

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**STREPTOZOTOSİN İLE DENEYSEL
DİYABET OLUŞTURULAN SIÇAN
KARACİĞER DOKUSUNDA VASKÜLER
ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖR (*VEGF*)
GENİNİN İFADESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SELİN ÇELİK
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ**

MALATYA-2012

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**STREPTOZOTOSİN İLE DENEYSEL
DİYABET OLUŞTURULAN SIÇAN
KARACİĞER DOKUSUNDA VASKÜLER
ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖR (*VEGF*)
GENİNİN İFADESİ**

SELİN ÇELİK

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ

**Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2011/149 proje numarası ile desteklenmiştir.**

MALATYA-2012

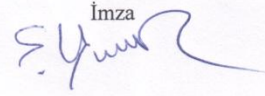
ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Elif YEŞİLADA

İmza


Üye

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ



Danışman

Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ



ONAY :

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu...../...../2012 tarih ve 2012/.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Sayın Hocam Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ'e,
Deneysel Analizlerin bazılarının yapılmasında katkısı bulunan Sayın Doç.
Dr. Müslüm AKGÖZ'e

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren ve eğitimimde katkıları bulunan tüm hocalarıma,

Tez çalışmalarım süresince bana sonsuz sabır gösteren, sevgi ve şefkatini esirgemeyen aileme, yardımını ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim Dr. Cem Naci SOLMAZ'a,

Tez çalışmamın laboratuvar çalışmaları aşamasındaki yardımlarından dolayı arkadaşım Yeliz ODABAŞI'na, istatistiksel yorumlamalarından dolayı Sayın Doç. Dr. Cemil ÇOLAK'a,

Tezimi destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

ÖZET

Bu tezde deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanların karaciğer dokusunda vasküler endotelyal büyüme faktörü'nün (*VEGF*) gen ifadesini araştırmak amacıyla 20 adet dişi Wistar cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar, kontrol grubu ve deneysel diyabet grubu olmak üzere iki gruba ayrıldılar. Deneysel diyabet grubundaki sıçanlara kilogram vücut ağırlığı başına 50 mg streptozotosin (STZ), 0,01 M sitrat tamponu içerisinde (pH: 4,5) çözülerek karın içi uygulama yol ile tek doz verildi. Kontrol grubu sıçanlara ise STZ'nin çözüldüğü taşıt madde olan 0,01 M sitrat tamponu karın içi yolla tek doz uygulandı. STZ uygulamasının ardından 72 saat sonra sıçanların kuyruk veninden alınan kanlardan kan şeker ölçümü yapıldı ve açlık kan şekerleri 350 mg/dL ve üzerinde olanlar diyabetli kabul edildiler. STZ uygulamasından 21 gün sonra sıçanlar dekapite edilerek karaciğer dokuları alındı ve gerçek zamanlı PZR'de *VEGF* gen ifadesine bakıldı. Sonuçta diyabet ve kontrol grubu sıçanların karaciğer *VEGF* gen ifadesinde anlamlı bir fark bulunmadı.

Anahtar Sözcük: Sıçan, Diyabet, Streptozotosin, *VEGF*

ABSTRACT**THE GENE EXPRESSION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (*VEGF*) IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED EXPERIMENTAL DIABETES IN RAT LIVER TISSUE**

In this thesis, 20 female Wistar rats with experimentally induced-diabetes were used to investigate the gene expression profile of vascular endothelial growth factor (*VEGF*) in the liver tissue. The rats were divided into 2 groups as control and the experimental diabetes group. In experimental diabetes group, a single dose of streptozotocin (STZ), dissolved in 0.01 M citrate buffer (pH: 4.5), at dose of 50 mg/kg/bw was given to the rats via intra-abdominal administration. A single dose of 0.01 M citrate buffer which is the vehicle for STZ was intra-abdominally applied to the rats in control group. 72 hours after STZ treatment, blood samples were collected from the tail vein, and the blood sugar levels were measured. Rats with fasting blood sugar levels above 350 mg / dL were considered to be diabetic. The rats were decapitated 21 days after STZ treatment. The liver tissues were collected, and the gene expression profile of *VEGF* in the liver was measured using real-time PCR. In conclusion, no significant difference in *VEGF* gene expression of the liver was found between diabetic and control rats.

Key words: Rat, Diabetes, Streptozotocin, *VEGF*

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Karaciğer	3
2.2. <i>Diabetes Mellitus</i>	5
2.2.1. Diyabetin Tipleri	7
2.2.1.1. Tip 1 <i>Diabetes Mellitus</i>	8
2.2.1.2. Tip 2 <i>Diabetes Mellitus</i>	10
2.2.1.3. Gestasyonel <i>Diabetes Mellitus</i>	11
2.2.1.4. Gençlerin Erişkin Tip Diyabeti	13
2.2.2. <i>Diabetes Mellitus</i> 'un Komplikasyonları	14
2.2.2.1. Diyabetin Akut Komplikasyonları	16
2.2.2.2. Diyabetin Kronik Komplikasyonları.....	17
2.2.2.2.1. Kardiyovasküler Hastalıklar.....	17
2.2.2.2.2. Serebrovasküler Hastalıklar	18
2.2.2.2.3. Retinopati	18
2.2.2.2.4. Nefropati	18
2.2.2.2.5. Gastrointestinal Komplikasyonlar.....	19
2.2.2.2.6. Seksüel Disfonksiyon.....	19
2.2.2.2.7. Diyabetik Ayak	19
2.3. <i>VEGF</i>	20
2.4. <i>VEGF</i> ve Diyabet	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	30
3.2. Kullanılan Kimyasallar	30
3.3. Sıçanların Temini ve Bakımı	30
3.4. Grupların Oluşturulması	31
3.5. Dokuların Alınması.....	31
3.6. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar	32
3.6.1. Streptozotosin Hazırlanması	32
3.6.2. RNA Saklama Solüsyonu.....	32
3.6.3. RNA Denatüre Solüsyonu (RLT Çözeltisi)	32
3.6.4. 5X TBE Çözeltisinin Hazırlanması.....	32
3.7. Total RNA Saflaştırması (Qiagen Kit Protokolü).....	33
3.8. RNA'nın Agaroz Jele Yükleme İşlemleri	34
3.9. cDNA Sentez Protokolü	34
3.10. Gerçek Zamanlı PZR Protokolü.....	34
3.11. İstatistiksel Analizler.....	35
4. BULGULAR	36
4.1. Hayvanların Açlık Kan Şekeri Değerleri	36
4.2. Hayvanların Ağırlık Değerleri	37
4.3. Moleküler Genetik Bulgular	38
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR	49
EKLER.....	61
Ek 1: Deney Hayvanları Etik Kurulu Kararı.....	61
Ek 2: Deney Hayvanları Etik Kurulu Kararı.....	62
ÖZGEÇMİŞ	63

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

STZ	:	Streptozotosin
DM	:	Diabetes Mellitus
VEGF	:	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü
IDDM	:	İnsülin Bağımlı Diabetes Mellitus
GDM	:	Gestasyonel Diabetes Mellitus
MODY	:	Gençlerin Erişkin Tıp Diyabeti
MHC	:	Büyük Doku Uygunluk Kompleksi
HLA	:	İnsan Lökosit Antijeni
VNTR	:	Değişken Sayıda Ardışık Tekrar Eden Dizinler
CTLA-4	:	Antijen 4 İle İlişkili Sitotoksik T Lenfosit
PPARG	:	Peroksizom Proliferatör-Aktive Edici Reseptör Gama
KCNJ11	:	Potasyum İçeri Doğrultucu Kanalı, J Alt Ailesi, Üye 11
TCF7L2	:	Transkripsiyon Faktörü 7 Benzeri 2
CDKAL1	:	CDK5 Düzenleyici Altbirimle İlişkili Protein Benzeri 1
CDK5	:	Siklin-Bağımlı Kinaz 5
CDKN2A/B	:	Siklin-Bağımlı Kinaz İnhibitorü 2A ve 2B
IGF2BP2	:	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 2 mRNA Bağlayıcı Protein 2
SLC30A8	:	Solut Taşıyıcı Ailesi 30 (Çinko Taşıyıcı), Üye 8
HNF1B	:	Hepatosit Nüklear Faktör-1Beta
ADRA2A	:	Adrenerjik Alfa-2A Reseptörü
WFS1	:	Wolfram Syndrome 1
KCNQ1	:	Potasyum Voltaj Kapılı Kanalı, KQT-Benzeri Alt Ailesi, Üye 1
HNF4A	:	Hepatosit Nüklear Faktör-4 Alfa
HNF-1A	:	Hepatosit Nüklear Faktör-1 Alfa
IGF-2	:	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 2

IGF-1	:	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
GLUT 2	:	Glukoz Taşıyıcısı 2
GCK	:	Glukokinaz
ATP	:	Adenozin Trifosfat
NEUROD1	:	Nörojenik Farklılaşma Faktörü 1
NHANES	:	Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Taraması
PKC	:	Protein Kinaz C
PKC- β	:	Protein Kinaz C Beta
AGE	:	İleri Glikasyon Son Ürünleri
LDL	:	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
HDL	:	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
Nrp-1	:	Nöropilin-1
Nrp-2	:	Nöropilin-2
MAPK	:	Mitojen İle Aktive Protein Kinaz
IPF-1	:	İnsülin Promotör Faktörü-1
VEGFR-1	:	VEGF Reseptörü 1
VEGFR-2	:	VEGF Reseptörü 2
VEGFR-3	:	VEGF Reseptörü 3
VPF	:	Vasküler Permeabilite Faktörü
PIGF	:	Plasental Büyüme Faktörü
bFGF	:	Temel Fibroblast Büyüme Faktörü
HIF-1 α	:	Hipoksi İndüklenebilir Faktör-1 Alfa
VNTR	:	Değişken Sayıda Ardışık Tekrar Eden Dizinler
GAPDH	:	Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz
TGF- β	:	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
TGF- β 1	:	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta 1
NF- κ β	:	Nükleer Faktör Kappa Beta
FGF4	:	Fibroblast Büyüme Faktörü 4
TSP-1	:	Trombospondin 1
Rbl-2	:	Retinoblastoma Benzeri 2
SOD 2	:	Süperoksit Dismutaz 2
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri

ort	:	Ortalama
ss	:	Standart Sapma
EDTA	:	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
TBE	:	Tris Borat EDTA
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
cDNA	:	Komplementer DNA
RNA	:	Ribonükleik Asit
mRNA	:	Mesajcı RNA
DEPC	:	Dietilpirokarbonat
dNTP	:	Deoksiribonükleotid Trifosfat
HCl	:	Hidroklorik Asit
DTT	:	Dithiothreitol
NO	:	Nitrik Oksit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1.	Karaciğerin kan dolaşımı	3
Şekil 2. 2.	Pankreas ve Langerhans adacıkları	6
Şekil 2. 3.	Diyabetli insanlarda, diyabete bağlı komplikasyonların prevalansı ..	15
Şekil 2. 4.	VEGF'nin Üç Boyutlu Yapısı	21
Şekil 2. 5.	<i>VEGF</i> Gen Ailesi Üyeleri ve Reseptörleri	24
Şekil 4. 1.	Kontrol ve diyabet grubu açlık kan şekerleri değeri.....	36
Şekil 4. 2.	Kontrol ve diyabet grubu sıçanların ağırlıkları.....	37
Şekil 4. 3.	QIAGEN RNAsasy saflaştırma kiti ile karaciğer örneklerinden saflaştırılan toplam RNA örnekleri	38
Şekil 4. 4.	<i>VEGF</i> gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR analizleri.....	39
Şekil 4. 5.	<i>GAPDH</i> ve <i>VEGF</i> 'lerin cDNA'larının PZR deki çoğaltımının agaroz jel elektroforezi	40
Şekil 4. 6.	Gruplardaki karaciğer <i>VEGF/GAPDH</i> mRNA seviyelerinin oranı... 41	

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 4. 1. Graplarda ölçülen açlık kan şeker değerleri (mg/dl).....	36
Tablo 4. 2. Graplarda ölçülen sıçanların ağırlık değerleri (gr).....	37
Tablo 4. 3. Graplarda ölçülen karaciğer <i>VEGF/GAPDH</i> mRNA seviyelerinin oranı	40

1. GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM), pankreasın insülin salgılamasında yetersizlik ve/veya dokuların insüline cevabının bozulmasıyla oluşan, protein, yağ ve karbonhidrat metabolizmasını etkileyen, böbrek ve sinir komplikasyonlarına neden olan ve kardiyovasküler hastalık riskini arttıran yüksek glukoz düzeyi ile karakterize metabolik bir hastalıktır (1-3). DM'nin farklı tipleri olmakla birlikte diyabet vakalarının çok büyük bir kısmını tip 1 ve tip 2 diyabet oluşturmaktadır. Tip 1 DM, pankreas beta hücrelerinin otoimmün yıkımı ve insülin yetmezliği sonucu gelişen ve insülin tedavisine gereksinim gösteren diyabet tipidir. Tip 2 DM, yaş, obezite ve genetik yatkınlık ile ilişkilidir. Bu tip hastalar için genellikle insülin tedavisi gerekmemektedir (4).

Deneysel hayvan çalışmalarında insanlardakine benzer diyabet oluşturmak için kullanılan N-nitroso türevi D-glukozamin yapısındaki streptozotosin (STZ), oksidatif stres meydana getirerek langerhans adacıklarını seçici olarak tahrip etmekte ve böylece diyabeti başlattığı düşünülmektedir (5).

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), endotelial hücreler için güçlü bir mitojen ve temel anjiyogenik faktör olarak karşımıza çıkar (6). Diyabetin uzun dönemli komplikasyonlarından çoğu bozulmuş anjiyogenezle ilişkili olan vasküler bozukluk ile karakterizedir (7). Anjiyogenez varolan kan damarlarından yeni kan damarı oluşumudur (8). VEGF, heparin bağlı bir glikoproteindir. Makrofajlar tarafından üretilmekle birlikte, fibroblast, endotelial ve epidermal hücreler tarafından da sentezlenmektedir. Spesifik reseptörlerine bağlanarak etki gösterir. VEGF; endotelial hücrelerin mikrovasküler tüp formasyonunu, migrasyonunu ve proliferasyonunu uyararak, güçlü anjiyogenik etki gösterir. (9). VEGF, yetişkinlerde yara iyileşmesi ve menstrüel siklus gibi normal anjiyogenik süreçlere katılır (10). Karaciğer hücrelerinin rejenerasyonunda *VEGF* ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (11).

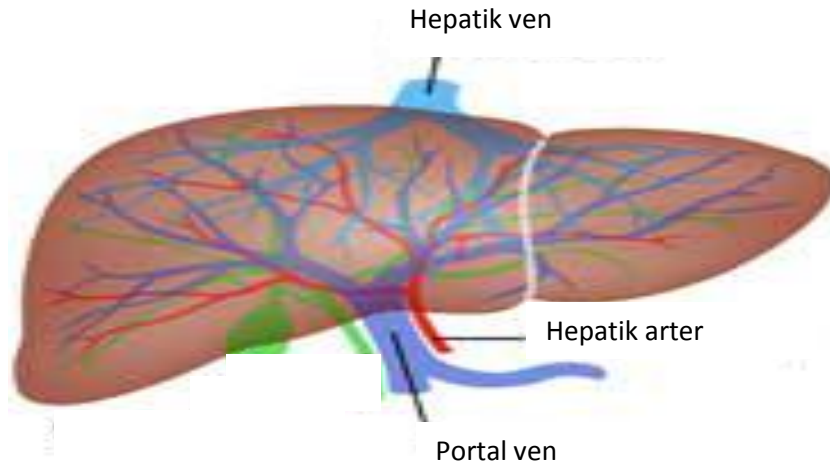
Diyabet, kronik metabolik bir bozukluk olduğu gibi aynı zamanda da artmış bir oksidatif stres durumudur. Önemli bir sağlık sorunu olan diyabet, uzun süreli komplikasyonlarıyla kişinin yaşam kalitesini düşürmektedir. Bu tezde, STZ ile

deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanların karaciğer dokusunda, diyabetin *VEGF* gen ifadesine olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer

Karaciğer anatomik olarak dört loba ayrılır: Sağ hepatic lob, sol hepatic lob, kaudat lob ve kuadrat lob. Damarlanmasına göre, karaciğer sağ ve sol olmak üzere iki ana lobdan oluşur. Karaciğer segmental yapıdadır ve her segment kendini besleyen damarlara sahiptir. Karaciğerin damarları karaciğere oksijen getiren proper hepatic arter, karaciğerin fonksiyonel damarı olan hepatic portal ven ve karaciğerin venöz drenajını sağlayan hepatic venlerdir (Şekil 2. 1) (12).



Şekil 2. 1. Karaciğerin kan dolaşımı (13).

Karaciğere gelen toplam kanın %25'i hepatic arterden %75'i ise portal venden sağlanır. Hepatic arterdeki kan oksijen bakımından zengindir. Proper hepatic arterden karaciğere gelen dallar, karaciğer lobulleri (lobuli hepatis) arasındaki boşluklara ilerleyerek interlobuler arterleri meydana getirirler. Sonra karaciğer loblarını oluşturan epitelyum hücrelerinden (hepatositlerden) yapılmış kolonların arasındaki kapiller venlerle birleşirler. Hepatic portal ven, karın boşluğu içindeki tüm sindirim sistemi organları ile dalak ve pankreasın ven kanını toplar. Bu ven porta hepatis'ten karaciğere girer ve dallara ayrılır. Hepatic venler, hepatic loblar arasındaki açıklıklara kadar ilerleyip interlobüler venleri oluştururlar. Bu interlobüler venler, hepatic lobulleri oluşturan hepatositlerden yapılmış kolonlar arasında ven

sinüzoidlerini oluştururlar. Böylece, kan ve karaciğer hücreleri arasındaki ilişki kurulmuş olur. Bu ven kapillerine proper hepatik arterden gelen kanda karışır. Böylece proper hepatik arter ile hepatik venden gelen kan hepatik lobüllerin merkezindeki santral venlerde toplanır. Bu santral venlerden de daha sonra daha büyük çaplı venler oluşur. Bu venlere ise hepatik venler denir. Hepatik venler daha sonra sağ, sol ve orta hepatik venler adını alırlar. En sonunda vena kava inferior'a dökülürler (12).

Karaciğer, kan glukoz homeostazisinde önemli rol oynar. Glikojenez (glukozdan glikojen sentezi) yoluyla glukozun depolanması ve alımı arasındaki dengeyi sağlar. Açlık sırasında, karaciğer hem glikojenoliz yoluyla glikojeni parçalayarak glukoz üretilmesini hem de glukoneogenez yoluyla laktat, pirüvat, gliserol ve alanin gibi öncü moleküllerden glukozun yeniden sentezlenmesini sağlar. Bu enzimleri kodlayan genler, glukagon, insülin ve glukokortikoidler gibi çeşitli hormonların etkileşimiyle transkripsiyonel seviyede sıkı bir şekilde kontrol edilir (14). Yemek sonrası bağırsak tarafından emilen glukoz karaciğer toplardamarı ile karaciğere taşınır. İnsülin, karaciğer hücreleri tarafından glukozun alınmasını ve kullanılmasını kolaylaştırır. İnsülin karaciğerde glikojen sentezini (glikojenez) uyarır, fakat glikojen yıkımını (glikojenoliz) inhibe eder (15).

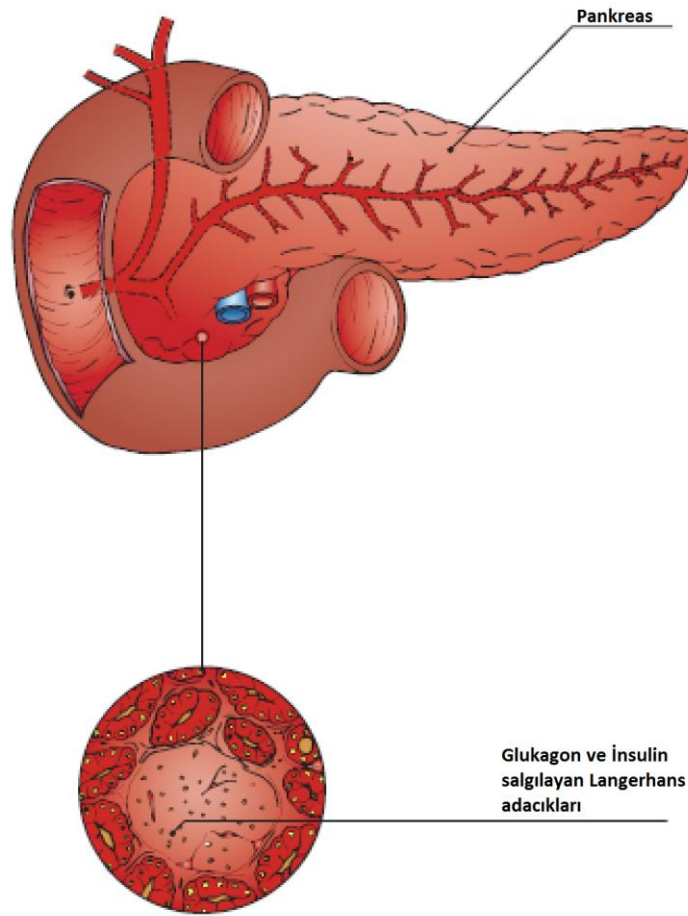
Akut hiperglisemi normalde hepatik glukoz üretimini ve glukoneogenik gen ifadesini baskılar. Tersine, kronik hiperglisemi bazal hepatik glukoz üretimini artırır ve bu durum hem tip 1 hem de tip 2 diyabetteki yüksek kan glukoz seviyesine katkıda bulunur (14). Tip 2 diyabette aşırı hepatik glukoz çıkışı açlık kan glukoz seviyesinin yükselmesine katkıda bulunur (15).

DM'den kaynaklanan glukoz regülasyonundaki dengesizlik kronik doku hasarı ve organ yetmezliği ile sonuçlanır (16). Diyabet ve glukoz homeostazindeki anormallikler, karaciğerde fazla glikojen birikimi, safra kesesi hastalığı, siroz ve alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı gibi çeşitli diyabetik karaciğer hastalıklarına neden olur (15). Yüksek kan glukoz düzeyi serbest radikallerin oluşmasına neden olur (17). Diyabetin neden olduğu bu oksidatif stres endotelial hücrelerde *VEGF* ifadesini uyarır. *VEGF*, endotelial hücrelerin oksidatif stresten korunmasında rol oynar (18).

2.2. Diabetes Mellitus

Eski Mısır'da çağın hastalığı olarak bilinen diyabete ilk olarak milattan önce (M.Ö.) 1500 yılında yazılmış olan Ebers papirusunda rastlanmıştır. Papiruslarda diyabet 'poliüri' olarak tanımlanmaktadır. Hint literatüründe diyabetle ilgili olarak tatlı idrar yapma, susama, kas güçsüzlüğü ve hoş olmayan bir kokudan bahsedilmektedir (19). Hint hekimleri diyabet hastalarının idrarlarına karınca ve sineklerin üşüştüğünü görerek bu hastaların idrarlarının tatlı oluşundan şüphelenmişler ve tatlı idrar anlamına gelen 'madhumeh' adını vermişlerdir. *Diabetes insipidus*'a ise su gibi idrar çıkaran ve idrarları tatsız olan 'udakmeh' adını vermişlerdir. Milattan iki yüzyıl önce Çin'de, Tehang Tehong King diyabeti 'susuzluk hastalığı' olarak tarif etmiştir (20). Milattan sonra (M.S.) 135 yılında Cappodocia'lı Araetus hastalığa 'diyabet' ismini vermiş ve hastalığın klinik tablosunu tam anlamıyla çizmiştir, fakat idrarın tadı üzerinde durmamıştır. M.S. 9. yy'da Razi ve M.S. 10-11. yy'da İslam hekimi İbn-i Sina diyabet hastalarının idrarın tatlı olduğundan ve susuzluk hissinden bahsetmiştir (20). 17. yy'da Thomas Willis, *Diabetes insipidus* ile *Diabetes mellitus*'un ayırımını ortaya koyan çalışmalar yapmıştır. 1788'de Thomas Cawley ve Richard Bright pankreastaki değişikliklerin diyabete neden olabildiğini fark etmişlerdir (19). Diyabetik komada idrarda aseton bulunduğunu ilk kez Lerch tanımlamıştır (20). 1869 yılında Paul Langerhans, kendi adını verdiği Langerhans adacıklarını keşfetmiştir. 1889'da Mering ve Minkowski diyabetin patogenezinde pankreasın rolünü ortaya koymuşlardır (21). 1916 yılında Sir Edward Sharpey-Schafer pankreasın salgısına 'insülin' adını önermiştir. 1921 yılına gelindiğinde Langerhans adacıklarından saf insülin hormonunun izole edilmesi gerçekleştirilmiştir (Şekil 2. 2) (19).

İnsülinin keşfi, diyabetin tedavisinde çığır açmıştır. İnsülinin tedaviye girmesiyle diyabetin akut metabolik komplikasyonlarından ölüm sayısı oldukça azalmıştır. 1926 yılında Frank bugünkü oral antidiyabetiklerin atası Synthalin'i bulmuştur. 1946-1950 yıllarında çeşitli uzun etkili insülinler bulunmuştur. 1973'te Nova ve Leo firmaları antikor oluşturmamayan ileri derecede saf insülini geliştirmişler. Bu, günümüzde kullanılan DNA teknolojisiyle yapılmış olan insülinlere öncülük etmiştir (22).



Şekil 2. 2. Pankreas ve Langerhans adacıkları (23).

Diyabetli kişilerde ölümün temel nedenleri arasında, koroner arter hastalığı ve serebrovasküler hastalıklar gelmektedir. Hindistan’da yapılan retrospektif bir araştırmaya göre şeker hastalığı olan kişilerde ölümün başlıca nedenleri arasında başta enfeksiyonlar (% 40,9) ve kronik böbrek yetmezliği (% 33,6) olmak üzere, koroner arter hastalığı (% 16,9), serebrovasküler hastalıklar (% 13,2), kronik obstrüktif akciğer hastalığı (% 6,9), akut böbrek yetmezliği (% 6,2), malignite (% 4,2), hipoglisemi (% 3,5) ve diyabetik ketoasidoz (% 3,4) gelmektedir. Diğer önemli ölüm nedenleri arasında akut kronik solunum yolu hastalıkları (% 6,9), böbrek yetmezliği (% 6,2), malignite (% 4,2), diğer kardiyak bozukluklar (% 3,2), karaciğer hastalığı (% 2,7), gastrointestinal kanama (% 2,4), erişkin respiratuar distress sendromu (% 1,5) ve pulmoner tromboemboli (% 1,5) gelmektedir (24).

2000 yılında dünya da 20 yaş ve üzerindeki diyabet vakalarının sayısının yaklaşık 171 milyon olduğu ve bu sayının eskiye göre % 11 oranında arttığı ve tüm yaş grupları için diyabet prevalansı % 2,8 iken 2030 yılında % 4,4 olacağı tahmin edilmektedir (25). Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) tahminlerine göre 2025 yılına kadar diyabetik insan sayısının 300 milyona ulaşacağı öngörülmektedir (26).

Ülkemizde yapılan Türkiye Diyabet Epidemiyolojisi çalışmasında diyabet prevalansı % 7,2, bozulmuş glukoz toleransı prevalansı ise % 6,7 olarak saptanmıştır (26). DSÖ tanı kriterleri kullanılarak yapılan araştırmalara göre Türkiye'deki diyabet prevalansının, Malta, Tunus ve İspanya'ya göre daha yüksek olduğu, Mısır, Umman, Sudan ve Bahreyn'den daha düşük olduğu, Orta Asya Türk toplumu ile benzer olduğu ortaya konmuştur (26).

2.2.1. Diyabetin Tipleri

DM'nin çeşitli farklı tipleri vardır ve bütün tipleri farklı patogenetik mekanizmalarla ortaya çıkan hiperglisemi ile karakterizedir. DM'nin bazı formları mutlak insülin yetersizliği veya insülin salgılanmasında kusura yol açan genetik bir kusur ile karakterizedir. Diğer formlarında ise insülin direnci söz konusudur. Sınıflamadaki yeni değişiklikler, hastalığın başlangıç yaşını veya tedavi şeklini temel almakta ve DM'yi hiperglisemiye yol açan patogenetik süreç temelinde sınıflamaya çalışmaktadır. DM, tip 1 ve tip 2 diyabet olarak adlandırılan iki büyük sınıfa ayrılır. Tip 1 DM, genellikle insülin yetersizliğine yol açan otoimmün beta hücre yıkımı sonucu gelişir. Tip 2 DM, değişik derecelerde insülin direnci, bozulmuş insülin sekresyonu ve glukoz üretiminde artış ile karakterize heterojen bir hastalıktır. Tip 1 DM en sık olarak 30 yaşın altında görülmekle birlikte, otoimmün beta hücre yıkımı her yaşta gelişebilir. Tip 2 DM daha çok tipik olarak artan yaş ile ortaya çıkmakla birlikte, özellikle obez yetişkinlerde olmak üzere çocuklarda da ortaya çıkabilmektedir. DM'nin diğer etyolojileri insülin sekresyonundaki veya etkisindeki genetik kusurları, insülin sekresyonunu bozan metabolik anormallikleri ve glukoz toleransını bozan durumları içerir. Gençlerin erişkin tip diyabeti (MODY) otozomal dominant kalıtım, erken başlayan hiperglisemi ve insülin sekresyonunda bozulma ile karakterize olan bir diyabet alt tipidir. Hastalığın başlangıcı tipik olarak 10-25 yaşları

arasındadır. MODY'nin beş değişik varyantı saptanmıştır ve hepsi otozomal dominant kalıtılmaktadır. DM, pankreas adacıklarının çoğunluğunun (> % 80) yıkılması halinde ekzokrin pankreas hastalığı olarak da ortaya çıkabilir. İnsülin etkisini antagonize eden hormonların aşırı sekresyonu sonucu değişik endokrinopatiler de diyabete neden olabilirler. Gestasyonel *Diabetes Mellitus* (GDM) ilk olarak gebelik sırasında fark edilebilir. Gebeliğin ileri dönemlerindeki metabolik değişikliklerle ilişkili olan insülin direnci, insülin ihtiyacını artırır ve hiperglisemi veya bozulmuş glukoz toleransına yol açar. Postpartum dönemde çoğu normal glukoz toleransına döner, ancak hayatın ilerleyen dönemlerinde DM gelişme riski yüksektir (27).

2.2.1.1. Tip 1 *Diabetes Mellitus*

İnsülin bağımlı DM (IDDM) veya genç tipi (juvenil) diyabeti olarak da bilinen ve tüm diyabet vakalarının % 5-10'unu oluşturan tip 1 DM, sağlık sistemine büyük bir yük getiren ve çeşitli komplikasyonlarla kişinin yaşam kalitesini düşüren kronik bir hastalıktır (28).

Tip 1 diyabet, çevresel genetik ve immunolojik faktörlerin etkileşimi sonucu pankreas langerhans adacıklarının insülin salgılayan beta hücrelerinin T lenfositleri tarafından otoimmün harabiyeti ile başlayan ve bunu takiben gelişen inflamatuvar olaylar (insülitis) sonucu meydana gelen, kompleks ve multifaktöriyel otoimmün bir hastalıktır (29-31).

Tip 1 diyabette klinik başlangıç kronolojik yaşla doğrudan ilişkilidir. Tip 1 diyabet çocukluk çağında klinik olarak çok hızlı gelişen bir tablo ile başlarken; daha ileri yaşlarda, çok daha yavaş, hatta tip 2 diyabet gibi ortaya çıkabilir. Genetik olarak yatkın bireyler doğumda normal beta hücre kitlesine sahiptirler, fakat virüsler (Ensefalomyokardit virüsü, Rubella virüsü, Koksaki-B virüsü), toksinler (örneğin Streptozotosin, Alloksan, Vakor) ve bazı gıda maddeleri gibi çevresel faktörlerin beta hücrelerine karşı otoimmün aktivasyonu tetiklemesiyle beta hücrelerini zaman içinde kaybetmeye başlarlar. Diyabet bulguları beta hücrelerinin çoğunluğu haraboluncaya kadar ortaya çıkmaz. Beta hücre kitlesindeki azalma hızı kişiden kişiye büyük farklılık gösterir. Bazı hastalar hızla klinik diyabete ilerlerken,

bazılarında DM daha yavaş gelişir. Diyabete geçişi tetikleyen olaylar glukoz intoleransından ziyade, sıklıkla insülin ihtiyacını arttıran durumlar ile ilişkilidir. Tip 1 DM’de erken klinik dönemi takiben bazı hastalarda, ekzojen insülin gereksiniminin azaldığı ve kan şekeri düzeyinin daha düşük insülin dozları ile düzenlenebildiği veya nadiren hastanın endojen insülini ile kan şekeri regülasyonunu sağladığı ve insülin tedavisi gerekmeyen bir dönem ortaya çıkabilir (remisyon dönemi). Bu dönem, otoimmün yıkımın ardından arta kalan sağlam hücrelerin rejenerasyonu sonucu çoğalarak endojen insülin salgısını artırması ile karakterizedir. Bununla birlikte, otoimmün süreç endojen insülin sentezinin yapıldığı rezidü beta hücrelerini de harabettiği zaman, bu geçici dönem kaybolur ve hastada tam bir insülin yetersizliği ortaya çıkar. Endojen insülin rezervi tamamen tükenmiş hastalar sık tekrarlayan hiperglisemi ve /veya hipoglisemi atağı geçirirler (31).

Tip 1 DM’li bir bireyin birinci derece akrabalarında diyabet gelişme riskinin 15–20 kat daha yüksek olduğu bildirilmektedir (32). Bununla birlikte tek yumurta ikizlerinde diyabet gelişme riskinin % 30–50 olduğu, buna karşın çift yumurta ikizlerinde bu riskin % 6–10, ikiz olmayan kardeşlerde ise bu riskin % 6 olduğu bildirilmiştir (32).

Anne tip 1 diyabetik ise çocuklarında diyabet görülme riskinin % 2-3 olduğu, baba diyabetik ise çocukta diyabet görülme riskinin % 7 olduğu bildirilmektedir (33).

Tip 1 DM için majör yakınlık geni 6. kromozomun kısa kolu üzerindeki MHC (Büyük Doku Uygunluk Kompleksi) lokusunun *HLA* (İnsan Lökosit Antijeni) bölgesinde ve 11. kromozom üzerindeki insülin geninin 5’ ucundaki VNTR (Değişken Sayıda Ardışık Tekrar Eden Dizinler) bölgesinde lokalizedir (29, 34-36).

Tip 1 DM gelişmesinde birbirleriyle etkileşen multipl genler rol oynar. 6. kromozom üzerindeki sınıf II *HLA* antijenleri (özellikle *DR* ve *DQ*) ile tip 1 DM arasında yakın ilişki vardır. Bununla birlikte birçok çalışmada 2. kromozomun uzun kolu üzerinde bulunan ‘antijen 4 ile ilişkili sitotoksik T lenfosit’ (*CTLA-4*) genindeki polimorfizmlerin tip 1 DM’ye genetik yakınlıkla ilişkili olduğu gösterilmektedir. *CTLA-4* geninin aktivasyonunu etkileyen mutasyonlar ve polimorfizmler otoimmünite gelişiminde önemli rol oynamaktadır. *CTLA-4*’ün 17. kodonunda alaninin varlığı otoimmün troid hastalığı ve tip 1 DM’ye yakınlık ile ilişkilidir. Bununla birlikte, Grave hastalığı, Çölyak hastalığı, Addison hastalığı ve

Hashimoto hastalığı gibi birçok otoimmün hastalık *CTLA-4* genindeki polimorfizmler ile ilişkilidir (29).

2.2.1.2. Tip 2 *Diabetes Mellitus*

Tip 2 DM, aşırı beslenme, hareketsizlik, obezite ve insülin direncine bir cevap olarak beta hücrelerinin yeterli insülin salgılayamamasından kaynaklanan değişmiş lipid metabolizması ve hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır (37).

Tip 2 DM dört major metabolik bozukluk ile karakterizedir; obezite, insülin sekresyonunda bozulma, periferik insülin direnci ve aşırı endojenik glukoz üretimi. İnsülin eksikliği ve insülin direncinin varlığı periferik dokularda özellikle çizgili kas ve yağ dokusunda insülin duyarlılığını bozarak glukoz kullanımını azaltır (38).

Karaciğerde ise insülin duyarlılığının azalması endojenik glukoz üretimini artırır. İnsülin direncine, hücre içi sinyal aracı moleküllerin, insülin reseptörlerinin ve insülin regülasyonunu sağlayan genlerin herhangi birindeki yapısal ve fonksiyonel değişiklikler neden olabilir. İnsülin direnci birçok klinik sendromun etiolojisinde rol oynar; adipositler tarafından salgılanan adiponektin ve diğer sitokinlerde bozukluklara, obeziteye (özellikle visseral; iç organ yağlanması), hiperinsülinemi ile eşlik eden hiperglisemiye, dislipidemiye, arteriyel hipertansiyona (özellikle obezite ile ilişkili), endotel hücre fonksiyonlarında aterojenik bozukluklara, mikroalbuminüriye, polikistik over sendromuna, C-reaktif protein ve inflamasyon belirteçlerinin artışına yol açar (38).

Obezite, tip 2 diyabet gelişiminde önemli bir risk faktörüdür. Obezite ile ilişkili insülin direncinin tip 2 diyabet riskini arttırdığı düşünülmektedir (39).

Tip 2 DM, genetik ve çevresel etkiler sonucu gelişen heterojenik ve poligenik bir hastalıktır. Tip 2 DM, makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlar ile morbidite ve mortalitenin en belirgin nedenidir. Yüksek riskli popülasyonlarda yapılan prospektif çalışmalar glukoz toleransının bozulmasından önce, insülin direnci ve/veya insülin sekresyon kusurlarının oluştuğunu göstermektedir. İnsülin, diğer hormonlar gibi, spesifik hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak, glukoz transportu, glikojen ve lipid sentezi ve gen ifadesindeki değişikliklere neden olan bir seri hücre

içi reaksiyonlar zincirini başlatarak etki gösterir. Glukoz toksisitesi ile beta hücre desensitizasyonunun uyarılması ve artan apoptozis veya azalan regenerasyon, uzun süreli insülin direnci, lipid toksisitesi, amiloid birikimi gibi beta hücre kütlelerini azaltabilen durumlar tip 2 diyabetli hastalarda beta hücre disfonksiyonunun önemli nedenlerindedir (40).

Tip 2 diyabet, genler ve çevre arasındaki etkileşimin bir sonucu olarak ortaya çıkan ve hiperglisemiye yol açan insülin etkisi ve insülin sekresyonundaki kusurlar ile karakterize pleomorfik ve karmaşık metabolik bir hastalıktır. Bugüne kadar tip 2 diyabete yatkınlıkla ilişkili birçok gen belirlenmiştir; *PPARG* (Peroksizom proliferatör-aktive edici reseptör gama), *KCNJ11* (Potasyum içeri doğrultucu kanalı, J alt ailesi, üye 11), *TCF7L2* (Transkripsiyon faktörü 7 benzeri 2), *CDKAL1* (siklin-bağımlı kinaz 5 (*CDK5*) düzenleyici altbirimle ilişkili protein benzeri 1), *CDKN2A/B* (*CDK* inhibitörü 2A ve 2B), *IGF2BP2* (insülin benzeri büyüme faktörü 2 mRNA bağlayıcı protein 2), *FTO* (yağ kütlesi ve obezite ile ilişkili gen), *SLC30A8* (Solut taşıyıcı ailesi 30 (çinko taşıyıcı), üye 8), *HNF1B* (Hepatosit nükleer faktör-1β), *ADRA2A* (Adrenerjik alfa-2A reseptörü), *WFS1* (Wolfram sendromu 1), *KCNQ1* (Potasyum voltaj kapılı kanalı, *KQT*-benzeri alt ailesi, üye 1) ve daha birçok gen mevcuttur (41). Tip 2 diyabete yatkınlıkla ilişkili şu anda 40'in üzerinde gen vardır. Bu genlerin her biri diyabetin patogenezinin anlaşılmasında önemli bir yere sahiptir (42).

2.2.1.3. Gestasyonel *Diabetes Mellitus*

GDM, ilk olarak gebelik sırasında farkına varılan ya da gebelikte başlayan, glukoz intoleransı ve hiperglisemi ile karakterize heterojen bir hastalıktır (43, 44).

Amerika Birleşik Devletlerinde GDM, hamileliklerin yaklaşık % 5-9'unda görülür; doğumu takiben hastaların birçoğu normal glukoz toleransına döner, ancak birçok kadında da doğumdan sonraki 5-10 yıl içinde tip 2 DM gelişme riski yüksektir (45).

Genellikle GDM'li hastaların pankreas beta hücre fonksiyonunda bir defekt vardır. Hastaların % 10'undan daha azında, tip 1 diyabette olduğu gibi pankreas beta hücrelerinin otoimmün yıkımı ya da bazı MODY alt tiplerinde olduğu gibi tek gen

mutasyonları, beta hücre fonksiyonu defektine neden olabilir. Glukozüri, gebelik yaşı (> 30 yaş), obezite, glukoz intoleransı, makrozomik çocuk ve ailede diyabet öyküsü GDM için risk faktörü oluşturur. GDM'nin varlığı hem anneyi hem de bebeği etkileyen bir durumdur (46).

Diyabetin maternal kalıtımına rahim içi beslenme durumu, paylaşılan çevresel faktörler (annenin beslenme alışkanlıkları, fiziksel aktivitesi ve yaşam tarzı gibi) ve genetik faktörler (anneden kalıtılan mitokondriyal DNA mutasyonları ya da delesyonlar gibi) katkı sağlar (47).

GDM hipertansif bozukluklar, erken doğum, omuz distosisi, ölü doğum, klinik neonatal hipoglisemi ve hiperbilirubinemi gibi perinatal komplikasyonlara ve doğum sonrası dönemde annede kardiyovasküler hastalıklar ve diyabet, çocukta obezite ve bozulmuş glukoz toleransı gibi doğum sonrası komplikasyonlara yol açabilir. GDM olan kadınlarda gebelik sırasında hipertansiyon, kronik hipertansiyon, pre-eklampsi ve eklampsi gibi hipertansif bozuklukların insidansında bir artış vardır. GDM ve hipertansif bozukluklar, insülin direnci ve inflamasyon gibi faktörler ile ilişkilidir (48).

GDM öyküsü olan kadınlarda endotel ve kardiyak fonksiyonlarda bozulmalar meydana gelir. Postpartum dönemde diyastolik disfonksiyon ve karotis intimal medial kalınlığı arttığı, brakial arter akım aracılı dilatasyon azaldığı ortaya çıkmıştır. Benzer şekilde, GDM öyküsü olan kadınların, vasküler adezyon molekülü-1 ve E-selektin gibi endotelial fonksiyon göstergelerinin ve plazminojen aktivatör inhibitör-1, fibrinojen ve C-reaktif proteinini içeren inflamatuvar göstergelerin GDM öyküsü olmayanlardan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (49).

GDM ile gebelik kilo alımı arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmada, fazla kilo alımının düşük doğum ağırlığı olasılığını azalttığı, fakat insülin ihtiyacı, makrozomi ve erken doğum olasılığını arttırdığı bildirilmiştir (50). Yine yapılan bir başka araştırmada, glukoz toleransı anormal olarak artmış kadınlarda aşırı kilo alımının sonuçlarının daha büyük bir risk olduğu ortaya konulmuştur (50).

GDM'ye yatkınlıkla ilişkili birçok aday gen tespit edilmiştir. Bu genler; glukokinaz (*GCK*), *HLA* antijenleri, insülin reseptörü, insülin benzeri büyüme faktörü 2 (*IGF-2*), insülin geni, plazminojen aktivatör inhibitör 1, *KCNJ11*, *HNF4A*

(Hepatosit nuklear faktör-4 alfa). Bu genlerindeki mutasyonların GDM riskini arttırdığı gösterilmiştir (51).

İnsülin reseptöründeki ve *IGF2*'deki varyasyonların GDM ile ilişkili olduğu ve *HNF4A*'nın P2 promotör bölgesindeki varyasyonların GDM'de gözlenen beta hücre disfonksiyonuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir (52).

2.2.1.4. Gençlerin Erişkin Tip Diyabeti

MODY, tip 2 DM'nin klinik ve genetik olarak heterojenik bir alt tipini kapsar. Hastalık otozomal dominant kalıtım gösterir ve pankreas beta hücrelerinin insülin salgılanmasında bir kusur ile karakterizedir. Hastalığın başlangıcı tipik olarak 25 yaş ve altında görülür (53).

MODY'nin kesin prevalansı bilinmemektedir. Ancak, tip 2 DM vakalarının % 2-5'den sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. MODY, nukleer transkripsiyon faktörleri ve GCK'yı kodlayan genlerdeki mutasyonlar sonucu meydana gelir. Bu da insülin hormonu üretimini sağlayan pankreatik beta hücre disfonksiyonuna neden olur. Dolaşımdaki glukoz beta hücrelerinin hücre zarında bulunan glukoz taşıyıcılar (GLUT 2) aracılığıyla alınır. Glukoz bir intraselüler enzim olan GCK tarafından Glukoz-6-fosfata dönüştürülür ve daha sonra Adenozin Trifosfat (ATP) üretmek için mitokondride glikolize uğrar. ATP'den gelen enerji kullanılarak, ATP bağımlı potasyum kanalları aracılığıyla hücre içi potasyum hücrelerden dışarı pompalanır. Membran potansiyelinde ortaya çıkan değişim beta hücrelerinin içine kalsiyum girişine yol açar. Bu da insülin salınımını uyarır. Beta hücrelerinin insülin sentezinde karaciğer nukleer faktörleri ve nukleer transkripsiyon faktörleri önemli rol oynar (54).

Bugüne kadar, MODY'den sorumlu altı gen olduğu tespit edilmiş ve bu genlerin mutasyonuna bağlı olarak MODY'nin altı değişik varyantı saptanmıştır; *HNF-4A* geni (MODY1), *GCK* geni (MODY2), *HNF-1A* geni (MODY3), insülin promotör faktör-1 (*IPF-1*) geni (MODY4), *HNF-1B* geni (MODY5) ve nörojenik farklılaşma faktör 1 (*NEUROD1*) geni (MODY6) (55, 56).

MODY2 dışında, MODY1, -3, -4, -5 ve -6, transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar ile ilişkilidir. GCK enzimini kodlayan gendeki

mutasyonlar MODY2'ye neden olur. MODY2 hastaları yaşam boyunca, genellikle hafif hiperglisemiktir ve nadiren tedavi gerektirir (57). GCK, beta hücrelerinde glukoz metabolizmasının ilk basamağından sorumlu enzimdir. *HNF-1A* ve *HNF-4A* transkripsiyon faktörleri ise beta hücrelerinin fonksiyonu ve farklılaşmasını içeren birçok genin ekspresyonunu düzenler. Diğer üç transkripsiyon faktöründeki mutasyonlar (*HNF-1B*, *IPF-1* ve *NEUROD1*) MODY'nin nadir görülen formlarıdır. Bu diyabet formları genellikle bir insülin sekresyon kusuru ile karakterizedir (58).

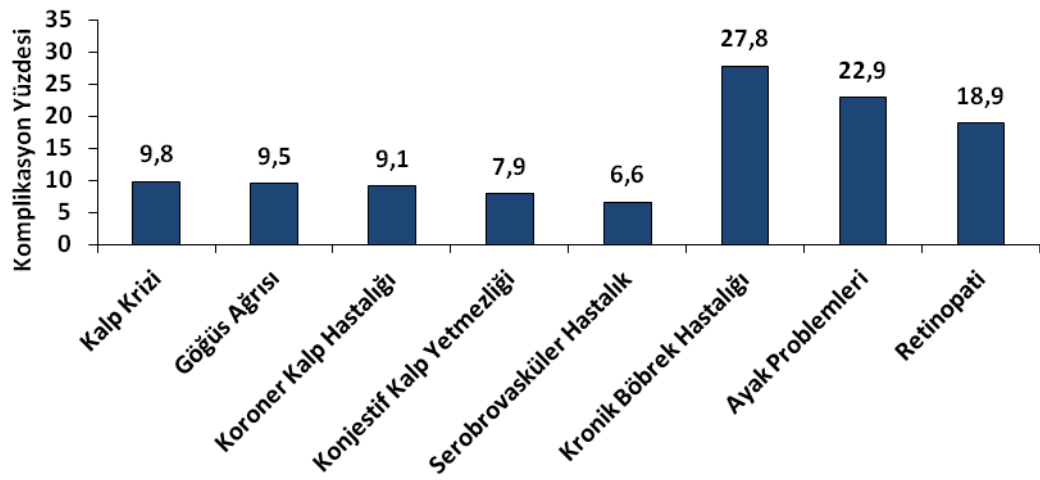
2.2.2. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları

Diyabet, vücudun birçok farklı organ sistemini etkileyebilir ve zamanla ciddi komplikasyonlara yol açabilir. Komplikasyonlar sinir sistemi hasarı, böbrek sistemi hasarı ve göz hasarını içeren mikrovasküler komplikasyonlar ve kardiyovasküler hastalıklar, serebrovasküler hastalık ve periferik damar hastalıklarını içeren makrovasküler komplikasyonlar olarak sınıflandırılabilir (59).

1999-2004 NHANES (Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Taraması) verileri mikrovasküler komplikasyonların görülme sıklığının makrovasküler komplikasyonların görülme sıklığından çok daha yüksek olduğunu göstermektedir (Şekil 2. 3). Yaş, diyabetik aile öyküsü, etnik köken, sigara, obezite, fiziksel hareketsizlik diyabet için artan risk faktörü oluşturur. Şeker hastalığı olan kişilerde tüm ölümlerin % 65'inden kardiyovasküler hastalıklar sorumludur. Buna ek olarak, kalp hastalığı nedeniyle ölüm oranları diyabetli insanlar arasında diyabeti olmayanlara kıyasla 2 ile 4 kat daha fazladır (59).

Şeker hastalığı olan kişilerde yaş, diyabetin süresi ve nöropatinin varlığı periferik damar hastalıkları riskini arttırır. Aynı şekilde, C-reaktif protein düzeyleri ve homosistein düzeyleri gibi kardiyovasküler hastalık ile ilişkili diğer faktörlerde, periferik damar hastalıkları riskini arttırır. Diyabetik retinopati, diyabetli insanlar arasında en sık görülen mikrovasküler komplikasyondur ve yılda onbinden fazla yeni vaka körlüğe neden olur. Buna ek olarak, retinopati, uzun süreli hiperglisemi ile de ilişkilidir. Diyabetli insanlar arasında yaş ile birlikte görme bozukluğu prevalansı da artış gösterir. Benzer şekilde, diyabetik periferik nöropati de, diyabetli bireylerin % 30-50'sini etkilediği tahmin edilen yaygın bir komplikasyondur. Başta hiperglisemi

olmak üzere, yaş, hastalık süresi, sigara, hipertansiyon, yüksek trigliserid, yüksek vücut kitle indeksi, alkol tüketimi, periferik nöropati için risk faktörü oluşturur. Diyabetik periferik nöropatili bireyler ayak ülseri ve alt ekstremitte kaybı (amputasyon) gibi bir dizi fonksiyonel kısıtlamalar ve bozukluklar ile yüksek risk altındadır. Diyabete bağlı nefropatinin 2002 yılında, son dönem böbrek hastalığı vakalarının % 44'ünü oluşturduğu bilinmektedir. Artan kan basıncı ve hipertansiyon, sigara, obezite, anemi ve genetik faktörler diyabetik böbrek hastalığı progresyonu riskini artırır (59).



Şekil 2. 3. Diyabetli insanlarda, diyabete bağlı komplikasyonların prevalansı (59).

DM kronik komplikasyonların dışında metabolizma ve kan şekeri düzeyindeki değişiklikler ile ilişkili olan hipoglisemi, diyabetik ketoasidoz ve nonketotik hiperglisemik koma gibi akut komplikasyonlara da yol açar (60).

Diyabetik komplikasyonların oluşumunda birtakım biyokimyasal değişiklikler ön plana çıkar; anormal sorbitol birikimi, miyoinozitol tükenmesi ve proteinlerin glikasyonu (60) ve protein kinaz C (PKC) aktivasyonu (61). Bu biyokimyasal değişiklikler doku ve organlarda patolojik durumların ortaya çıkmasına sebep olur (60).

Sorbitolun aşırı birikimi ATP ve glutatyonun hızla tükenmesine, hücre fonksiyonunun bozulmasına ve osmotik hasara neden olur. Hiperglisemi Na-K ATPaz pompasının ayrılmaz bir parçası olan miyoinozitolün tükenmesine de neden

olur. Miyoinozitolun tükenmesi sorbitol birikimi ile bağlantılıdır. Bir aldoz redüktaz inhibitörü olan sorbinilin kullanımı sorbitol birikimini azaltır ve miyoinositol düzeyini normale geri döndürür (60).

Artan kan glukoz konsantrasyonu hemoglobin, albümin, antitrombin III ve kollajen gibi birçok proteinin glikasyonuna neden olur. Kısa ömürlü proteinlerin glikasyonu reversible olmasına rağmen, uzun ömürlü proteinler ek reaksiyonlar geçirerek irreversible glikasyon ürünleri oluşabilir. Bu geri dönüşümsüz glukozile proteinler çapraz bağlar oluşturabilir (60). Makrofajlardaki ileri glikasyon son ürünleri (AGE) reseptörleri, bu kitlelere inflamatuvar bir cevap oluşturur. AGE-modifiye moleküller, oksidasyona daha duyarlıdırlar ve oksidatif hasarın nedenidirler. AGE yolağı ile diyabetik nefropati arasında güçlü bir ilişki olduğu varsayılmaktadır. İleri glikasyon, endotel disfonksiyon gibi nörotübüller ve diğer nöral proteinlerin disfonksiyonuna da neden olabilmektedir (61).

Diyabetik komplikasyonların oluşumunda diaçil-gliserol PKC yolağının da önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Artan hücre içi glukoz, PKC aktivatörü olarak da bilinen diaçil gliserolun de novo oluşumunu uyarır. PKC beta düzeyindeki artış anjiyogeneze neden olan *VEGF*'yi uyarır. Bu yol retinopati, albüminüri ve nöropati oluşumunda yakından ilişkilidir (61).

2.2.2.1. Diyabetin Akut Komplikasyonları

Diyabetik ketoasidozis; enfeksiyonlar, stres ve insülin yetersizliği sonucu gelişir. Ketoasidoz, tip 1 diyabetin ilk klinik bulgusu olabilir. Hastalığın fizyopatolojisinde ciddi insülin eksikliğine ve hiperglukagonemiye bağlı olarak iki büyük metabolik bozukluk vardır; hiperglisemi ve ketoasidemi. Diyabetik keto asidozun genellikle günler ve daha uzun süreli bir prodrom dönemi vardır. Bu dönemde çok idrar çıkarma, aşırı susuzluk, bulantı, kusma, mental bulanıklık ve en sonunda nörolojik koma görülebilir. Bununla birlikte, baş ağrısı, ağız kuruluğu, kas ağrıları ve karın ağrısı vardır. Hastanın fizik muayenesinde sıvı ve elektrolit kaybı, hızlı ve derin solunum, aseton kokusu, taşikardi, şiddetli ketonüri, ketonemi, düşük arteriyel pH ve düşük plazma bikarbonat düzeyi dikkat çeker (62).

Diyabetik nonketotik hiperosmolar koma; ciddi hiperglisemi, çok ağır sıvı ve elektrolit kaybı ve ileri derecede hiperosmolalite ile karakterizedir. Su kaybına bağlı olarak hiperozmolarite ve bunun sonucunda ağır hücre içi sıvı ve elektrolit kaybı gelişir. Bu hücre içi sıvı ve elektrolit kaybı santral sinir sistemini etkileyerek nörolojik semptomların ortaya çıkmasına ve komanın oluşumuna sebep olur. Hastalığa neden olan asıl nedenler renal yetmezlik ve kronik kalp yetmezliğidir (62).

Laktik asidozis; kanda laktik asidin artması ile karakterizedir. Hastalığın kliniğinde genellikle kas yorgunluğundan sonra beliren asidotik solunum mevcuttur. Bununla birlikte, şuur bulanıklığından komaya kadar uzanan şuur bozuklukları ve mental bulanıklıklar görülebilir (62).

Hipoglisemi; kan glukoz seviyesinin azalmasıdır ve genellikle insüline bağımlı olarak gelişir. Hastalığın kliniği genellikle ani başlar ve belirtiler çabuk ortaya çıkar. Hipoglisemik koma oluşmasında insülin dozunun fazla uygulanması, hastanın aşırı fizik egzersiz yapması, öğünün geciktirilmesi ve oral antidiyabetiklerin düzensiz alınması söz konusudur (62).

2.2.2.2. Diyabetin Kronik Komplikasyonları

2.2.2.2.1. Kardiyovasküler Hastalıklar

DM, kardiyovasküler hastalık için önemli bir risk faktörüdür. Kardiyovasküler hastalıklara bağlı ölüm oranı diyabetik olmayanlar ile kıyaslandığında diyabetik erkeklerde 2 kat, diyabetik kadınlarda ise 3,2 kat yüksek bulunmuştur (63). Diyabet, aterosklerozun doğal seyrini hızlandırır ve damar hastalığı, diffüz koroner ateroskleroz ve sol ana koroner arter tutulumunun daha fazla olması ile ilişkilidir. Diyabetiklerin hipertansiyon, hiperlipidemi, obezite ve insülin direnci gibi diğer kardiyovasküler risk faktörlerini de bulundurma bakımından dört kat daha fazla risk altında oldukları gösterilmiştir (63).

Kardiyomiyopati, diyabetin önemli bir komplikasyonudur ve sistemik hipertansiyon veya koroner arter hastalığının olmadığı durumlarda değişen kalp kası fonksiyonu ile karakterizedir. Bu durum, hipertansiyon aracılı hasara artan duyarlılık, kalp krizi sonrası artan ölüm oranı ve semptomatik kalp yetmezliğine varan önemli klinik sonuçlar ile ilişkilidir (64).

2.2.2.2.2. Serebrovasküler Hastalıklar

Serebrovasküler hastalıklar, non-diyabetiklere oranla diyabetik hastalarda daha yaygındır. Diyabetik hastalarda serobrovasküler hastalıklara bağlı mortalite iki kat yüksektir. Bu tür hastalıkların yüzde altmışı beyin trombozu (damar içinde oluşan kan pıhtısı) ve beyin krizinden kaynaklanır. Araştırmalar, aterosklerozun, diyabetik hastalarda non-diyabetik hastalardan daha sık Willis halkasındaki arterlerde gerçekleştiğini göstermiştir. Serebral dolaşım bozukluklarının DM'li orta yaşlı ve yaşlı hastalar için önemli bir sorun olduğuna inanılmaktadır (65).

2.2.2.2.3. Retinopati

Bugün dünyada körlüğün en önde gelen nedeni diyabettir. Tip 1 DM'li hastaların hemen hemen tümünde, tip 2 DM olan hastaların yaklaşık % 60'ında retinopati vardır. Retinopati patogenezi son yıllarda daha iyi anlaşılır hale gelmiştir. Retinal arter hasarı nedeniyle oluşan diyabetik göz hastalığı, yılda 24 000 yeni vaka ile 20-74 yaşları arasındaki yetişkinlerde körlüğün en önde gelen nedenidir. Mikroanevrizmalar ve diğer retinal lezyonları içeren nonproliferatif retinopati, optik sinir başı veya iç retina yüzeyinde anormal kan damarlarının ve fibröz doku büyümesini içeren proliferatif retinopati ve kan damarlarının sızıntı yapması sonucu gelişen maküler ödem olmak üzere üç tip diyabetik retinopati vardır (66).

2.2.2.2.4. Nefropati

Transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β), büyüme hormonu, IGF-1 (İnsülin benzeri büyüme faktörü-1), VEGF ve epidermal büyüme faktörünü içeren birçok büyüme faktörünün aktivitesinin artması, PKC izoformlarının aktivasyonu, renin, anjiyotensin, endotelin ve bradikinini içeren hormonların salınımının artması, reaktif oksijen türlerinin oluşumu, ileri glikasyon son ürünleri oluşumunun artması, aldoz redüktaz yolağının aktivitesinin artışı ve glukoz transport mekanizmalarındaki anormallikler diyabetik nefropatinin patogenezinin gelişmesinde önemli rol oynadığı

bilinmektedir. Diyabetik nefropati gelişme riskini etkileyen çeşitli genlerin olduğu düşünülmektedir (67).

2.2.2.2.5. Gastrointestinal Komplikasyonlar

Diyabetin gastrointestinal komplikasyonları mide felci, bağırsak hastalığı ve nonalkolik yağlı karaciğer hastalığını kapsar. Diyabetin gastrointestinal komplikasyonları diyabetin artan oranı ile daha yaygın hale gelmiştir. Mide felci, diyabetik hastaların % 5-12'sinde ve kadınlarda daha sık görülür ve erken doyma, bulantı, kusma, şişkinlik hissi veya üst karın ağrısı ile ortaya çıkar. Diyabetik bağırsak hastalığı ishal, kabızlık veya fekal inkontinens (dışkı kaçırmaya) ile ortaya çıkar. Diyabetik hastalardaki ishal prevalansı % 4-22 arasındadır. Sıklıkla tip 2 diyabet ve obezite ile ilişkili olan nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı, alkol almayan kişilerde alkolik karaciğer hasarına benzeyen patolojik bir durumdur. Ciddi obez ve şeker hastası olan tüm hastaların yarısı yağlı karaciğer hastalığına sahiptir (68).

2.2.2.2.6. Seksüel Disfonksiyon

DM hem erkeklerin hem de kadınların cinsel fonksiyonlarını etkiler. Diyabetli erkeklerde cinsel işlev bozukluğu görülme sıklığı % 50, diyabetik kadınlarda ise biraz daha düşüktür. Diyabetik seksüel fonksiyon bozukluğunda birçok biyokimyasal mekanizma rol oynar. Eğer kan şekeri kontrolü kötü ise testesteron düzeyi normal olsa bile cinsel fonksiyonu azalttığı bilinmektedir. Şeker hastalarının önemli bir kısmı yüksek LDL (Düşük yoğunluklu lipoprotein), düşük HDL (Yüksek yoğunluklu lipoprotein) ve artan trigliseride bağlı olarak hiperlipidemiye sahiptir. Bu durum kalp hastalığı için bir risk taşır fakat aynı zamanda cinsel işlev bozukluğu ile de ilişkilidir (69).

2.2.2.2.7. Diyabetik Ayak

Diyabetik ayak, DM'li hastalar için en ciddi komplikasyonlardan biri olarak kabul edilir. Diyabetik ayak, dünyada non-travmatik alt ekstremitte kayıplarının önde

gelen nedenidir. Tüm diyabetik hastaların yaklaşık % 20-25'i hayatlarının bir döneminde alt ekstremite ülserasyonu ile karşılaşmaktadır (70). Ekstremitte kayıplarının hemen hemen % 85'i, diyabetik ayak ülseri ile başlar. Diyabetik ayak, klasik olarak nöropati, iskemi ve infeksiyon üçlüsü ile karakterize edilir. Altta yatan en önemli nedenleri periferik damar hastalığı, periferik nöropati ve iskemi olduğu belirtilmiştir (71).

2.3. VEGF

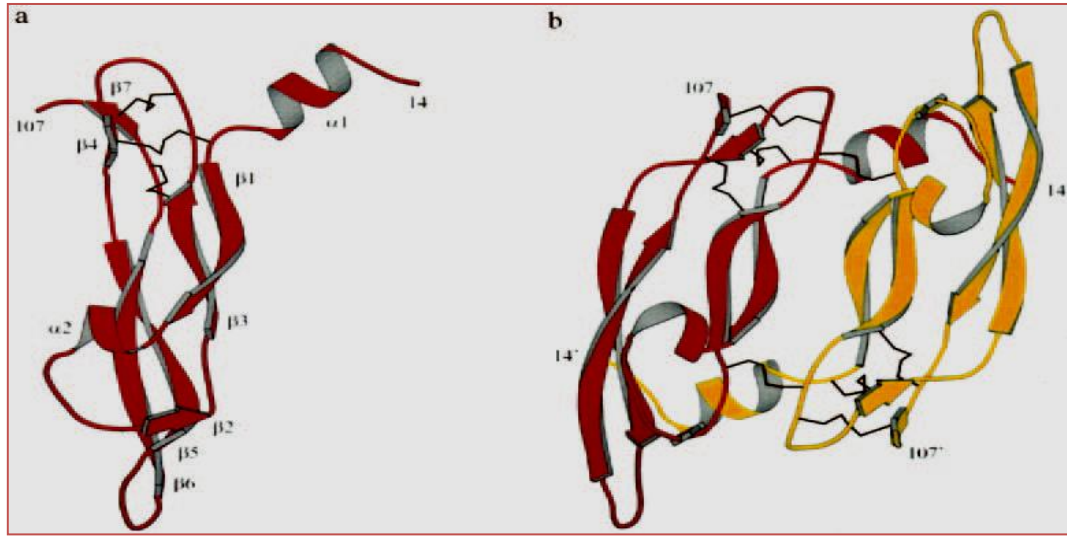
VEGF, vaskülogenez ve anjiyogenezde önemli bir düzenleyici olan ve bununla birlikte vasküler permeabilitede de potansiyel bir indükleyici olarak görev yapan homodimerik glikoprotein yapısında endotel hücrelere özgü bir büyüme faktörüdür (8).

1983 yılında, kobay tümör hücrelerinde vasküler sızıntıya neden olan bir protein (VPF; vasküler permeabilite faktörü) belirlenmiş ve bu proteinin tümör kan damarlarının yüksek geçirgenliğinin bir aracısı olabileceği ileri sürülmüştür (72).

Daha sonra, hipotalamus ve hipofizdeki vasküler ağların büyümesinin düzenlenmesi ile ilgilenilmiş ve bovine hipofiz foliküler hücrelerini içeren ortamdan yeni bir heparin bağlayıcı endotel hücre mitojeni izole edilmiş ve tanımlamıştır (72).

1989'un başında bu saflaştırılmış proteinin NH₂-terminal amino asit dizisi elde edilmiştir. Bu proteinin sadece vasküler endotel hücrelerde büyümeyi sağlamasından dolayı "Vasküler endotel büyüme faktörü" olarak adlandırılmıştır (72).

VEGF'nin tüm üyeleri, homolojisi benzer bir VEGF domainine sahiptir. VEGF, iki adet VEGF monomerinin disülfid bağıyla birleşmesiyle oluşur. Antiparalel yönde dimerize olan her bir monomer merkezde dört iplikli beta sheet tabakasından ve bu tabakanın bir ucunda molekül içi ve arası disülfid bağlarını içeren sekiz sistein kalıntısından oluşur (Şekil 2. 4) (73).



Şekil 2. 4. VEGF'nin Üç Boyutlu Yapısı (73).

VEGF geni kromozom 6p21.3 üzerinde yer alır (74). *VEGF* ile ilişkili yedi gen tespit edilmiştir; *VEGF-A*, *VEGF-B*, *VEGF-C*, *VEGF-D*, *VEGF-E*, *VEGF-F* ve *PlGF* (Plasental büyüme faktörü) (73).

VEGF-A, yetişkin akciğer, böbrek, kalp ve böbreküstü bezinde en yüksek transkript seviyesinde bulunan ve 34-42 kDa (kilodalton) büyüklüğünde, dimerik, disülfid bağlı bir glikoproteindir. *VEGF-A* transkripti sekiz ekzonlu tek bir *VEGF-A* geninden oluşur. *VEGF-A* geni mRNA'sının alternatif splicing'i (farklı birleşimleri) ile oluşan 121, 145, 148, 165, 183, 189, ve 206 amino asitlik en az yedi homodimerik izoformu vardır. Ekzon 1, 5 ve 8 tarafından kodlanan amino asitler, *VEGF-A148* hariç tüm izoformlarda korunmuştur. Buna karşın iki ayrı heparin bağlayıcı domainini kodlayan ekzon 6 ve 7 de ise değişken alternatif splicing meydana gelir. Bu domainlerin varlığı ya da yokluğu, reseptör bağlanmasını ve çözünürlüğü etkiler (73).

VEGF ilişkili faktör de denilen *VEGF-B* ise bir VEGFR-1 (VEGF reseptörü 1) ve Nrp-1 (Nöropilin-1) ligandır. Nöropilinler (Nrp-1 ve Nrp-2), anjiyogenezide kapsayan immünolojik ve nöronal gelişimde rol alırlar. *VEGF-B*'nin insanda, iki farklı izoformu bulunur; *VEGF-B167* ve *VEGF-B186*. *VEGF-B167*, *VEGF-B*'nin en çok bulunan izoformudur. Çoğunlukla ekstraselüler matris içinde bulunur ve heparan sülfat proteoglikanlarını bağlar. Kalp kası, iskelet kası ve kahverengi yağ dokusunda bol bulunur. *VEGF-A* ve *VEGF-B* izoformları alternatif splicing ile

oluşurken, *VEGF-C* ve *VEGF-D*'nin farklı formları proteolitik süreçler sonucu oluşur. (75).

VEGF-C, endotelial hücrelerin hayatta kalmasını, mitogenesi ve göçü indükler. *VEGF-C*, ağırlıklı olarak lenfatik damar gelişiminin olduğu bölgelerde *VEGFR-3* reseptörü ile birlikte ifade edilir. İn vivo anjiyogenik ve lenfanjiyogenik etkisi olan *VEGF-D* ise *VEGFR-2* (*VEGF* reseptörü 2) ve *VEGFR-3* (*VEGF* reseptörü 3) reseptörlerini aktive edip bağlar ve endotelial hücreler için mitojenik etkiye sahiptir (75).

PlGF, ağırlıklı olarak plasenta, kalp ve akciğerlerde ifade edilir. *PlGF* homodimerleri *VEGFR-1* ve *Nrp-1*'i bağlar. *VEGFR-1*'in *PlGF* tarafından aktivasyonu farklı gen ekspresyon profillerini uyarır ve *VEGFR-1*'in tirozin kinaz domainindeki tirozin kalıntılarının fosforilasyonu sağlar. Bu da anjiyogenez oluşumuna katkı sağlar (75).

Dolayısıyla vasküler endotelial büyüme faktörleri ve reseptörleri vaskülogenik ve anjiyogenik mekanizmalar aracılığıyla vasküler sistem gelişiminde ve lenfatik damar sistemi oluşumunda çok önemli bir rol oynar. Bununla birlikte, bu moleküller yara iyileşmesi ve kadın endometriyumunun siklik yenilenmesi gibi doku tamirini içeren süreçler için de gereklidir (75).

İnsanda *VEGF* ailesinin sinyalizasyon reseptörlerini kodlayan üç gen bilinmektedir: *VEGFR-1*, *VEGFR-2* ve *VEGFR-3*. Buna ek olarak *VEGF* alt ailesinin koreseptörlerini kodlayan iki gen daha bulunur: *Nrp-1* ve *-2*. *VEGF* reseptör tirozin kinazlar sadece vasküler ve lenfatik endotel hücrelerde değil, bazı tümör hücreleri, sinir hücreleri, düz kas hücreleri, iskelet miyositleri ve perisitleri içeren non-endotelial hücrelerde de ifade edilir. *Nrp*'ler ise nöronlar, endotelial ve tümör hücrelerinde *VEGF*'nin koreseptörleri olarak bulunur (76).

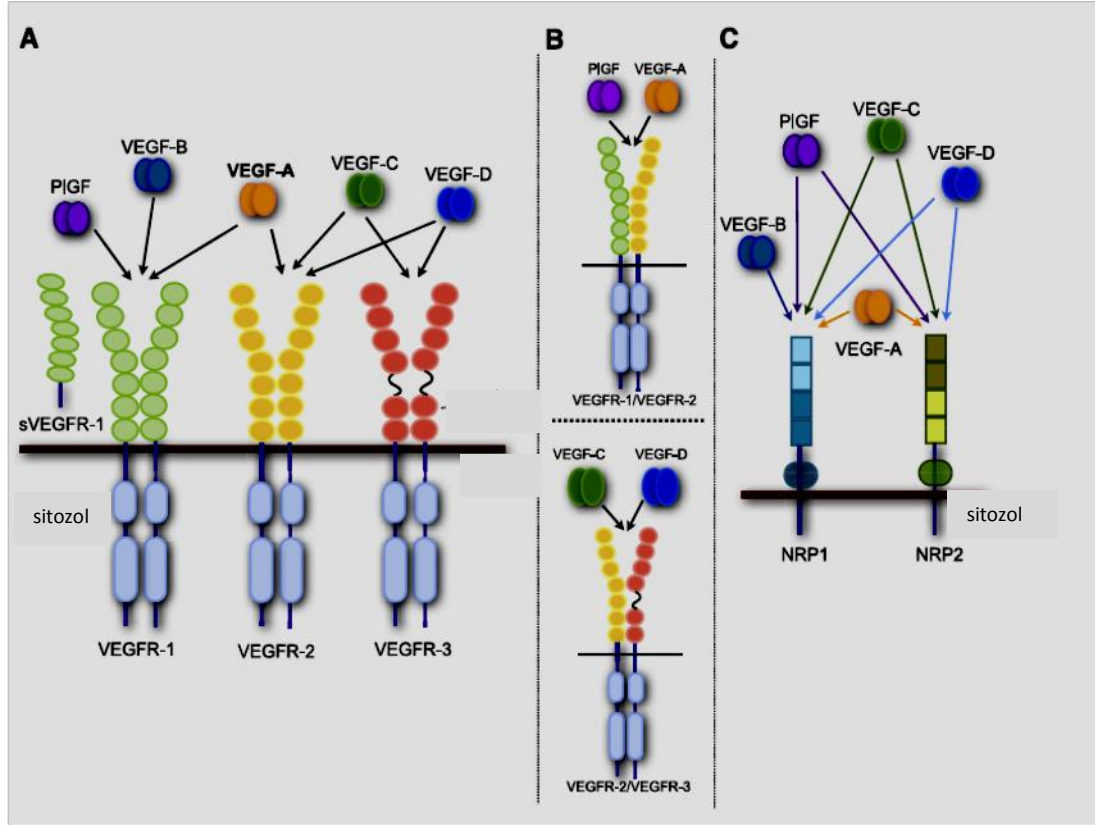
VEGF'nin tüm üyeleri tirozin kinaz reseptörleri ile (*VEGFR-1*, *VEGFR-2* ve *VEGFR-3*) etkileşim gösterirler ve her biri bu üç reseptör için farklı bağlanma affinitesi gösterirler (Şekil 2. 5) (77).

VEGFR-1'in, hem negatif hem de pozitif anjiyogenik etkileri vardır. *VEGFR-2*, *VEGF-A*'nın mitojenik, anjiyogenik ve damar geçirgenliği etkilerine aracılık eder. *VEGFR-3*, lenfatik damarlar üzerinde anjiyogenik etkilere sahiptir (8).

VEGF'nin reseptöre bağlanması reseptörlerin dimerizasyonuna (VEGFR-1/VEGFR-1, VEGFR-1/VEGFR-2, VEGFR-2/VEGFR-2) ve otofosforilasyonuna sebep olmaktadır. Bunun sonucunda birtakım hücre içi sinyal iletim yolları aktive olmakta ve bu da endotel hücrelerinin proliferasyon, migrasyon, permeabilitesinin artmasını ve ömürlerinin uzamasını sağlamaktadır (73).

VEGF gen ekspresyonunun düzenlenmesinde birçok faktör katkıda bulunur; fibroblast büyüme faktörü, interlökin-1 ve TGF- β gibi multipl büyüme faktörleri, kasılması ve egzersiz gibi mekanik faktörler, hipoksi ve inflamasyon gibi çevresel faktörler *VEGF* gen ifadesini düzenler. Örneğin ras gibi onkogenler ile oluşan tümör hücrelerinde *VEGF* ailesinin üyeleri ifade edilir. Bu düzenleyicilerin her biri transkripsiyon faktörleri ile *VEGF* gen transkripsiyonunun artmasını veya baskılanmasını düzenler (76).

VEGF ekspresyonunun düzenlenmesinde hipoksi indüklenebilir faktör-1 alfa (HIF-1 α)'nın rolünün de olduğu bilinmektedir. Hipoksik ortamda HIF-1 α aktive olur ve bu protein *VEGF* genine bağlanarak VEGF'nin sentezini sağlar. Fizyolojik olarak HIF-1 α , anjiyogenezi, damar tonusunu, glukoz metabolizması ve apoptozisi düzenler. *VEGF*'nin artan ekspresyonu tümör anjiyogenezi ve diyabetik nefropati gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (78).



Şekil 2. 5. *VEGF* Gen Ailesi Üyeleri ve Reseptörleri (77).

İn vitro ve in vivo çalışmalarda anjiyogenezin oluşumunda *VEGF* ve *bFGF*'nin sinerjistik etkilerinin bir rolü olduğu gösterilmiştir (79).

VEGF, vaskülotropin ya da vasküler permeabilite faktörü olarak da adlandırılır. Vasküler endotelyum, perisitler, retinal pigment epiteli, makrofajlar, T hücreler ve diğer bazı hücreler tarafından üretilir. Permeabiliteyi uyarır ve damar endotel hücreleri için mitojenik etkiye sahiptir (80).

Endotel hücreler, apikal (lümenal) ve bazolateral (ablümenal) yüzeylere sahip kutuplaşmış hücrelerdir. *VEGF*'nin ablümenal tarafında bulunan reseptörleri, bir kemoatraktan olarak endotel hücrelerin göç etmesi için rehberlik yapar. Ancak, lümenal tarafında bulunan reseptörleri aracılığıyla da hücre aktive edilir. Aktifleşen hücrenin polaritesi değişir. İnterstisyel *VEGF*, serbest ve difüze olmasından ziyade ekstraselüler matrikse veya hücre yüzey reseptörlerine bağlı olduğu bilinmektedir. İnterselüler ve kandaki *VEGF*, bütün bir dokudaki *VEGF* konsantrasyon düzeyini içerir (76).

Postnatal dönemde *VEGF* ekspresyon düzeyleri progresif olarak azalır ve yumurtalıklar, rahim ve deri gibi anjiyogenezin aktif olduğu yerler dışında, endotel hücrelerin istirahat halinde olduğu birçok yetişkin dokuda minimal düzeydedir. *VEGF*, overde korpus luteumun oluşumu sırasında, rahimdeki endometrial damarların büyümesi sürecinde ve embriyo implantasyonunun olduğu yerde oluşur. Ayrıca, yara iyileşmesinin proliferatif aşamasında *VEGF* düzeyleri yükselir. *VEGF*'nin, MAPK (Mitojen ile aktive protein kinaz) sinyal iletim yolu üzerinden VEGFR-2 reseptörü aracılığıyla nöronların olgunlaşmasını ve dolayısıyla nörojenezi etkilediği de düşünülmektedir. Ayrıca *VEGF* ekspresyonunun düzenlenmesindeki bir anormallik motornöron dejenerasyonunu içeren birçok nörodejeneratif bozukluğa neden olur (81).

VEGF, damar gelişimi ve morfonogenezini, vasküler tonus ve permeabilityi, endotel ve inflamatuvar hücrelerin kemotaksisini modüle eder. *VEGF*'nin çoğu fonksiyonu ekstraselüler mikroçevre ve hücre tiplerinin verdiği yanıtı bağlıdır. *VEGF* ve reseptörleri embriyogenez sırasında kan damarının geliştiği yerlerde ifade edilir. *VEGF* ve reseptörlerinin mRNA düzeyleri doğum sonrası dönemde önemli ölçüde azalır. Fakat anjiyogenez devam eden dokuların endotelinde ekspresyon yüksektir ve ayrıca fenestralı endotelin proksimalinde de yüksektir. *VEGF*, endotel hücreler, inflamatuvar hücreler ve nöronal hücreler üzerine etki eder ve ekspresyonu retinopatilerden kansere kadar uzanan; tümörler ile ilişkili patolojik anjiyogenez, romatoid artrit, prematüre retinopatisi ve diğer bozukluklar ile ilişkili hastalıkların patolojilerine katkıda bulunabilir. Birçok hastalıkta anjiyogenez önemli bir rol oynar ve damar gelişiminde *VEGF*'nin merkezi rol alması onu anjiyogenezin ya uyarılması ya da inhibisyonu için hedef bir protein yapar. *VEGF* veya reseptörlerindeki bozulma vaskülojenesisdeki defektler nedeniyle erken embriyonik lethaliteye yol açar. *VEGF* fonksiyonunun doğum sonrasında blokajı, kemik gelişimi sırasında fizyolojik yeni damar oluşumunu ve kadın üreme döngüsünün çeşitli safhalarını inhibe eder (82).

VEGF, omurgalıların sinir sistemi üzerinde kritik öneme sahiptir; yetişkinlerde nörojenезisi, nöroproteksiyonu ve glial büyümeyi teşvik eder, merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemindeki glia ve nöronlar üzerinde trofik etkileri vardır, gelişmekte olan merkezi sinir sisteminde nöronal migrasyonu destekler ve ayrıca nöral bozuklukların tedavisinde terapötik değeri vardır (83).

2.4. VEGF ve Diyabet

Diyabette erken mortalite ve morbiditenin esas nedeni diyabetik mikrovasküler komplikasyonlardır. Diyabetik komplikasyonlarda bir risk faktörü olan hipergliseminin neden olduğu doku hasarının hızlanmasında büyüme faktörleri önemli rol oynayabilir. VEGF, diyabetik mikrovasküler komplikasyonların patogeneğinde önemli bir rol oynayan çok fonksiyonlu bir sitokindir. VEGF, glomerüler kılcal damarlar da dahil olmak üzere birçok dokunun vasküler endotelial hücre proliferasyonunu düzenler. Endotelial disfonksiyon ve artmış kan damar geçirgenliği, hem diyabetik retinopati hem de diyabetik nefropatide gözlenir (84).

Hiperglisemi, DM'de endotelial disfonksiyon gelişiminde önemli bir nedensel faktördür. Endotel disfonksiyon bariyer fonksiyonundaki değişiklikler, dolaşımdaki birtakım hücrelerin adhezyonundaki ve proliferasyonundaki değişiklikler ve apoptozise duyarlılık ile karakterizedir. Normalde, endotelial hücre hasarı endojenöz onarım süreçleri ile hafifletilebilir. Fakat, diyabet hastalarında yaralanma ve onarımdaki dengesizlik mikrovasküler hücrelerin apoptozisi de dahil olmak üzere bir takım mikrovasküler değişikliklerle sonuçlanır ve sonuçta diyabete bağlı komplikasyonlar oluşur. Ayrıca, DM endotelial hücrelerin anjiyogenik özelliklerini de değiştirir (85).

Endotel disfonksiyon, hem diyabetik hem de diyabetik olmayan albüminürlü hastalarda diyabetik böbrek hastalığı ve böbrek yetmezliğini içeren böbrek kronik mikrovasküler komplikasyonların gelişiminde potansiyel bir mekanizma olarak rol oynamaktadır. Hiperglisemi ve hipertansiyon glomerüler hipertansiyona neden olur ve bunun sonucu olarak proteinüri, glomerüler ve interstisyel doku fibrozisi ve progresif glomerüler filtrasyon hızında düşüş meydana gelir ve sonuçta diyabetik böbrek hastalığı gelişerek böbrek yetmezliği oluşur (86).

Diyabetik nefropati, DM'nin yaygın bir komplikasyonudur ve batı dünyasında son dönem böbrek hastalığının başlıca nedenidir. VEGF, tip 1 DM'nin diyabetik nefropatinin patogeneğinde önemli rol oynar. VEGF, özellikle podositler tarafından böbrekte üretilir ve reseptörlerine bağlanarak biyolojik aktivite gösterir. Normal glomerülde, VEGF izoformları sıkı düzenlenir ve glomerüler filtrasyon bariyerinin bütünlüğünü koruyarak parakrin ve otokrin bir etki gösterir (6).

Diyabetik retinopati, erişkinlerde görme kaybına neden olan ve diyabetin ciddi bir oküler komplikasyonudur. Yüksek kan şekeri diyabetik retinopatinin gelişmesinde ve ilerlemesinde birincil patojenik faktördür ve kan şekerinin kontrol altında tutulması retinopati gelişimini azaltmaktadır. VEGF, diyabetik hastaların retinal mikrovasküler komplikasyonlarında önemli bir rol oynar. Yüksek kan şekeri *VEGF*'yi aktive ederek diyabetli hastaların retinasında fonksiyonel ve morfolojik değişiklikler yaratır (87). Diyabetik retinopati gelişimine birçok biyokimyasal mekanizma katkıda bulunabilir; PKC- β aktivasyonu, VEGF üretiminin artması, oksidatif stres, ileri glikasyon son ürünleri ve hücre içi sorbitol birikimi bunların arasındadır. Diyabet, retinada damar hasarlanmasına ve iç kan retina bariyerinin bozulmasına ve dolayısıyla iskemi gelişimine ve damar geçirgenliğinin artmasına yol açar. Vasküler permeabilitenin artması kan-retina bariyerinin korunmasından sorumlu endotel hücrelerin hasarına yol açar. Endotel hücrelerin permeabilitesinin düzenlenmesinde ve VEGF üretiminde PKC- β önemli bir rol oynar. Kan-retina bariyerinin hasarı ile makulada ekstraselüler sıvı birikebilir ve optik sinir şişebilir. Kapiller tıkanma sonucu hipoksi ve iskemi gelişmekte ve bunun sonucu olarak da proliferatif dönemde görülen yeni damar oluşumu, retinada yaygın fibrozis ve sonuçta görme kaybı ve körlükle sonuçlanan retina hasarı görülmektedir (88).

Aynı zamanda, diyabet ve glukoz homeostazındaki anormallikler, karaciğerde fazla glikojen birikimi, safra kesesi hastalığı, siroz ve alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı gibi birçok karaciğer hastalığına neden olur. Sirotik karaciğerde insülin yıkımının azalması veya insülin direncinin bozulması nedeniyle insülin düzeyleri artar. Kronik diyabet hastalarındaki uzun süreli insülin yetersizliği, karaciğerde glikojen sentaz aktivasyonunun bozulmasına yol açar ve dolayısıyla karaciğerde glikojen birikimine neden olur. Aşırı glikojen birikimi olan hastalarda hepatomegali (karaciğer büyümesi) ve karaciğer enzimlerinde anormallikler görülür. Karaciğerde yağ sentezinin artması ve yağların oksidasyonunun azalması hepatik yağ birikimine neden olur. Tip 2 diyabet, hiperlipidemi ve obezite yağlı karaciğer hastalığı ile ilişkilidir (15).

Karaciğerde VEGF, belirgin olarak sinüzoidal endotel hücreleri ve hepatositlerde sentezlenir ve karaciğer rejenerasyonunda önemli rol alır. Akut hepatitli hastalarda yapılan çalışmada yüksek serum VEGF düzeyi saptanmıştır. Bu

yüksekliğin akut karaciğer hasarındaki yüksek rejenerasyona bağlı olduğu düşünülmektedir (89).

Diyabetin yara iyileşmesi üzerine de olumsuz etkileri vardır. Diyabetli insan ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalar diyabetin organizmada oluşturduğu olumsuz koşulların yara iyileşmesini olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir. Yara iyileşmesinde etkin rol oynayan proteinlerin salınımında azalma görülür (90). Diyabetik yaralarda *VEGF* ekspresyon seviyesinde azalma gözlenir. Normalde *VEGF* anjiyogenezi sağlayarak yara iyileşmesi sürecinde aktif rol oynar (91). Lerman ve arkadaşları (92), diyabetli farelerden alınan fibroblastların fonksiyonlarında bozukluklar olduğunu göstermişlerdir. Fibroblastlar yara iyileşme sürecinde, *VEGF*'yi de içeren çok sayıda büyüme faktörü salgırlar. Diyabetik fibroblastlar, uzun süreli hiperglisemi karşısında başlangıçta ya da hipoksiye yanıt olarak normal seviyelerde *VEGF* üretememektedirler (92).

Diyabet, mikro damar yapı ve fonksiyonunda değişikliklere neden olduğundan aynı zamanda kardiyovasküler hastalıklar için bir risk faktörüdür (93). Diyabet hastalarında kardiyovasküler hastalıklardan ölüm oranı normal popülasyona göre üç kat daha fazladır (94).

Diyabet, anjiyogenezin düzenlenmesinde yer alan birçok genin mRNA konsantrasyonunu değiştirmektedir. Özellikle *VEGF-A* ve *VEGF-B* ile birlikte onların reseptörleri olan *VEGFR-1*, *VEGFR-2* ve *Nrp-1*'in mRNA konsantrasyonunu azaltmaktadır. Diyabetik insan ve hayvanların iskelet ve kalp kaslarında anjiyogenezin bozulduğu ve *VEGF-A* ve reseptörlerinin ekspresyonunun azaldığı gözlenmektedir (93).

Diyabet aynı zamanda Trombospondin 1 (*TSP-1*) ve Retinoblastoma benzeri 2 (*Rbl-2*) genlerinin de mRNA düzeyini artırmaktadır. Bu genlerin ikisi de anjiyogenezi inhibe eder. Vasküler hücrelerin artan glukoza cevap olarak *TSP-1* ifadesini arttırması diyabetin kardiyovasküler komplikasyonlarının oluşumuna katkı sağlar. *Rbl-2*, *VEGF-A* üzerinde inhibitör etkiye sahiptir. *Rbl-2*'nin aşırı ekspresyonu, *VEGF-A* mRNA ve protein seviyelerini azaltarak tümör hücrelerinin anjiyogenezini inhibe eder (93).

Diyabet, miyoglobin ve süperoksit dismutaz 2 (*SOD 2*) mRNA'larının ekspresyonunu da önemli ölçüde azaltmaktadır. Normalde *VEGF-A*, miyoglobinin

ekspresyonunu arttırmaktadır. Diyabetiklerde *VEGF-A* ve miyoglobinin azalması kasların oksijenizasyonunu etkilemektedir (93).

Hiperglisemik dokularda reaktif oksijen türleri de (ROS) artar. Artan ROS ve azalan *SOD 2* endotel hücrelerin oksidatif hasarına zemin hazırlar (93). Artan oksidatif stres, diyabetin kronik komplikasyonlarının patogenezinde anahtar rol oynar. Hipergliseminin neden olduğu oksidatif stres, *VEGF* üretimini uyarabilmektedir (95).

Diyabet, oksidatif stresle uyarılan metalotionin-1 ve -2 mRNA seviyelerini de arttırmaktadır. ROS'un hiperglisemiye bağlı aşırı üretimi, metalotionin-1 ve -2'yi artırır ve böylece oksidatif stresin neden olduğu belirtilerini hafifletir ve anjiyogenezi teşvik eder (93).

Diyabet geleneksel büyüme faktörlerinin yanı sıra, kan damarlarının büyümesini düzenleyen birkaç ekstraselüler matriks proteininin mRNA düzeylerini de değiştirmektedir. Örneğin sistince zengin proteinlerden *Cyr61*, *Cyr3* ve bağ dokusu büyüme faktörü diyabetik kaslarda artmaktadır. Bu proteinler ekstraselüler matriksin yeniden oluşumunu sağlar ve proanjiyogenik aktiviteleriyle damarlanmanın oluşmasında önemli role sahiptir (93).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

- Glikometre (Roche accucheck)
- Gerçek zamanlı PZR makinası (Roche, LC480 modeli)
- PZR cihazı (Biorad-MyCycler)
- Terazî (Denver Instrument)
- Elektroforez güç kaynağı (Biorad)
- pH-metre (Jenco, 6173 model)
- Masaüstü santrifüj cihazı (14000 rpm) (Hettich-zetrifugen, micro 200 model)
- Homojenizasyon cihazı (Ultra turrax, T 25 model)
- Hassas otomatik pipetler ve uçları (Biohit)
- Vorteks (Labart)
- Manyetik karıştırıcı (Yellow line)

3.2. Kullanılan Kimyasallar

Araştırmada Sigma marka; Streptozotosin, EDTA, Tris Baz, Borik asit, Etidyum Bromür, Agaroz, Sodyum Sitrat tribasic dihidrat, Guanidin Tiyosiyanat, Sodyum Hidroksit, Hidroklorik asit, Dietilpirokarbonat (DEPC), Beta-merkaptotanol, Sodyum Klorit, Amonyum Sülfat, Taq polimeraz, İnvitrogen marka; dNTP, Ters transkriptaz, QIAGEN marka; RNA Mini Saflaştırma Kiti kullanıldı.

3.3. Sıçanların Temini ve Bakımı

Bu araştırma için, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi deney hayvanları yerel etik kurulundan 09/06/2011 tarihli ve 2011/A-42 protokol no'lu kararı ile etik onay alındı. Araştırmada 8-10 haftalık sıçanlar kullanıldı. Kontrol grubundaki sıçanların ağırlık ortalamaları $222 \pm 22,4$ gr iken (n=10) diyabet grubundaki sıçanların ağırlık ortalamaları $238,42 \pm 9,9$ gr (n=7) idi. Araştırmada kullanılan dişi Wistar albino sıçanlar, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma

Merkezinden temin edilerek kullanıldılar. Çalışma bütçesinin tamamı İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 2011/149 proje no'lu kararı gereğince karşılandı. Deney süresince sıçanlar sıcaklığın 21°C ve ortam neminin % 55–60 olduğu, 12 saat ışık (08.00–20.00 saatleri), 12 saat karanlık uygulanan odalarda tutuldular ve adlibitum olarak beslendiler.

3.4. Grupların Oluşturulması

Diyabet modeli küçük modifikasyonlar ile Pushparaj ve ark. (5) metoduna göre oluşturuldu. Deneye başlamadan önce bütün hayvanların ağırlıkları ve açlık kan şekerleri ölçüldü. Araştırmada kullanılan sıçanlar kontrol ve diyabet olarak 2 gruba ayrıldılar.

Kontrol grubu 10 adet sıçandan oluştu. Bu gruba STZ'nin çözülmüş olduğu taşıyıcı çözelti olan 0,01 M sitrat tamponu (pH: 4,5), 1 cc hacimde tek bir doz olarak intraperitoneal yolla enjekte edildi.

İkinci grup diyabet grubu idi. Bu grupta deney başlangıcında 10 sıçan yer aldı. Sıçanlar deneye başlamadan bir gece önce aç bırakıldılar ve 0,01 M sitrat tamponu içerisinde (pH: 4,5) çözülmüş STZ her bir sıçana tek doz olarak kg vücut ağırlığı başına 60 mg olarak uygulandı. Bu dozun uygulanmasının ardından 3 hayvan öldü, STZ dozu 50 mg'a çekildi. Uygulamadan 72 saat sonra hayvanların açlık kan şekerleri kuyruk venlerinden alınan kandan glikometre ile ölçüldü ve açlık kan şekeri düzeyi 350 mg/dL ve üzerinde olan sıçanlar diyabetli kabul edildiler. 50 mg STZ uygulamasının ardından hayvanlarda herhangi bir ölüm gerçekleşmedi, deney 7 hayvan ile tamamlandı. Bütün grupların açlık kan şekerleri ve ağırlıkları deneye başlamadan önce, 72. saatte ve 21. günde ölçüldü.

3.5. Dokuların Alınması

STZ uygulamasının ardından 21. günde kontrol ve diyabet grubundaki hayvanlar ksilazin-ketamin anestezisi altında (ketamin hidroklorür, Parke- Davis. Eczacıbaşı, İstanbul, 75 mg/kg ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorid Rompun, Bayer İlaç) dekapite edilerek karaciğer dokuları alındı. *VEGF* mRNA seviyelerinin tespiti için,

gruplardan alınan karaciğer dokuları, steril şartlarda ve buz üzerinde küçük parçalar halinde kesildi ve RNA saklama çözeltisi içinde -35 °C derin dondurucuda analiz gününe kadar saklandı. Bu dokulardan Qiagen firmasının ürettiği RNeasy mini kit kullanılarak toplam RNA saflaştırılması yapıldı. Hayvanlar bütün deney boyunca normal sıçan pellet yemi ile ad libitum olarak beslendiler.

3.6. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar

3.6.1. Streptozotosin Hazırlanması

-20 derecede saklanan streptozotosin 0,01 M Sitrat tamponu (pH:4,5) içerisinde hazırlanarak her bir hayvana 50 mg/kg vücut ağırlığı dozu olacak şekilde intraperitoneal yolla uygulandı.

500 ml, 0,01 M, pH: 4,5 olan Sitrat tamponu aşağıdaki şekilde hazırlandı.

0,68 gr Sitrik asid monohidrat + 0,51 gr Sodyum sitrat tribasic tartıldı ve 500 ml distile suda çözülerek pH:4,5 e ayarlandı.

3.6.2. RNA Saklama Solüsyonu

70 gr Amonyum sülfat, 10 mM EDTA ve 25 mM Sodyum sitrat (pH:5,2), 100 ml DEPC ile işlenmiş bidistile su içerisinde karıştırılarak hazırlandı ve son pH 5,2'ye ayarlandı.

3.6.3. RNA Denatüre Solüsyonu (RLT Çözeltisi)

4M Guanidin tiyosiyanat, 25 mM Sodyum sitrat (pH:7), % 0,5 sarkosil içeren çözelti hazırlandı ve kullanımdan hemen önce son konsantrasyon % 1 olacak şekilde beta-merkaptöetanol eklendi.

3.6.4. 5X TBE Çözeltisinin Hazırlanması

0,4M Tris baz, 0,4M Borik asit, 20 mM EDTA bu tamponun hazırlanmasında kullanıldı. 1000 ml 5X TBE çözeltisi hazırlamak için 54 gr Tris baz, 27,5 gr Borik

asit, 20 ml 0,5 M EDTA çözeltisi hazırlanarak 900 mL bidistile su içerisinde manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Çözeltinin pH'sı 8,0 oluncaya kadar HCl eklendi. Çözeltinin toplam hacmi 1000 ml'ye tamamlandı.

3.7. Total RNA Saflaştırması (Qiagen Kit Protokolü)

Bu işlem için Qiagen RNA mini saflaştırma kiti, aşağıda verilen şekliyle kullanıldı.

-Yaklaşık 100 mg doku parçası alındı ve % 5 (w/v) doku olacak şekilde içerisindeki RLT çözeltisi içine kondu.

-Homejinizatörde 13.500 rpm hızda, 5 mm'lik homojenizatörün ucuyla buz üzerinde 1 dakika homojenize edildi

-Homojenattan 600 µl alındı (30 mg dokuya karşılık geliyor).

-10 dakika 18.000 rpm'de (4 °C) de santrifüj edildi.

-Süpernatant kısmı yeni Eppendorf tüpüne alındı ve üzerine aynı hacimde %70 etanol (DEPC'li bidistile su ile hazırlandı) eklendi.

-Çözeltinin 600 µl'si filtreye kondu ve altındaki tüple beraber 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi.

-Alt tüpteki sıvı atıldı ve tüp tekrar filtreye takılarak geriye kalan çözelti de filtreye eklendi ve yukarıdaki gibi santrifüj edildi.

-Alttaki tüpteki sıvı atıldı ve filtreye RWI solüsyonundan 700 µl eklendi ve 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi.

-Alttaki tüp atıldı ve filtrenin altına yeni bir tüp takıldı (2 ml) ve filtreye 500 µl RPE solüsyonu ilave edildi (kullanmadan önce RPE için 4 kat etanol eklendi) ve 15 saniye 10.000 rpm'de santrifüj edildi.

-Alttaki sıvı atıldı ve filtreye 500 µl RPE eklendi ve 2 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi.

-Alttaki tüp atıldı ve filtre yeni bir eppendorf içerisine takıldı ve filtreye 50 µl RNAaz içermeyen bidistile su eklendi ve 1 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi.

-Filtreye tekrar 50 µl RNAaz içermeyen bidistile su konularak tekrar 1 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi, alt tüpteki saf toplam RNA hemen -35 °C'de saklandı.

3.8. RNA'nın Agaroz Jele Yükleme İşlemleri

QIAGEN RNAeasy saflaştırma kiti ile karaciğer örneklerinden saflaştırılan toplam RNA'lar, % 1'lik agaroz jel üzerinde, 1X TBE tamponunda, elektroforezde 100 mV'de koşturuldu. RNA bantları jel görüntüleme sisteminde (ultraviyole ışık altında) görüntülenerek 28S ve 18S keskin ribozomal RNA bantlarının elde edildiği ve herhangi bir yıkımın olmadığı RNA'lar cDNA işleminde kullanıldı (Şekil 4. 3). Örneklerin RNA miktarları spektrofotometrede 260 nm UV spektrumunda okundu. RNA miktar hesaplanmasında 260 nm'deki okunan OD x Sulandırma faktörü x 40/1000 formülü kullanıldı. RNA miktarı µg/uL cinsinden bulundu.

3.9. cDNA Sentez Protokolü

cDNA sentezi için Invitrogen firmasının ürettiği Superscript III ters transkriptaz enzim kiti kullanılmıştır. cDNA sentezi firmanın önerdiği şekilde yapılmıştır.

Kısaca 100 µl'lik PZR tüpüne 1,0 µg toplam RNA, 1 µl primer (4 pmol gen spesifik primer veya 100 pmol PoliT-18 primeri), 1 µl dNTP (10 mM) ve toplam hacim 13 µl olacak şekilde bidistile su eklendi, karıştırıldı ve 65 °C'de 15 dakika PZR makinesinde ısıtıldı. Bu karışım üzerine 4 µl 5x First strand tamponu, 2 µl DTT, 1 µl bidistile su, 1 µl Superscript III ters transkriptaz enzimi eklendi ve karıştırıldı ve PZR makinesinde 50 °C'de 60 dakika ve 70 °C'de 15 dakika ısıtıldı, daha sonra da -20 °C'de analize kadar saklandı.

3.10. Gerçek Zamanlı PZR Protokolü

Gerçek zamanlı PZR cihazı Roche LC480 modeli olduğu için ROCHE gerçek zamanlı "syber green" boyası içeren PZR kit karışımı kullanıldı. Reaksiyonlar 20 µl toplam hacimde yapıldı. Bunun için 10 µl kit karışımı (Enzim, dNTP, Mg, tampon ve su), 0,2 µl cDNA, 0,2 µl ileri ve geri primerler (10 pmol/µl) ve 9,4 µl bidistile su olacak şekilde hazırlandı. Primerlerin optimizasyonu sonrası PZR şartları; ilk denatasyon, 5 dakika 95 °C, denaturasyon 30 saniye 95 °C, bağlanma 56 °C'de 40

saniye ve polimerizasyon 72 °C’de 40 saniye olarak oluşturuldu ve döngü sayısı 65 olarak kullanıldı.

VEGF gen ifadesinin analizi için kullanılan primerler PZR’de ilgili gen segmenti çoğaltıldığında 243 baz çiftlik büyüklük verecek 5’-*GCCCATGAAGTGGTGAAGTT-3’* (ileri) ve 5’-*TATGTGCTGGCTTTGGTGAG-3’* (geri) primerler şeklinde sentezlenirken, *GAPDH* (Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz) gen ifadesinin analizi için kullanılan primerler PZR’de ilgili gen segmenti çoğaltıldığında 346 baz çiftlik büyüklük verecek 5’-*CGTGGAGTCTACTGGCGTCT-3’* (ileri primer) ve 5’-*GGATGCAGGGATGATGTTCT-3’* (geri primer) şeklinde oluşturuldu (96).

3.11. İstatistiksel Analizler

İstatistik incelemede, SPSS for Windows 9.05 istatistik paket programı kullanıldı. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği öncelikle Shapiro-Wilk testiyle değerlendirildi ve verilerin normal dağılıma sahip olduğu tespit edildi ($P > 0,05$). Gen ifadelerinin ve hayvanların ağırlıklarının istatistikî karşılaştırılmaları bağımsız örneklem t testi ile yapıldı. P değerinin 0,05 den küçük olduğu değerler istatistikî olarak anlamlı kabul edildi.

Hayvanların açlık kan şekerlerinin istatistikî analizi tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Varyansların homojenliğine Levene testi ile bakıldı ve varyansların homojen olduğu tespit edildi ($P > 0,05$). Gruplar arası çoklu karşılaştırmalarda Tukey’in testi kullanıldı. P’nin 0,05 den küçük olduğu değerler istatistikî olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

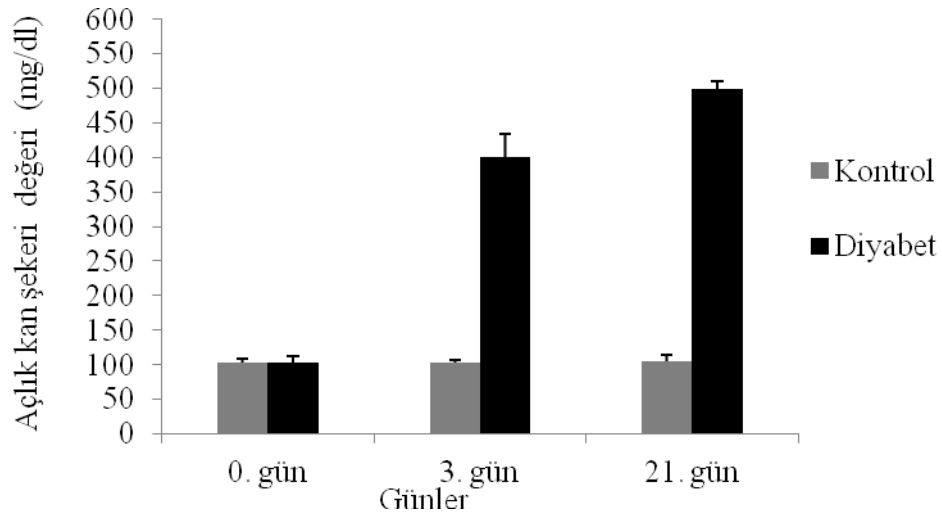
4.1. Hayvanların Açlık Kan Şekerleri Değerleri

Kontrol grubu sıçanların açlık kan şekerleri 0. gün, 3. gün ve 21. gün ile karşılaştırıldığında istatistikî olarak herhangi anlamlı bir fark tespit edilemedi ($P > 0,05$). Deneysel diyabet oluşturulan gruptaki hayvanlarda ise 0. gün, 3. gün ve 21. gün arasında istatistikî karşılaştırma yapıldığında açlık kan şekerlerinin diyabet grubunda istatistikî olarak anlamlı bir artış gösterdiği tespit edildi ($P < 0,05$) (Tablo 4. 1).

Tablo 4. 1. Gruplarda ölçülen açlık kan şekeri değerleri (mg/dl).

Günler	Gruplar (ort ± ss)	
	Kontrol (n=10)	Diyabet (n=7)
0.gün	103,2 ± 5,4 ^a	102,7 ± 9,1 ^a
3.gün	103,7 ± 2,9 ^a	400,9 ± 33,1 ^b
21.gün	105,3 ± 9,6 ^a	499,6 ± 11,3 ^c

Sütunlarda birbirinden farklı olan harfler istatistikî olarak birbirlerinden anlamlı farklılığı ifade eder ($P < 0,05$).



Şekil 4. 1. Kontrol ve diyabet grubu açlık kan şekerleri değeri.

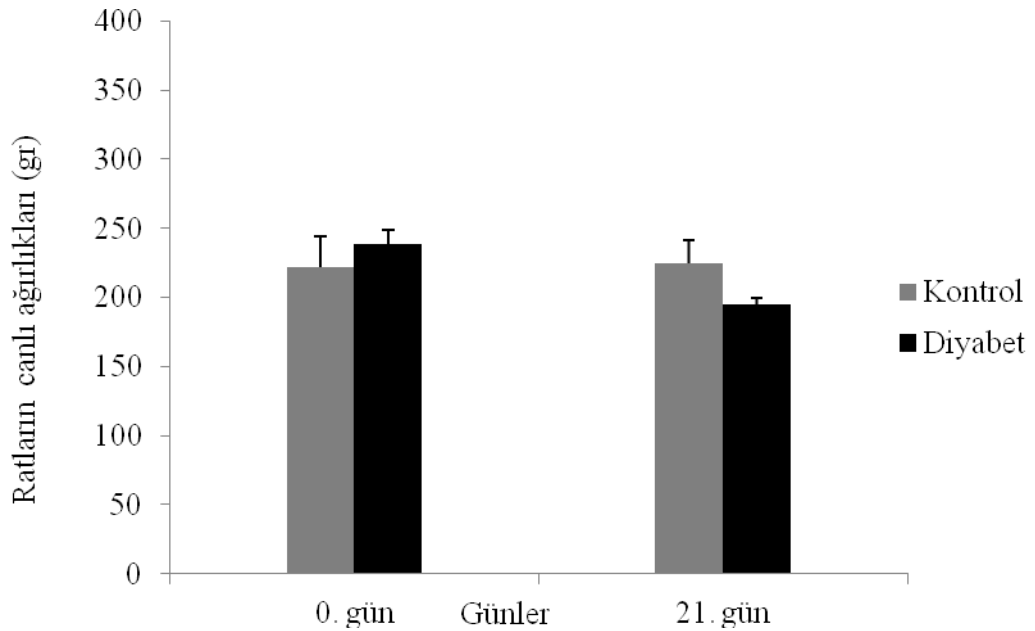
4.2. Hayvanların Ağırlık Değerleri

Kontrol grubu sıçanların vücut ağırlıkları 0. gün ve 21. gün ile karşılaştırıldığında istatistikî olarak herhangi anlamlı bir fark tespit edilemedi ($P > 0,05$). Deneysel diyabet oluşturulan gruptaki hayvanlarda ise 0. gün ve 21. gün vücut ağırlıkları arasında istatistikî karşılaştırma yapıldığında diyabet grubundaki hayvanların vücut ağırlıklarının 21. günde, 0. güne göre anlamlı bir azalma gösterdiği tespit edildi ($P < 0,05$) (Tablo 4. 2).

Tablo 4. 2. Gruplarda ölçülen sıçanların ağırlık değerleri (gr).

Günler	Gruplar (ort ± ss)	
	Kontrol (n=10)	Diyabet (n=7)
0.gün	222 ± 22,4 ^a	238,42 ± 9,9 ^a
21.gün	224,2 ± 17,3 ^a	195,14 ± 4,33 ^b

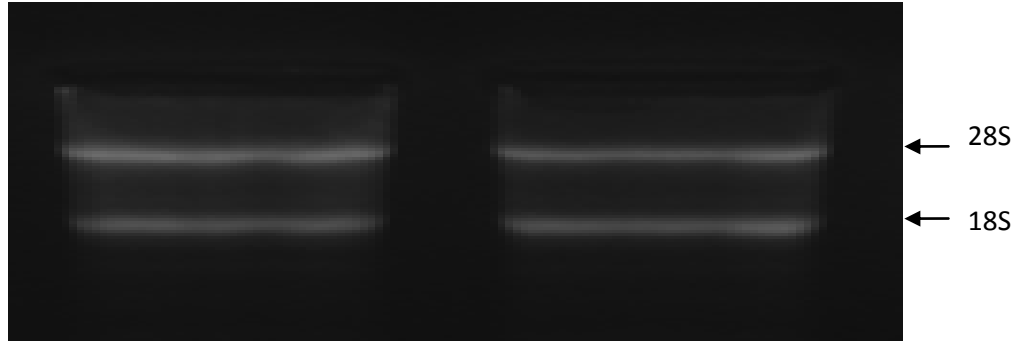
Sütunlarda birbirinden farklı olan harfler istatistikî olarak birbirlerinden anlamlı farklılığı ifade eder ($P < 0,05$).



Şekil 4. 2. Kontrol ve diyabet grubu sıçanların ağırlıkları.

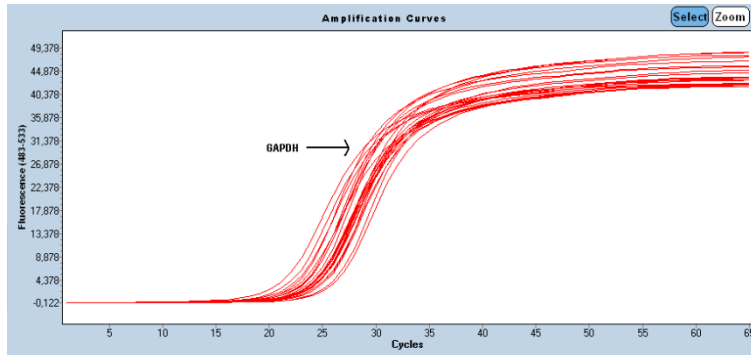
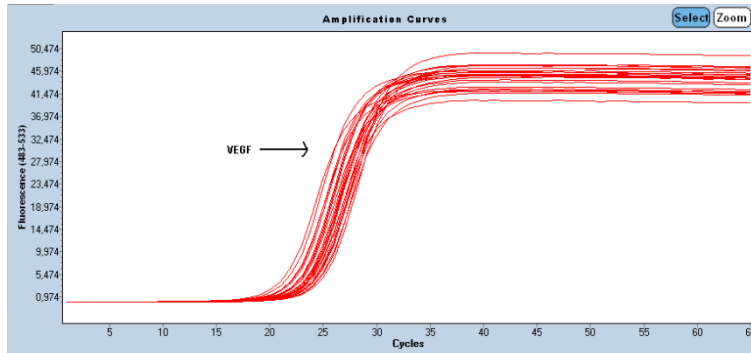
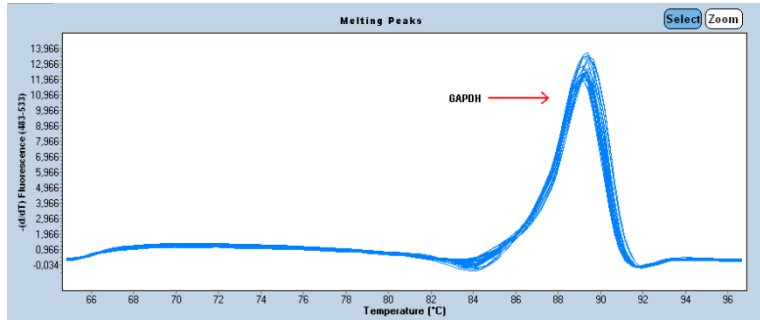
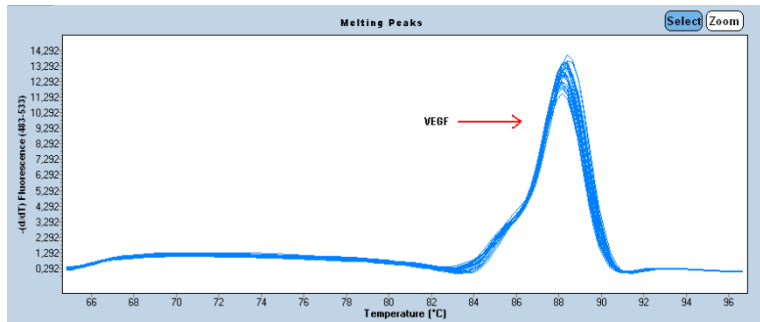
4.3. Moleküler Genetik Bulgular

RNA'lar saflaştırıldıktan sonra % 1'lik agaroz jele yüklenerek incelendi. Şekil 4. 3'te her gruptan bir tane seçilen saflaştırılmış RNA'ların % 1 agaroz jelde koşturulmuş resmi görülmektedir. Örneklerden saflaştırılan RNA'larda herhangi bir yıkılım yoktu ve 28S ve 18S'lik iki ribozomal bant büyük saflıkta elde edildi.



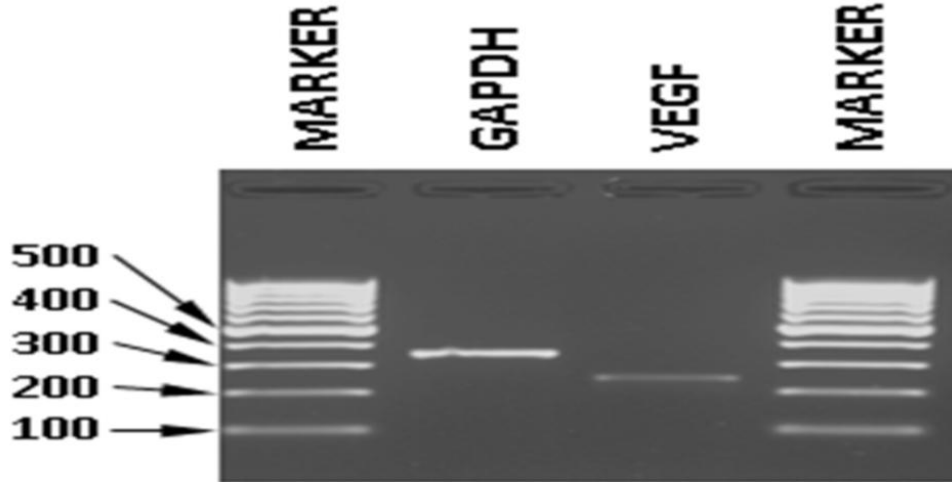
Şekil 4. 3. QIAGEN RNAeasy saflaştırma kiti ile karaciğer örneklerinden saflaştırılan toplam RNA rnekleri (% 1 agaroz jel).

GAPDH ve *VEGF*'lerin cDNA'ları gerçek zamanlı PZR'de çoğaltıldı ve gen ifadeleri analiz edildi (Şekil 4. 4).

A. *GAPDH*B. *VEGF*C. *GAPDH*D. *VEGF*

Şekil 4. 4. *VEGF* gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR analizleri. “SYBR Green” kimyası kullanılarak *GAPDH* (A) ve *VEGF* (B) mRNA’larından sentezlenen cDNA’ların gerçek zamanlı PZR ile çoğaltımı sırasındaki “çoğaltım eğrileri” ve *GAPDH* (C) ve *VEGF* (D) PZR ürünlerinin “erime eğrileri”.

PZR’de elde edilen DNA’lar % 1 Agaroz jeline yüklendi ve istenilen büyüklükte ürünlerin oluştuğu gözlemlendi (Şekil 4. 5).



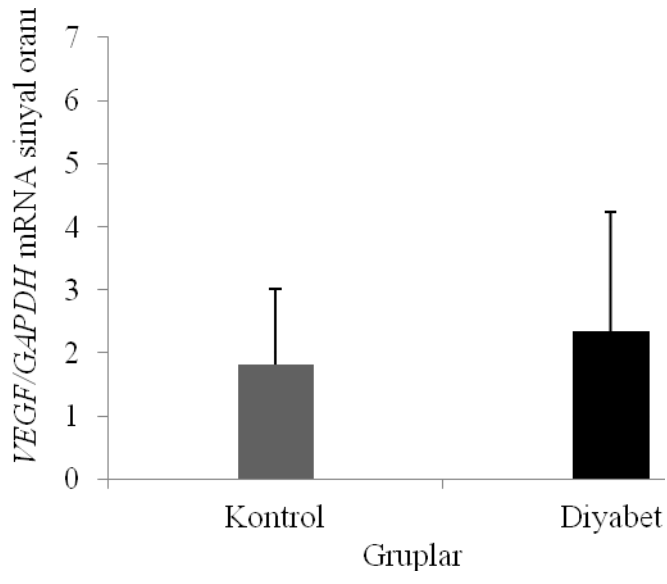
Şekil 4. 5. *GAPDH* ve *VEGF*’lerin cDNA’larının PZR’deki çoğaltımının agaroz jel elektroforezi. Kullanılan DNA Markeri 50 bp DNA Marker’dir (Fermentas).

Şekil 4. 6’da *GAPDH* ve *VEGF* DNA örneklerinin “gerçek zamanlı PZR” ile yapılan analiz sonuçları aynı grafikte görülmektedir.

Uygulama gruplarının mRNA seviyelerinin, *GAPDH* mRNA seviyelerine oranlanması sonucunda, *VEGF* mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilememiştir ($P > 0,05$).

Tablo 4. 3. Gruplarda ölçülen karaciğer *VEGF/GAPDH* mRNA seviyelerinin oranı.

Gruplar	<i>VEGF/GAPDH</i> (ort ± ss)
KONTROL (n=10)	1,81 ± 1,2
DİYABET (n=7)	2,34 ± 1,9



Şekil 4. 6. Gruplardaki karaciğer *VEGF/GAPDH* mRNA seviyelerinin oranı.

5. TARTIŞMA

Bu tezde, sıçanlarda streptozotosin ile oluşturulan deneysel diyabet modelinde karaciğer dokusundaki vasküler endotelial büyüme faktörünün gen ifadesine bakılarak, diyabetin *VEGF* gen ifadesi üzerine olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Karaciğer *VEGF* gen ifadesi hem kontrolde hem de deneysel diyabet grubunda herhangi bir farklılık göstermemiştir.

Yapılan diğer araştırmalarda çeşitli patolojik şartlarda *VEGF* gen ifadesinin arttığı, azaldığı veya değişmediği bildirilmiştir.

Örneğin *VEGF* gen ifadesi; sedef hastalığı, yüksek şekilde vaskülarize olmuş tümörler, lösemi, endometriozis ve üreme işlemlerinin çeşitli basamaklarında artmaktadır (97). *VEGF*, tip 2 DM komplikasyonlarında önemli rol oynayan güçlü bir anjiyogenik ve vasküler permeabilite faktörüdür. İlk kez 1994 yılında *VEGF*'nin diyabetik retinopati gelişiminde rol aldığı öne sürülmüştür ve proliferatif diyabetik retinopatili hastalarda *VEGF* düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir (98).

Tip 1 diyabetli hastalarda diyabetik retinopatinin gelişiminde *VEGF*'nin rolünün incelendiği bir araştırmada, diyabetik retinopatinin proliferatif safha gelişimi ile *VEGF*'nin varlığı arasında bir ilişki olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada, diyabetik retinopatinin proliferatif aktif fazında tip 1 DM'li hastaların serumunda *VEGF*'nin en yüksek düzeyde olduğu buna karşın sürecin inaktif fazında bu faktörün içeriğinin önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (99).

Normotansif diyabetik hastalarının serum *VEGF* düzeyi ile endotel disfonksiyonunun bir belirteci olan kapiller geçirgenliği arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir başka çalışmada, mikrovasküler permeabilitenin arttığı ve mikrovasküler permeabilite ile *VEGF* serum düzeyinin diferansiyel olarak ilişkili olduğu bulunmuştur (100).

VEGF, neovasküler membranlarda her zaman eksprese edilmektedir. Yapılan bir çalışmada, *VEGF* reseptör-bağlayıcı aktivitesinin proliferatif retinopatisi olan diyabetik hastalardan elde edilen vitreus aspiratlarında daha fazla miktarlarda bulunduğu görülmektedir. *VEGF*'nin retinal diyabetik neovaskülarizasyonda rol aldığı düşünülmektedir (101).

Diyabetik hastalardaki insülin tedavisinin de *VEGF* gen ifadesini etkilediği görülmektedir. Lu ve arkadaşları (102), in vitro ve in vivo olarak insülinin retinal *VEGF* gen ifadesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar, insülinin *VEGF* mRNA'sını arttırdığını ve artan *VEGF* gen ifadesi ile insan retinal pigment epitelyal hücrelerinde salgılanan protein düzeylerinin arttığını tespit etmişlerdir. İnsan retinal pigment epitelyalinde retinal *VEGF* gen ekspresyonunun artması yoğun insülin tedavisi gören diyabetli hastalarda retinopatinin geçici kötüleşmesine neden olabilmektedir.

Diyabetik komplikasyonların deneysel modellerinde, deney hayvanlarının böbreklerinde *VEGF* ve reseptörlerinin gen ifadesinin arttığı gösterilmektedir (103).

Hiperglisemi, insülin bağımsız glukoz alan böbrek dokusuna aşırı glukoz girişine neden olarak glukozun sorbitol yolağı ile aldoz redüktaz tarafından sorbitole çevrilmesine neden olur. Ancak sorbitol dehidrojenazın az olması ya da olmamasından dolayı sorbitol fruktoza dönüşemez ve birikir. Bu birikme nefropatiden sorumlu mekanizmalardan biridir. Dolayısıyla aldoz redüktaz inhibe edilerek glukozdan sorbitol oluşumunun kontrol edilmesine ihtiyaç vardır. Bunun nedenle böbrekte sorbitolün birikmesini önlemek için aldoz redüktaz inhibitörleri kullanılmaktadır. Sung ve arkadaşlarının (104), diyabetik sıçan gruplarında aldoz redüktaz inhibitörü fidarestat'ın *VEGF* gen ifadesini düzenlediği ve bu inhibitörün böbrekteki aşırı *VEGF* gen ifadesini ve albümin atılımını azaltarak diyabetik nefropatide önleyici etkisi olduğu bulunmuştur.

Diyabetik retinopati, hipertansiyon, mikroalbuminüri olan tip 1 diyabetli hastaların serum *VEGF* düzeyi, hipertansiyonu olmayan ancak retinopatisi ve mikroalbuminüri olan tip 1 DM'li hastalarinki ile karşılaştırıldığında *VEGF* düzeyinin anlamlı derecede daha yüksek olduğu ve böylece hipertansiyonun vasküler komplikasyonların ilerlemesinde en yüksek risk faktörü olduğu belirlenmiştir (105).

Kardiyovasküler hastalıklar, tip 2 diyabetik hastalarda erken ölümlerin önde gelen nedenidir. Tip 2 diyabet hastalarında yapılan çalışmada *VEGF*'deki gen polimorfizminin miyokard enfarktüsü ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (106).

Benzer şekilde *VEGF* genindeki bu polimorfizmlerin diyabetik retinopati ve nefropati ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir. Tip 2 diyabetik hastalarında *VEGF* genindeki 936C/T polimorfizminin plazma *VEGF* düzeyleri ile ilişkili olduğu ve

plazma VEGF seviyelerinin belirlenmesinde önemli bir faktör olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte retinopatisi olan tip 2 diyabet hastalarının plazma VEGF düzeylerinin retinopatisi olmayan diyabet hastalarından ve sağlıklı bireylerden daha yüksek olduğu bulunmuştur. İdrar VEGF düzeyi ise diyabetik nefropati ile ilişkili olduğu görülmüştür ve muhtemelen diyabetik böbrek hasarının belirlenmesinde bir gösterge olarak kullanılabilceği düşünülmektedir (107).

Hiperglisemi indüklü iskemiden kaynaklanan hipoksi *VEGF* ifadesini tetiklemektedir. Hipoksik şartlarda yapılan hücre kültürü çalışmalarında *VEGF* gen ifadesinin arttığı tespit edilmiştir (108).

VEGF seviyeleri tümörün hipoksik merkezinde de artmaktadır ki bu da tümör içerisinde yeni damarların gelişimine yol açabilmektedir. Bu önemli bir klinik bulgu olmuştur, çünkü tümör büyüyebilmek için anjiyogenezis adı verilen bir işlem ile daha önceden mevcut olan damarlardan yeni damarların oluşmasına ihtiyaç duyar. Tümörde anjiyogenik faktörlerin keşfedilmesi VEGF üzerindeki araştırmaları tetiklemiş ve kansere karşı savaşmada antianjiyogenez tedavisi için ilk kez moleküler bir hedef sağlamıştır (109).

Hipergliseminin çeşitli dokularda artan oksidatif stres meydana getiren reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olduğuna dair kabul edilebilir birçok delil mevcuttur. Hiperglisemi nefropati, retinopati, nöropati ve makro ve mikrovasküler hasarları kapsayan diyabetin başlıca komplikasyonlarının birçoğunun nedenidir. Reaktif oksijen türlerinin artmış üretiminden kaynaklanan oksidatif stres, diyabetin geç komplikasyonlarının patogenezinde anahtar bir rol oynamaktadır. Nükleer Faktör Kappa β (*NF-K β*), *VEGF*'nin de içinde yer aldığı birçok büyüme faktörünün genlerinin büyük bir çoğunluğunun ifadesini düzenler. *VEGF*'nin de dahil olduğu birçok gen ürünü de *NF-K β* tarafından düzenlenir (95).

Ayrıca hipoksi, hiperglisemi, vazopressor hormonlar, çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri *VEGF* transkripsiyonunu arttırmaktadır (110).

Hipoksik şartlar, *VEGF* geninin promotor bölgesinde hipoksi cevap bölgesine bağlandığı bilinen bir transkripsiyon faktörü olan hipoksi indüklenebilir faktörün üretimine yol açar (111).

Hiperglisemi, *TGF- β* aracılığıyla *VEGF*'nin aşırı ifadesini dolaylı olarak indükleyebilmektedir. Stark ve arkadaşları (112), yüksek glukoz seviyesiyle vasküler düz kas hücrelerinde *TGF- β* 'nin ifadesinin arttığını bildirmişlerdir.

Yapılan diğer araştırmalarda *VEGF* gen ifadesinin çeşitli patolojik şartlarda azaldığı bildirilmiştir. Diyabetik yaralarda da *VEGF* önemli rol oynamaktadır. Diyabet ile birlikte yara iyileşme sürecinde bozulmalar meydana gelmektedir. Bu süreçte yara iyileşmesinde önemli rol oynayan *VEGF*'nin salınımının azaldığı görülmektedir. Diyabetik farelerde yapılan bir çalışmada, *VEGF* ve fibroblast büyüme faktörü 4 (*FGF4*) geni kombinasyonunun transferi yara iyileşmesini hızlandırdığı görülmektedir ve buna dayanarak *VEGF-A*'nın reseptörü *VEGFR-1*'in *FGF4* aracılı upregülasyonu ile yüksek glukoz konsantrasyonunda diyabetik fibroblastların göçünü arttırdığı düşünülmektedir (113).

Bununla birlikte tip 1 diyabetteki insülin tedavisinin de serum *VEGF* düzeylerini etkilediği gösterilmiştir. Chiarelli ve arkadaşları (114), puberte öncesi ve puberte dönemindeki tip 1 DM'li çocuklarda *VEGF* serum konsantrasyonunun arttığını, glisemik kontrolün serum *VEGF* düzeylerini etkilediğini ve serum *VEGF* konsantrasyonundaki belirgin bir artışın mikrovasküler komplikasyonların şiddeti ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

VEGF, vasküler anjiyogeneze ve dolayısıyla kollateral damar oluşumunda da önemli bir rol oynar. Yapılan bir araştırmada, kardiyak *VEGF* ve transforme edici büyüme faktörü beta 1 (*TGF- β 1*) konsantrasyonunun koroner kollaterallerin gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (115).

Azalmış *VEGF* diyabette anjiyogenezin yetersizliğinde işe karışabilmektedir. Kampfre ve arkadaşları (116), insan diyabetik dermal yaralarında *VEGF* protein ifadesinin oldukça azalmış olduğunu tespit etmişlerdir. *VEGF* mRNA'sında azalma tam olarak gelişmemiş diyabette insülin direnci ile birlikte karşımıza çıkmaktadır. Miyokardiyumdaki *VEGF* ifadesinin insuline bağlı olduğu rapor edilmiştir (117).

Nitrik Oksit (NO), *VEGF*'nin anjiyogenik etkileşimlerinde önemli rol oynamaktadır. Büyüme faktörleri tarafından anjiyogenezin indüklenmesi Nitrik oksit sentaz'ın inhibitörleri tarafından bloke edilebilmektedir (118). *VEGF* salınımının NO salınımını arttırdığının görülmesi aslında *VEGF*'nin vasopermeabilityyi artırıcı etkisini NO aracılığıyla yaptığını düşündürmektedir.

Unilateral hindlimb iskemi (dört ayaklı hayvanların arka ekstremitelerinden birindeki iskemi) modeli çalışmasında *VEGF* mRNA ve proteininde azalma olduğu bildirilmiştir (119). İskelet kasındaki *VEGF* gen ifadesinin ve proteinin azalması insüline bağımlı bu dokuların diyabetle ortaya çıkan insülin direncinden kaynaklandığını düşündürmektedir.

Tip 2 diyabet, *VEGF* sinyalizasyonunun azalması ile birlikte anjiyogenezin bozulmasına neden olur. Bununla birlikte, *VEGF* ligandının varlığı sınırlayıcı faktör olmayabilir. *VEGF* sinyalizasyonunun bozulması diyabetiklerde iskemi sonrası görülen kolleteral kan damarı oluşumunu azaltmaktadır. Kivela ve arkadaşları tarafından (120), diyabetik farelerin arka bacak iskemik kaslarında *VEGF* ligandının artmış olmasına rağmen *VEGF* sinyalizasyonunun azaldığı gösterilmiştir. *VEGF* ekspresyonunu arttıran transkripsiyon faktörünü kodlayan gen (*ZFP-VEGF*) transferinin diyabetik farelere yapılması ile fare iskemik kaslarında *VEGF* ligandının dahada artmasını ve bozulmuş *VEGF* sinyalizasyonunun düzelmesini sağladığı gösterilmiştir. *VEGF* sinyalizasyonunun düzelmesi ile bu kaslardaki doku perfüzyonun iyileşmesi, hücre çoğalmasının artması ve apoptozisin azalmasını sağlamıştır (120).

Bazı araştırmalar aynen bizim çalışmamızda olduğu gibi retinopatili hastalarda *VEGF* gen ifadesinin değişmediğini bildirmiştir. Örneğin; Gerhardinger ve arkadaşları (121), diyabetik ve diyabetik olmayan hastaların retinasındaki *VEGF* gen ifadesi ve proteinin lokalizasyonunu araştırdıkları çalışmalarında, normal insan retina hücrelerinde *VEGF*'nin yapısal olarak ifade edildiği ve ayrık sinir hücrelerinde çoğunlukla iç nükleer ve ganglion hücre tabakalarında ve dış pleksiform tabakasında lokalize olduğunu tespit etmişler ve nonproliferatif diyabetik retinopatisi olan hastalarda *VEGF* gen ifadesinde bir fark gözlememişlerdir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yukarıda tartıştığımız literatürlerde çeşitli patolojik şartlarda *VEGF* gen ifadesi artabilmekte veya azalabilmekte veya hiç değişmeden kalabilmektedir. Araştırmamızda elde edilen bulgulara göre deneysel diyabetin karaciğer dokusundaki *VEGF* gen ifadesinin seviyesinde bir değişikliğe yol açmadığı görülmüştür. Karaciğer karbonhidrat metabolizması üzerinde merkezi bir rol oynar. Kanda normal glukoz seviyesinin korunması ve sürekli glukoz ihtiyacı olan dokulara glukozu sağlaması normal görevidir. Glukoz homeostazisindeki bu merkezi rolü glukoz intoleransında karaciğerin ne kadar etkileneceğinin göstergesidir. Diyabet hastalığındaki patoloji de keza glukoz homeostazisindeki bozukluk olduğundan dolayı birbirini primer olarak etkilemektedirler.

Diyabetin komplikasyonlarından olan retinopati ve nefropati üzerinde yapılan çalışmaların çoğunda *VEGF* artışının olduğu görülmüştür. Bu komplikasyonların önlenmesi için anti *VEGF* preparatları klinikte kullanım alanı bulmuştur. Diyabetin retinopati ve nefropati üzerindeki etkisi incelenirken, daha çok anjiyopatide *VEGF*'nin anjiyogenezi uyarıcı ve damar geçirgenliğini arttırıcı etkisinden bahsedilmiştir. Temel patolojinin ise anjiyogenez üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir. Diyabet hastalığı bu komplikasyonlardan başka karaciğerde de birçok komplikasyon ve hastalığa yol açmaktadır.

Araştırmamızda sıçanlar 21 gün süre ile yüksek kan şekere düzeyine maruz kaldılar. Bu sürede karaciğer *VEGF* gen ifadesinde herhangi bir değişikliğe rastlanmadı. Yukarıda tartıştığımız literatür bilgisine göre diyabetin major komplikasyonları daha çok kardiyovasküler sistem, böbrek ve göz üzerinde etkili olmaktadır. Karaciğer dokusunda ise uzun süreli diyabete maruz kalma kendini siroz, kanser, yağlanma gibi hastalıklarla bu organda göstermektedir. Diyabetik şartların patolojisinde karaciğer *VEGF* aşırı gen ifadesi, karaciğerde hepatik fibrosise neden olabilmekte ve bu da diyabetik şartların patolojisi ile oldukça yakından ilişkili bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır (122).

Kolon kanseri olan ve karaciğer metastazlı kansere sahip hastalarda yapılan bir çalışmada karaciğer kanserinde *VEGF* gen ifadesinin artmış olduğu bildirilmiştir (123). Sato ve arkadaşları (122), diyabetin başlıca karakteristiği olan yüksek kan

şekerinin çeşitli dokularda ilerlemiş glikasyon son ürünlerinin oluşumunu hızlandırdığı düşüncesinden yola çıkarak sıçanları 8 hafta boyunca ilerlemiş glikasyon ürünleri açısından zengin olan bir diyet ile beslemişler ve kontrole göre bu diyetle beslenen sıçanların karaciğer *VEGF* gen ifadesinin anlamlı bir şekilde yükseldiğini tespit etmişlerdir.

Araştırmamızda *VEGF* gen ifadesinin karaciğerde değişmemiş olmasının nedeni diyabete maruz kalma süresi ile alakalı olabilir. Deneyin daha uzun süreli devam ettirilmesi ve böylece daha yüksek kan şekerine daha uzun süre maruz kalma, karaciğer *VEGF* gen ifadesini değiştirebilecek bir etki gösterebilirdi.

KAYNAKLAR

1. Ozturk, Y., Altan, V. M., and Yildizoglu-Ari, N. (1996). Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacol Rev*, 48, 69-112.
2. Rao, B. K., Kesavulu, M. M., Giri, R., and Appa Rao, C. (1999). Antidiabetic and hypolipidemic effects of *Momordica cymbalaria* Hook. fruit powder in alloxan-diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 67, 103-9.
3. Herman, W. H. (2007). Diabetes epidemiology: guiding clinical and public health practice: the Kelly West Award Lecture, 2006. *Diabetes Care*, 30, 1912-9.
4. Gavin, J. R., Alberti, K.G.M.M., Davidson, M. B., DeFronzo, R. A., Drash, A., Gabbe, S. G., Genuth, S., Harris, M. I., Kahn, R., Keen, H., Knowler, W. C., Lebovitz, H. Maclaren, N. K., Palmer, J. P., Raskin, P., Rizza, R. A., and Stern, M. P. (2003). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 26, 5-20.
5. Pushparaj, P., Tan, C. H., and Tan, B. K. (2000). Effects of *Averrhoa bilimbi* leaf extract on blood glucose and lipids in streptozotocin-diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 72, 69-76.
6. Mironidou-Tzouveleki, M., Tsartsalis, S., and Tomos, C. (2010). Vascular endothelial growth factor (VEGF) in the pathogenesis of diabetic nephropathy of type 1 diabetes mellitus. *Curr Drug Targets*, 12, 107-14.
7. Martin, A., Komada, M. R., and Sane, D. C. (2003). Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. *Med Res Rev*, 23, 117-45.
8. Bhisitkul, R. B. (2006). Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments. *Br J Ophthalmol*, 90, 1542-7.
9. Lineaweaver, W. C., Lei, M. P., Mustain, W., Oswald, T. M., Cui, D., and Zhang, F. (2004). Vascular endothelium growth factor, surgical delay, and skin flap survival. *Ann Surg*, 239, 866-75.
10. Lu, M., and Adamis, A. P. (2002). Vascular endothelial growth factor gene regulation and action in diabetic retinopathy. *Ophthalmol Clin North Am*, 15, 69-79.

11. Mochida, S., Ishikawa, K., Inao, M., Shibuya, M., and Fujiwara, K. (1996). Increased expressions of vascular endothelial growth factor and its receptors, flt-1 and KDR/flk-1, in regenerating rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 226, 176-9.
12. Gürbüz, H. (2004). Karaciğerin damar sistemi. *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 21, 31-5.
13. Anadol, N. (2007). Karaciğer lezyonlarının benign malign ayrımında PET benzeri kontrasta sahip MR difüzyon görüntülerinin değeri. Uzmanlık Tezi, Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.
14. Shao, J., Qiao, L., Janssen, R. C., Pagliassotti, M., and Friedman, J. E. (2005). Chronic hyperglycemia enhances PEPCCK gene expression and hepatocellular glucose production via elevated liver activating protein/liver inhibitory protein ratio. *Diabetes*, 54, 976-84.
15. Levinthal, G. N., Tavill, A.S. (1999). Liver Disease and Diabetes Mellitus. *Clinical Diabetes*, 17(2).
16. Keembiyehetty, C., Augustin, R., Carayannopoulos, M. O., Steer, S., Manolescu, A., Cheeseman, C. I., and Moley, K. H. (2006). Mouse glucose transporter 9 splice variants are expressed in adult liver and kidney and are up-regulated in diabetes. *Mol Endocrinol*, 20, 686-97.
17. Sadi, G., and Guray, T. (2009). Gene expressions of Mn-SOD and GPx-1 in streptozotocin-induced diabetes: effect of antioxidants. *Mol Cell Biochem*, 327, 127-34.
18. Eyries, M., Collins, T., and Khachigian, L. M. (2004). Modulation of growth factor gene expression in vascular cells by oxidative stress. *Endothelium*, 11, 133-9.
19. MacNalty, A. (1964). History of Diabetes. *British Medical Journal*, 2, 112.
20. Hatemi, H. (1988). *Diabetes Mellitus Tanı, Klinik ve Tedavi*. İstanbul: Yüce Yayınları.
21. Ahmed, A. M. (2002). History of diabetes mellitus. *Saudi Med J*, 23, 373-8.
22. Hatemi, H. (1996). Diabetes Mellitusun Tarihçesi. *Aktuel Tıp Dergisi*, 1, 497-99.

23. Allman, T. (2008). *Genes&Disease Diabetes*. USA, New York: Chelsea House Publishers.
24. Zargar, A. H., Wani, A. I., Masoodi, S. R., Bashir, M. I., Laway, B. A., Gupta, V. K., and Wani, F. A. (2009). Causes of mortality in diabetes mellitus: data from a tertiary teaching hospital in India. *Postgrad Med J*, 85, 227-32.
25. Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., and King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27, 1047-53.
26. Satman, I., Yilmaz, T., Sengul, A., Salman, S., Salman, F., Uygur, S., Bastar, I., Tutuncu, Y., Sargin, M., Dinccag, N., Karsidag, K., Kalaca, S., Ozcan, C., and King, H. (2002). Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). *Diabetes Care*, 25, 1551-6.
27. Braunwald, E., Fauci, A.S., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L. (2001). *Harrison's Principles of Internal Medicine* (Y.Sağlık, Çev.) İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. (2004).
28. Hober, D. (2010). and Sane, F., Enteroviral pathogenesis of type 1 diabetes. *Discov Med*, 10, 151-60.
29. Ei Wafai, R. J., Chmaisse, H. N., Makki, R. F., and Fakhoury, H. (2011). Association of HLA class II alleles and CTLA-4 polymorphism with type 1 diabetes. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 22, 273-81.
30. Park, Y., and Eisenbarth, G. S. (2001). Genetic susceptibility factors of Type 1 diabetes in Asians. *Diabetes Metab Res Rev*, 17, 2-11.
31. Büyüköztürk, K. (2007). *İç Hastalıkları*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
32. Haller, M. J., Atkinson, M. A., and Schatz, D. (2005). Type 1 diabetes mellitus: etiology, presentation, and management. *Pediatr Clin North Am*, 52, 1553-78.
33. Hamalainen, A. M., and Knip, M. (2002). Autoimmunity and familial risk of type 1 diabetes. *Curr Diab Rep*, 2, 347-53.
34. Bell, G. I., Xiang, K., Horita, S., Sanz, N., and Karam, J. H. (1987). The molecular genetics of diabetes mellitus. *Ciba Found Symp*, 130, 167-83.

35. Delepine, M., Pociot, F., Habita, C., Hashimoto, L., Froguel, P., Rotter, J., Cambon-Thomsen, A., Deschamps, I., Djoulah, S., Weissenbach, J., Nerup, J., Lathrop, M., and Julier, C. (1997). Evidence of a non-MHC susceptibility locus in type I diabetes linked to HLA on chromosome 6. *Am J Hum Genet*, *60*, 174-87.
36. Hitman, G. A., and Niven, M. J. (1989). Genes and diabetes mellitus. *Br Med Bull*, *45*, 191-205.
37. Nolan, C. J., Damm, P., and Prentki, M. (2011). Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet*, *378*, 169-81.
38. Weyer, C., Bogardus, C., Mott, D. M., and Pratley, R. E. (1999). The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest*, *104*, 787-94.
39. Leonardi, O., Mints, G., and Hussain, M. A. (2003). Beta-cell apoptosis in the pathogenesis of human type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol*, *149*, 99-102.
40. Gerich, J. E. (2003). Contributions of insulin-resistance and insulin-secretory defects to the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Mayo Clin Proc*, *78*, 447-56.
41. Smushkin, G., and Vella, A. (2010). Genetics of type 2 diabetes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, *13*, 471-7.
42. McCarthy, M. I. (2011). The importance of global studies of the genetics of type 2 diabetes. *Diabetes Metab J*, *35*, 91-100.
43. Dode, M. A., and dos Santos, I. S. (2009). Non classical risk factors for gestational diabetes mellitus: a systematic review of the literature. *Cad Saude Publica*, *25*(3), 341-59.
44. Karagiannis, T., Bekiari, E., Manolopoulos, K., Paletas, K., and Tsapas, A. (2010). Gestational diabetes mellitus: why screen and how to diagnose. *Hippokratia*, *14*, 151-4.
45. Serlin, D. C., and Lash, R. W. (2009). Diagnosis and management of gestational diabetes mellitus. *Am Fam Physician*, *80*, 57-62.

46. Kaaja, R., and Ronnema, T. (2008). Gestational diabetes: pathogenesis and consequences to mother and offspring. *Rev Diabet Stud*, 5, 194-202.
47. Shin, J. A., and Yoon, K. H. (2010). The effect of parental transmission of diabetes on the development of gestational diabetes mellitus. *Korean J Intern Med*, 25, 237-8.
48. Kim, C. (2010). Gestational diabetes: risks, management, and treatment options. *Int J Womens Health*, 2, 339-51.
49. Kim, C. (2010). Gestational diabetes mellitus and risk of future maternal cardiovascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 8, 1639-41.
50. Bloomgarden, Z. T. (2010). Gestational diabetes mellitus and obesity. *Diabetes Care*, 33, e60-5.
51. Lambrinoudaki, I., Vlachou, S. A., and Creatsas, G. (2010). Genetics in gestational diabetes mellitus: association with incidence, severity, pregnancy outcome and response to treatment. *Curr Diabetes Rev*, 6, 393-9.
52. Watanabe, R. M., Black, M. H., Xiang, A. H., Allayee, H., Lawrence, J. M., and Buchanan, T. A. (2007). Genetics of gestational diabetes mellitus and type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 30(2), 134-40.
53. Velho, G., and Froguel, P. (1998). Genetic, metabolic and clinical characteristics of maturity onset diabetes of the young. *Eur J Endocrinol*, 138, 233-9.
54. Nyunt, O., Wu, J. Y., McGown, I. N., Harris, M., Huynh, T., Leong, G. M., Cowley, D. M., and Cotterill, A. M. (2009). Investigating maturity onset diabetes of the young. *Clin Biochem Rev*, 30, 67-74.
55. Ellard, S., Bellanne-Chantelot, C., and Hattersley, A. T. (2008). Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia*, 51, 546-53.
56. Xu, J. Y., Dan, Q. H., Chan, V., Wat, N. M., Tam, S., Tiu, S. C., Lee, K. F., Siu, S. C., Tsang, M. W., Fung, L. M., Chan, K. W., and Lam, K. S. (2005). Genetic and clinical characteristics of maturity-onset diabetes of the young in Chinese patients. *Eur J Hum Genet*, 13, 422-7.
57. Wang, H., Hagenfeldt-Johansson, K., Otten, L. A., Gauthier, B. R., Herrera, P. L., and Wollheim, C. B. (2002). Experimental models of transcription

- factor-associated maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes*, 51(3), 333-42.
58. Kim, S. H., Ma, X., Weremowicz, S., Ercolino, T., Powers, C., Mlynarski, W., Bashan, K. A., Warram, J. H., Mychaleckyj, J., Rich, S. S., Krolewski, A. S., and Doria, A. (2004). Identification of a locus for maturity-onset diabetes of the young on chromosome 8p23. *Diabetes*, 53, 1375-84.
 59. Deshpande, A. D., Harris-Hayes, M., and Schootman, M. (2008). Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Phys Ther*, 88, 1254-64.
 60. Henry, W. L., Jr. (1987). The complications of diabetes mellitus. *J Natl Med Assoc*, 79, 677-80.
 61. Olansky, L. (2004). Advances in diabetes for the millennium: chronic microvascular complications of diabetes. *MedGenMed*, 6(3), 14.
 62. Müftüoğlu, E. (1990). *İç Hastalıkları*. Diyarbakır: Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları.
 63. İliçin, G., Biberöğlu, K., Süleymanlar, G., Ünal, S. (2003). *İç Hastalıkları (Cilt:1)*. Ankara: Güneş Kitabevi.
 64. Kengne, A. P., Amoah, A. G., and Mbanya, J. C. (2005). Cardiovascular complications of diabetes mellitus in sub-Saharan Africa. *Circulation*, 112, 3592-601.
 65. Yuan, S., Liu, Y., and Zhu, L. (1999). Vascular complications of diabetes mellitus. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 26, 977-8.
 66. Vinik, A. I., and Vinik, E. (2003). Prevention of the complications of diabetes. *Am J Manag Care*, 9(3), 63-80.
 67. Rich, S. S. (2006). Genetics of diabetes and its complications. *J Am Soc Nephrol*, 17, 353-60.
 68. Shakil, A., Church, R. J., and Rao, S. S. (2008). Gastrointestinal complications of diabetes. *Am Fam Physician*, 77, 1697-702.
 69. Guay, A. T. (2001). Sexual dysfunction in the diabetic patient. *Int J Impot Res*, 13(5), 47-50.

70. Parisi, M. C., Giannella, D., Fernandes, T. D., Rezende, K. F., and Nery, M. (2011). Diabetic foot screening: study of a 3000 times cheaper instrument. *Clinics (Sao Paulo)*, 66, 1105-7.
71. Pendsey, S. P. (2010). Understanding diabetic foot. *Int J Diabetes Dev Ctries*, 30, 75-9.
72. Ferrara, N. (2009). Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29, 789-91.
73. Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M. S., Wildiers, H., Van Oosterom, A. T., and De Bruijn, E. A. (2004). Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev*, 56, 549-80.
74. Vincenti, V., Cassano, C., Rocchi, M., and Persico, G. (1996). Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*, 93, 1493-5.
75. Tammela, T., Enholm, B., Alitalo, K., and Paavonen, K. (2005). The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res*, 65, 550-63.
76. Mac Gabhann, F., and Popel, A. S. (2008). Systems biology of vascular endothelial growth factors. *Microcirculation*, 15, 715-38.
77. Ruiz de Almodovar, C., Lambrechts, D., Mazzone, M., and Carmeliet, P. (2009). Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system. *Physiol Rev*, 89, 607-48.
78. Xu, X., Chen, P., Zheng, Q., Wang, Y., and Chen, W. (2011). Effect of pioglitazone on diabetic nephropathy and expression of HIF-1alpha and VEGF in the renal tissues of type 2 diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract*, 93, 63-9.
79. Ribatti, D., Vacca, A., and Presta, M. (2000). The discovery of angiogenic factors: a historical review. *Gen Pharmacol*, 35, 227-31.
80. Tavakkoly-Bazzaz, J., Amoli, M. M., Pravica, V., Chandrasecaran, R., Boulton, A. J., Larijani, B., and Hutchinson, I. V. (2010). VEGF gene polymorphism association with diabetic neuropathy. *Mol Biol Rep*, 37, 3625-30.

81. Ribatti, D. (2005). The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *Br J Haematol*, 128, 303-9.
82. Ng, Y. S., Krilleke, D., and Shima, D. T. (2006). VEGF function in vascular pathogenesis. *Exp Cell Res*, 312, 527-37.
83. Rosenstein, J. M., Krum, J. M., and Ruhrberg, C. (2010). VEGF in the nervous system. *Organogenesis*, 6, 107-14.
84. Buraczynska, M., Ksiazek, P., Baranowicz-Gaszczyk, I., and Jozwiak, L. (2007). Association of the VEGF gene polymorphism with diabetic retinopathy in type 2 diabetes patients. *Nephrol Dial Transplant*, 22, 827-32.
85. Georgescu, A. (2011). Vascular dysfunction in diabetes: The endothelial progenitor cells as new therapeutic strategy. *World J Diabetes*, 2, 92-7.
86. Karalliedde, J., and Gnudi, L. (2011). Endothelial factors and diabetic nephropathy. *Diabetes Care*, 34(2), 291-6.
87. Nakamura, S., Iwasaki, N., Funatsu, H., Kitano, S., and Iwamoto, Y. (2009). Impact of variants in the VEGF gene on progression of proliferative diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 247, 21-6.
88. Ciulla, T. A., Amador, A. G., and Zinman, B. (2003). Diabetic retinopathy and diabetic macular edema: pathophysiology, screening, and novel therapies. *Diabetes Care*, 26, 2653-64.
89. DEMİRCİ, U. (2006). Karaciğer Hastalıklarında Vasküler Endotel Büyüme Faktör (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) Düzeyleri. Uzmanlık tezi, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.
90. Kotil, T. (2006). Deneysel diyabetli sıçanlarda yara iyileşmesinin histolojik ve ince yapı olarak incelenmesi. Yüksek Lisans tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.
91. Romano Di Peppe, S., Mangoni, A., Zambruno, G., Spinetti, G., Melillo, G., Napolitano, M., and Capogrossi, M. C. (2002). Adenovirus-mediated VEGF(165) gene transfer enhances wound healing by promoting angiogenesis in CD1 diabetic mice. *Gene Ther*, 9, 1271-7.
92. Lerman, O. Z., Galiano, R. D., Armour, M., Levine, J. P., and Gurtner, G. C. (2003). Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in

- migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. *Am J Pathol*, 162, 303-12.
93. Kivela, R., Silvennoinen, M., Touvra, A. M., Lehti, T. M., Kainulainen, H., and Vihko, V. (2006). Effects of experimental type 1 diabetes and exercise training on angiogenic gene expression and capillarization in skeletal muscle. *FASEB J*, 20, 1570-2.
 94. Jarrett, R. J. (1989). Cardiovascular disease and hypertension in diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev*, 5, 547-58.
 95. Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., and Grodsky, G. M. (2002). Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev*, 23, 599-622.
 96. Wang, X. T., Liu, P. Y., and Tang, J. B. (2006). PDGF gene therapy enhances expression of VEGF and bFGF genes and activates the NF-kappaB gene in signal pathways in ischemic flaps. *Plast Reconstr Surg*, 117, 129-37.
 97. Aiello, L. P., and Wong, J. S. (2000). Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications. *Kidney Int Suppl*, 77, 113-9.
 98. Szaflik, J. P., Wysocki, T., Kowalski, M., Majsterek, I., Borucka, A. I., Blasiak, J., and Szaflik, J. (2008). An association between vascular endothelial growth factor gene promoter polymorphisms and diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 246, 39-43.
 99. Ermakova, N. A., Syrodeeva, O. N., Antsiferov, M. B., Balatskaia, N. V., and Krasnova, L. B. (2008). Role of vascular endothelial growth factor in the development of diabetic retinopathy in patients with type 1 diabetes mellitus., *Vestn Oftalmol*, 124, 25-8.
 100. Brausewetter, F., Jehle, P. M., Jung, M. F., Boehm, B. O., Brueckel, J., Hombach, V., and Osterhues, H. H. (2001). Microvascular permeability is increased in both types of diabetes and correlates differentially with serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Horm Metab Res*, 33, 713-20.
 101. Malecaze, F., Clamens, S., Simorre-Pinatel, V., Mathis, A., Chollet, P., Favard, C., Bayard, F., and Plouet, J. (1994). Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth

- factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*, *112*, 1476-82.
102. Lu, M., Amano, S., Miyamoto, K., Garland, R., Keough, K., Qin, W., and Adamis, A. P. (1999). Insulin-induced vascular endothelial growth factor expression in retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *40*, 3281-6.
 103. Cooper, M. E., Vranes, D., Youssef, S., Stacker, S. A., Cox, A. J., Rizkalla, B., Casley, D. J., Bach, L. A., Kelly, D. J., and Gilbert, R. E. (1999). Increased renal expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in experimental diabetes. *Diabetes*, *48*, 2229-39.
 104. Sung, J. K., Koh, J. H., Lee, M. Y., Kim, B. H., Nam, S. M., Kim, J. H., Yoo, J. H., Kim, S. H., Hong, S. W., Lee, E. Y., Choi, R., and Chung, C. H. (2010). Aldose reductase inhibitor ameliorates renal vascular endothelial growth factor expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Yonsei Med J*, *51*, 385-91.
 105. Zorena, K., Mysliwska, J., Mysliwiec, M., Rybarczyk-Kapturska, K., Malinowska, E., Wisniewski, P., and Raczynska, K. (2010). Association between vascular endothelial growth factor and hypertension in children and adolescents type I diabetes mellitus. *J Hum Hypertens*, *24*, 755-62.
 106. Petrovic, D., Verhovc, R., Globocnik Petrovic, M., Osredkar, J., and Peterlin, B. (2007). Association of vascular endothelial growth factor gene polymorphism with myocardial infarction in patients with type 2 diabetes. *Cardiology*, *107*, 291-5.
 107. Kim, H. W., Ko, G. J., Kang, Y. S., Lee, M. H., Song, H. K., Kim, H. K., and Cha, D. R. (2009). Role of the VEGF 936 C/T polymorphism in diabetic microvascular complications in type 2 diabetic patients. *Nephrology (Carlton)*, *14*, 681-8.
 108. Wu, W. C., Kao, Y. H., Hu, P. S., and Chen, J. H. (2007). Geldanamycin, a HSP90 inhibitor, attenuates the hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression in retinal pigment epithelium cells in vitro. *Exp Eye Res*, *85*, 721-31.
 109. Ruhrberg, C. (2008). *VEGF in development*. USA, New York: Landes Bioscience and Springer Science+Business Media.

110. Williams, B. (1998). A potential role for angiotensin II-induced vascular endothelial growth factor expression in the pathogenesis of diabetic nephropathy?. *Miner Electrolyte Metab*, 24, 400-5.
111. Freedman, S. B., and Isner, J. M. (2002). Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease. *Ann Intern Med*, 136, 54-71.
112. Stark, J., Baffour, R., Garb, J. L., Kaufman, J., Berman, J., Rhee, S., Norris, M. A., and Friedmann, P. (1998). Basic fibroblast growth factor stimulates angiogenesis in the hindlimb of hyperglycemic rats. *J Surg Res*, 79, 8-12.
113. Jazwa, A., Kucharzewska, P., Leja, J., Zagorska, A., Sierpniowska, A., Stepniowski, J., Kozakowska, M., Taha, H., Ochiya, T., Derlacz, R., Vahakangas, E., Yla-Herttuala, S., Jozkowicz, A., and Dulak, J. (2010). Combined vascular endothelial growth factor-A and fibroblast growth factor 4 gene transfer improves wound healing in diabetic mice. *Genet Vaccines Ther*, 8, 6.
114. Chiarelli, F., Spagnoli, A., Basciani, F., Tumini, S., Mezzetti, A., Cipollone, F., Cuccurullo, F., Morgese, G., and Verrotti, A. (2000). Vascular endothelial growth factor (VEGF) in children, adolescents and young adults with Type 1 diabetes mellitus: relation to glycaemic control and microvascular complications. *Diabet Med*, 17, 650-6.
115. Lin, T. H., Yen, H. W., Voon, W. C., Su, H. M., Lu, Y. H., Lai, W. T., and Sheu, S. H. (2005). Vascular endothelial growth factor in coronary sinus: evidence for its association with coronary collaterals. *Scand Cardiovasc J*, 39, 353-7.
116. Kampfer, H., Pfeilschifter, J., and Frank, S. (2001). Expressional regulation of angiopoietin-1 and -2 and the tie-1 and -2 receptor tyrosine kinases during cutaneous wound healing: a comparative study of normal and impaired repair. *Lab Invest*, 81, 361-73.
117. Nyengaard, J. R., and Rasch, R. (1993). The impact of experimental diabetes mellitus in rats on glomerular capillary number and sizes. *Diabetologia*, 36, 189-94.
118. van der Zee, R., Murohara, T., Luo, Z., Zollmann, F., Passeri, J., Lekutat, C., and Isner, J. M. (1997). Vascular endothelial growth factor/vascular

- permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation*, 95, 1030-7.
119. Rivard, A., Silver, M., Chen, D., Kearney, M., Magner, M., Annex, B., Peters, K., and Isner, J. M. (1999). Rescue of diabetes-related impairment of angiogenesis by intramuscular gene therapy with adeno-VEGF. *Am J Pathol*, 154, 355-63.
 120. Li, Y., Hazarika, S., Xie, D., Pippen, A. M., Kontos, C. D., and Annex, B. H. (2007). In mice with type 2 diabetes, a vascular endothelial growth factor (VEGF)-activating transcription factor modulates VEGF signaling and induces therapeutic angiogenesis after hindlimb ischemia. *Diabetes*, 56, 656-65.
 121. Gerhardinger, C., Brown, L. F., Roy, S., Mizutani, M., Zucker, C. L., and Lorenzi, M. (1998). Expression of vascular endothelial growth factor in the human retina and in nonproliferative diabetic retinopathy. *Am J Pathol*, 152, 1453-62.
 122. Sato, T., Wu, X., Shimogaito, N., Takino, J., Yamagishi, S., and Takeuchi, M. (2009). Effects of high-AGE beverage on RAGE and VEGF expressions in the liver and kidneys. *Eur J Nutr*, 48, 6-11.
 123. Kuramochi, H., Hayashi, K., Uchida, K., Miyakura, S., Shimizu, D., Vallbohmer, D., Park, S., Danenberg, K. D., Takasaki, K., and Danenberg, P. V. (2006). Vascular endothelial growth factor messenger RNA expression level is preserved in liver metastases compared with corresponding primary colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 12, 29-33.

EKLER**Ek 1: Deney Hayvanları Etik Kurulu Kararı**

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI



02.01.2012

Sayı :B.30.2.İNÜ.0.20.05.05/01
Konu:2011/A-42 no.lu çalışma

Sayın ;
Doç.Dr.Yılmaz ÇİĞREMİŞ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.

09.06.2011 tarihinde Etik onay alan 2011/A-42 protokol no.lu “Streptozotosin ile Diabet Oluşturulan Rat Karaciğer Dokusunda Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü'nün (VEGF) Gen İfadesi” isimli çalışmanın başlığının “Streptozotosin ile Deneysel Diyabet Oluşturulan sıçan Karaciğer Dokusunda Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör (VEGF) Geninin ifadesi” olarak değiştirilmesi, araştırmanın içeriğinde herhangi bir değişiklik yapılmamak kaydıyla uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı

Ek 2: Deneý Hayvanları Etik Kurulu Kararı

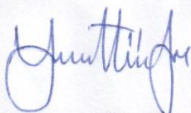

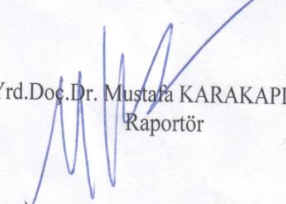
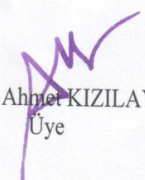
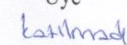
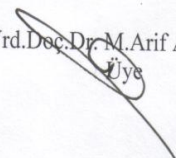
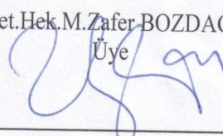
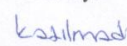
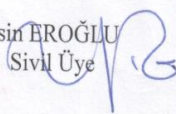


İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 09-06-2011
 Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
 Araştırma Protokol no.su : 2011/A-42
 Deneýde Kullanılacak Hayvanın Türü : Wistar Albino
 Deneýde Kullanılacak Hayvanın Soyu : Rat
 Deneýde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez
 Deneýde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 20 adet
 Deneýde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 8-12 haftalık/200-250 gram

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ'in yürütücüsü olduğu "Streptozotosin ile Diabet Oluşturulan Rat Karaciğer Dokusunda Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü'nün (VEGF) Gen İfadesi" isimli 2011/A-42 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneý Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

 Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ Başkan	 Doç. Dr. Abdurrahman KARAMAN Başkan Yard.	 Yrd. Doç. Dr. Mustafa KARAKAPLAN Raportör
 Prof. Dr. Ahmet KIZILAY Üye	 Prof. Dr. Selim DOĞANAY Üye katılmadı	 Yrd. Doç. Dr. M. Arif ALADAĞ Üye
 Vet. Hek. M. Zafer BOZDAĞ Üye	 Salih AVCI Sivil Üye katılmadı	 Yasin EROĞLU Sivil Üye

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Selin ÇELİK
Doğum Tarihi : 21.11.1983
Doğum Yeri : İskenderun
Uyruk : T.C.

Eğitim Bilgileri

2010-.....: İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Malatya)

(devam ediyor)

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Tezli Yüksek Lisans Eğitimi

2009-2010: İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (İstanbul)

Orta Öğretim Alan Öğretmenliği Tezsiz Yüksek Lisans Eğitimi

2005-2006: Çukurova Üniversitesi (Adana)

Yüksek Lisans Öncesi İngilizce hazırlık

2001-2005: Çukurova Üniversitesi (Adana)

Biyoloji Bölümü Lisans Eğitimi