget I, Gomis R, Esmatjes E. Transforming growth factor B1 at clinical onset of Type 1 diabetes mellitus. A pilot study. Diabet Med, 2004;21(8):818-22.

15.Fukuda G, Khan ZA, Barbin YP, Farhangkhoee H, Tilton RG, Chakrabarti S. Endothelin-mediated remodeling in aortas of diabetic rats. Diabetes Metab Res Rev, 2005;21(4):367-75.

16.Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. Firsth edition. Philadelphia, Pennsylvania, 1997; 213.

17.Gartner LP, Hiatt JL. Renkli Histoloji Atlası, In: Dağdeviren A, Müftüoğlu FS, Karabay G, editors. Dördüncü Baskı, Ankara, Güneş Tıp Kitabevi, 2009, 149-150.

18.Gövsa G. Sistemik Anatomi, 1. Baskı, İzmir, Güven Kitabevi, İzmir, 2003,311-320.

19.Grainger DJ. TGF-β and atherosclerosis in man. Cardiovasc Rese, 2007;74(2): 213-222.

20.Green EC. Anatomy of the Rat. Firsth Edition. Philadelphia, Hafner Publishing Compan, 1963;197-198.

21.Guyton AC, Hall JE, Tıbbi Fizyoloji Kitabı, In: Çavuşoğlu A, Yeğen BÇ, Aydın Z, Alican İ, editors, 1. baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 1996,972.

22.Gündüz A, Er H. Sitokinler ve oftalmojideki yerleri. T Klin Oftalmoloji, 2000;9: 53-58.

23.Güner İ, Özmen D, Bayındır O. Sitokinler. T Klin J Med Sci, 1997;17: 65-74.

24.Haas LB. Pathophsiology of diabetes mellitus. Nurse Pract Forum, 1998;9(2):42-45.

25.Harrington J, Peña AS, Gent R, Hirte C, Couper J. Aortic intima media thickness is an early marker of atherosclerosis in children with type 1 diabetes mellitus. J Pediatr, 2010;156(2):237-41.

26.Hosomi N, Mizushige K, Ohyama H, Takahashi T, Kitadai M, Hatanaka Y, Matsuo H, Kohno M, Koziol JA. Angiotensin-converting enzyme inhibition with enalapril slows progressive intima-media thickening of the common carotid artery in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. Stroke, 2001;32(7):1539-45.

27.Hrabák A, Szabó A, Bajor T, Körner A. Differences in the nitric oxide metabolism in streptozotocin-treated rats and children suffering from Type 1 diabetes. Life Sci, 2006;78(12):1362-70.

28.Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JE. Diabetes and advanced glycoxidation end products. Diabetes Care, 2006;29(6):1420-32.

29.Ishibashi M, Egashira K, Hiasa K, Inoue S, Ni W, Zhao Q, Usui M, Kitamoto S, Ichiki T, Takeshita A. Antiinflammatory and antiarteriosclerotic effects of pioglitazone. Hypertension, 2002;40(5):687-93.

30.Itoh H, Mukoyama M, Pratt RE, Gibbons GH, Dzau VJ. Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. J Clin Invest, 1993;91(5):2268-74.

31.Ize-Ludlow D, Sperling MA. The classification of diabetes mellitus: a conceptual framework. Pediatr Clin North Am, 2005;52(6):1533-52.

32.İrer SV, Alper G. Deneysel Diyabet Modelleri. Türk Klinik Biyokimya Derg 2004;2(3):127-136.

33.Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Temel Histoloji, In: Aytekin A, Solakoğlu S, editors. 7. Baskı, İstanbul, Barış Kitabevi, 1993,254-255.

34.Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji- text and atlas. In: Solakoğlu S, Aytekin Y, editors. Eleventh edition, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2009,205-206.

35.Kalaycı Ş. Histoloji, 1. baskı, Bursa, Uludağ Üniversitesi Basımevi, 1986,517-518.

36.Kang KA, Lee KH, Kim SY, Kim HS, Kim JS, Hyun JW. Cytoprotective effects of KIOM-79 on streptozotocin induced cell damage by inhibiting ERK and AP-1. Biol Pharm Bull. 2007;30(5):852-8.

37.Kanzaki T, Otabe M. Latent transforming growth factor-beta binding protein-1, a component of latent transforming growth factor-beta complex, accelerates the migration of aortic smooth muscle cells in diabetic rats through integrin-beta3. Diabetes, 2003;52(3):824-8.

38.Kawada J. [New hypotheses for the mechanisms of streptozotocin and alloxan inducing diabetes mellitus]. Yakugaku Zasshi, 1992;112(11):773-91.

39.Kayalı H. İnsan Embriyolojisi, Üçüncü Baskı, İstanbul, Taş Matbaası, 1984,110-117.

40.Kergoat M, Portha B. In vivo hepatic and peripheral insulin sensitivity in rats with non-insulin dependent diabetes induced by streptozocin. Assessment with the insulin-glucose clamp technique. Diabetes. 1985;34(11):1120-6.

41.Kierszenbaum AL. Hücre ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş, In: Demir R, editors. 1. Baskı, Ankara, Palme Yayıncılık, 2006,325.

42.King GL. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. J Periodontol, 2008;79(8): 1527-34.

43.Kovanecz I, Nolazco G, Ferrini MG, Toblli JE, Heydarkhan S, Vernet D, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF. Early onset of fibrosis within the arterial media in a rat model of type 2 diabetes mellitus with erectile dysfunction. BJU Int, 2009;103(10):1396-404.

44.Kumar V, Coltran RS, Robbins SL. Robbins Temel Patoloji, In: Çevikbaş U, editors, 7. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2003,327-331.

45. Kuzuya T. Early diagnosis, early treatment and the new diagnostic criteria of diabetes mellitus. Br J Nutr, 2000; 84(2):177-81.

46. Kuzuya T, Nakagawa S, Satoh J, Kanazawa Y, Iwamoto Y, Kobayashi M, Nanjo K, Sasaki A, Seino Y, Ito C, Shima K, Nonaka K, Kadowaki T; Committee of the Japan Diabetes Society on the diagnostic criteria of diabetes mellitus. Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. Diabetes Res Clin Pract, 2002;55(1):65-85.

47.Leeson TS, Leeson CR, Paparo AA. Text/Atlas of Histology, sixth edition, Philadelphia, Saunders Company, 1988,315.

48.Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia, 2008;51(2):216-26.

49.Li JH, Huang XR, Zhu HJ, Johnson R, Lan HY. Role of TGF-beta signaling in extracellular matrix production under high glucose conditions. Kidney Int, 2003;63(6):2010-9.

50.Minami M, Kume N, Kataoka H, Morimoto M, Hayashida K, Sawamura T,Masaki T, Kita T. Transforming growth factor-b1 increases the expressionof lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000; 272: 357-361.

51. Moore KL. The Developing Human, Fourth Edition, Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1988, 292-294.

52.Moore KL, Persaud TVN. Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi, In: Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H, 6. Baskı, Nobel Matbaacılık, İstanbul, 2002,358.

53. Moore Kl, Persaud TVN. Embriyoloji ve Doğum Defektlerinin Temelleri, In: Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P, 7. Baskı, Ankara, Güneş Tıp Kitapevi, 2009, 192-202.

54.Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper'in Biyokimyası, In: Menteş G, Ersöz B, editors, 22. Baskı, İstanbul, Barış Kitabevi, 1993, 234.

55.Nebıgil C, Sarıoğlu Y. Diyabet komplikasyonları ve prostaglandinler. Türkiye Klinikleri, 1985;5:161-165.

56.Odar İV. Anatomi Ders Kitabı II. 11. Baskı. Ankara, Elif Matbaacılık, 1979; 426-428.

57.Orhan Y, Özbey N. Şişmanlık Bilimi Açıklamalı Terimler Sözlüğü, 1. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2002,43-44.

58.Ortega MR, Vita JR, Lopez ES, Carvajal G, Jesús Egido. TGF-β signaling in vascular fibrosis. Cardiovasc Res, 2007;74(2):196-206.

59.Ottowa University. Vessel histology. 2010. Avalaible from http://www.courseweb.uottawa.ca/medicinehistology/English/Cardiovascular/HistologyBloodVessels.htm

60.Ovalle WK, Nahirney PC. Netter Temel Histoloji, In: Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P, editors, 1. Baskı, Ankara, Öncü Basımevi, 2009, 179.

61.Oyadomari S, Gotoh T, Aoyagi K, Araki E, Shichiri M, Mori M. Coinduction of endothelial nitric oxide synthase and arginine recyling enzymes in aorta of diabetic rats. Nitric Oxide, 2001;5(3):252-60.

62. Öntürk H, Özbek H. Deneysel diyabet oluşturulması ve kan şeker seviyesinin ölçülmesi. Genel Tıp Derg, 2007;17(4): 231-236.

63.Özgüneş H, Atasayar S. Aminoguanidin ve hastalıklardaki önemi. Turkiye Klinikleri J Med Sci, 2009;29(4): 976-86.

64.Öztürk F, Gül M, Ağkadir M, Yağmurca M. Deneysel diyabetin sıçan testislerinde meydana getirdiği histolojik değişiklikler. T Klin Tıp Bilimleri, 2002;22:173-178.

65.Pascual G, Mendieta C, García-Honduvilla N, Corrales C, Bellón JM, Buján J. TGF-β1 upregulation in the aging varicose vein. J Vasc Res, 2007;44:192–201.

66.Pepper MS. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. Cytokine Growth Factor Rev, 1997;8(1):21-43.

67.Popov D, Constantınescu E. Arterial smooth muscle cells dysfunction in hyperglycaemia and hyperglycaemia associated with hyperlipidaemia: from causesto effects. Arch Physiol Biochem, 2008;114(2):150 -160.

68.Pueyo ME, Challah M, Gauguier D, Louedec L, Philippe M, Gaertner R, Marre M, Michel JB, Jacob MP. Transforming growth factor-beta 1 production is correlated with genetically determined ACE expression in congenic rats: a possible link between ACE genotype and diabetic nephropathy. Diabetes, 2004;53(4):1111-8.

69.Reimann M, Bonifacio E, Solimena M, Schwarz PE, Ludwig B, Hanefeld M, Bornstein SR.An update on preventive and regenerative therapies in diabetes mellitus. Pharmacol Ther, 2009;121(3):317-31.

70.Ross MH, Reith EJ, Romrell LJ. Histology A Text and Atlas, second edition, Baltimore, Williams and Wilkins, 1989, 285.

71.Ross R, The Circulatory system, In: McGee JOD, Isaacson PG, Wright NA, editors. Oxford Textbook of Pathology, Glasgow, Oxford University Press, 1992, 813-814.

72.Rumble JR, Cooper ME, Soulis T, Cox A, Wu L, Youssef S, Jasik M, Jerums G, Gilbert RE. Vascular hypertrophy in experimental diabetes. Role of advanced glycation end products. J Clin Invest, 1997;99(5): 1016–1027.

73.Sadler TW. Langman Medikal Embriyoloji, In: Başaklar AC, editors, 9. Baskı, Ankara, Palme Yayıncılık, 2005, 98-215-217.

74.Sharma K, Deelman L, Madesh M, Kurz B, Ciccone E, Siva S, Hu T, Zhu Y, Wang L, Henning R, Ma X, Hajnoczky G. Involvement of transforming growth factor-beta in regulation of calcium transients in diabetic vascular smooth muscle cells. Am J Physiol Renal Physiol, 2003;285(6):1258-70.

75.Soyöz M, Özçelik N. TGF-β (Transforming Growth Factor-β) ve sinyal iletimi. Turkiye Klinikleri J Med Sci, 2007;27:426-433.

76.Squadrito G, Cucinotta D. The late complications of diabetes mellitus. Ann Ital Med Int, 1991;6(1Pt2):126-36.

77.Stevens A, Connective tissues and stains, In: Bancroft JD, Stevens A, Turner DR. Theory and Practise of Histological Technigues. Third Edition, NewYork, Longman Group, 1990, 109.

78.Stirban A, Rösen P, Tschoepe D. Complications of type 1 diabetes: new molecular findings. Mt Sinai J Med, 2008;75(4):328-51.

79.Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. Physiol Res, 2001;50(6):537-46.

80.Şeftalioğlu A. İnsan Embriyolojisi, 3. Baskı, Ankara, Tıp ve Teknik Yayıncılık, 1998, 416-417.

81.Turk J, Corbett JA, Ramanadham S, Bohrer A, McDaniel ML. Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. Biochem Biophys Res Co, 1993;197(3):1458-64.

82. Vardı N, Uçar M, Iraz M, Öztürk F. Deneysel diyabetin sıçan endokrin pankreasında oluşturduğu morfolojik değişiklikler. T Klin Tıp Bilimleri, 2003;23:27-32.

83.Vardı N, Iraz M, Öztürk F, Uçar M, T Gül M, Eşrefoğlu M, Otlu A. Deneysel diyabetin sıçan böbreklerinde meydana getirdiği histolojik değişiklikler üzerine melatoninin iyileştirici etkileri. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 2005;12(3):145-152.

84. Vardı N, Iraz M, Öztürk F, Gül M, Uçar M, Çetin A, Nalçacı N, Otlu A. Deneysel diyabetin sıçan karaciğerinde meydana getirdiği histolojik değişiklikler üzerine melatoninin iyileştirici etkileri. Türkiye Klinikleri J Med Sci, 2007;27:641-648.

85.Vinik AI, Vinik E. Prevention of the complications of diabetes. Am J Manag Care, 2003;9(3):63-80.

86.Wang CY, She JX. SUMO4 and its role in type 1 diabetes pathogenesis. Diabetes Metab Res Rev, 2008;24(2): 93-102.

87.Wang XJ, Dong Z, Zhong XH, Shi RZ, Huang SH, Lou Y, Li QP. Transforming growth factor-b1 enhanced vascular endothelial growth factor synthesis in mesenchymal stem cells. Biochem and Bioph Res Co, 2008; 365(3):548–554.

88.Watanabe M, Oike M, Ohta Y, Ito Y. Long-term treatment with TGF$\beta_1$ impairs mechanotransduction in bovine aortic endothelial cells. Br J Pharmacol. 2007;150(4):424-33.

89.Weiss L, Greep RO. Histology, fourth Edition, USA, Halliday Lithograph Corporation, 1977, 378.

90.Wikipedia. Streptozotocin. 2010; cited [2010 March 26 ]. Avalaible from http://en.wikipedia.org/wiki/Streptozotocin

91.Yasuda Y, Nakamura J, Hamada Y, Nakayama M, Chaya S, Naruse K, Nakashima E, Kato K, Kamiya H, Hotta N. Role of PKC and TGF-beta receptor in glucose-induced proliferation of smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun, 2001;281(1):71-77.

92.Yener S, Demir T, Akinci B, Bayraktar F, Kebapcilar L, Ozcan MA, Biberoglu S, Yesil S. Transforming growth factor-beta 1 levels in women with prior history of gestational diabetes mellitus. Diabetes Res Clin Prac, 2007;76: 193-198.

93. Zegarska J, Paczek L, Pawlowska M, Bartlomiejczyk I, Rowinski W, Kosieradzki M, Malanowski P, Kwiatkowski A, Grochowiecki T, Szmidt J. Extracellular matrix proteins, proteolytic enzymes, and TGF-Beta1 in the renal arterial wall of chronically rejected renal allografts. Transplant Pr, 2003;35:2193–2195.

## 10.ÖZGEÇMİŞ

Gökhan Cüce 1978 yılında Mersin'de doğdu. Ortaokul ve lise öğrenimi Meram Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 1997 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni kazandı. 2003 yılında mezun oldu. 2003-2005 yılları arasında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde Zootekni Anabilimdalı'nda tezsiz yüksek lisansını tamamladı. 2005 yılında Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Embriyoloji (Tıp) Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı.