

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**NORMAL VE DİYABETİK SIÇANLARDAN İZOLE
EDİLEN RETİNANIN RETİNAL VE PERİFERAL
DAMARLAR ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

MERVE AGUŞ

**DANIŞMAN
PROF. DR. B. SÖNMEZ UYDEŞ DOĞAN**

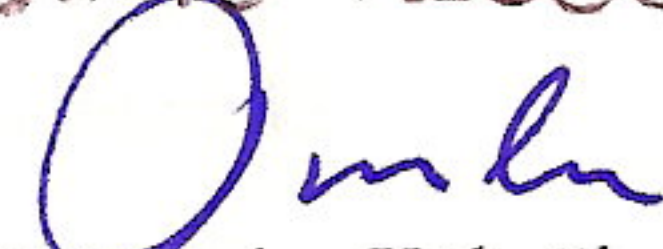
**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMAKOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2008

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.


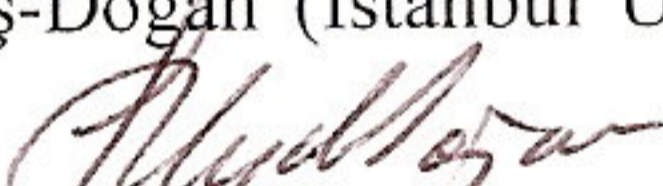

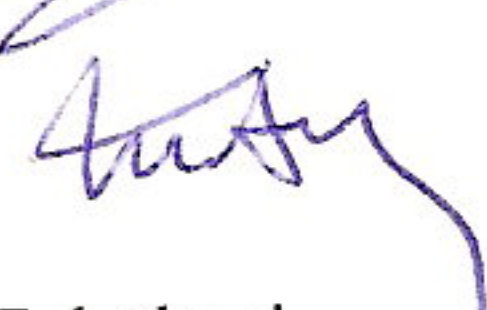

07/10/2008


Prof. Dr. Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Farmakoloji
Programın seviyesi : Yüksek Lisans Doktora
Anabilim Dalı : Farmakoloji
Tez Sahibi : Merve AGUŞ
Tez Başlığı : Normal ve diyabetik sıçanlardan izole edilen retinanın retinal ve periferal damarlar üzerindeki etkisinin incelenmesi
Sınav Yeri : Eczacılık Fakültesi
Sınav Tarihi : 22 / 09 / 2008

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1. Prof. Dr. Gül Baktır (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji AbD) 
2. Prof. Dr. B. Sönmez Uydeş-Doğan (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji AbD) (Tez Danışmanı) 
3. Prof. Dr. Cihan Demirci (İ. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Zooloji AbD) 
4. Prof. Dr. Tuncay Altuğ (İstanbul Bilim Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AbD) 
5. Yard. Doç. Dr. Gökçe Topal Tanyılmaz (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji AbD) 

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Merve Ağış



İTHAF

Sevgili Ailem'e ithafen...

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca desteğini ve ilgisini her zaman yanımda hissettiğim, değerli hocam ve danışmanım Sayın *Prof. Dr. B. Sönmez UYDEŞ-DOĞAN*'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana vermiş olduğu bilimsel ve manevi destek için Anabilim Dalı Başkanımız Sayın *Prof. Dr. Gül BAKTIR*'a,

Eğitimim boyunca bilimsel ve manevi destekleriyle hep yanımda olan Sayın *Prof. Dr. Osman ÖZDEMİR*'e

Deneysel çalışmalarım boyunca desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Sayın *Prof. Dr. Tuncay ALTUĞ*'a, tezime sağlamış olduğu özverili katkılarından dolayı Sayın *Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ*'ye ve Sayın *Uzm. Biolog Bülent ERGİN*'e, tezime katkılarından dolayı Sayın *Uzm. Dr. Mine KUCUR*'a,

Tezimle ilgili katkılarından ve vermiş olduğu manevi destekten dolayı Sayın *Yard. Doç. Dr. Gökçe TOPAL TANYILMAZ*'a,

Farmakoloji Anabilim Dalı'na girdiğim ilk günden itibaren çalışmalarım beni yüreklendirerek verdikleri destek ve dostluklarını her zaman yanımda hissettiğim *Yard. Doç. Dr. F. İlkay ALP* ve *Dr. Ecz. Deniz KALELİ-DURMAN*'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her zaman destek olan *Yard. Doç Dr. Alper OKYAR*'a, *Dr. Ecz. Selçuk TAKIR*'a, *Uzm. Ecz. Zeliha PALA*'ya, *Uzm. Ecz. Nihan ÇARÇAK*'a, *Uzm. Biyolog Uğur AKSU*'ya, *Ecz. Muharrem AĞIRGÖL*'e, *Ecz. Melike HASAR*'a, *Ecz. Maksat NURİYEV*'e ve *Ecz. Fulya GEZERLER*'e,

Başta zorlu deneysel diyabet oluşturma çalışmalarında olmak üzere tez çalışmalarım boyunca her zaman desteğini gördüğüm *Ecz. Ebru KOÇ*'a,

Yaşamımın her döneminde maddi, manevi destekleri, bana olan inançları ve takdirleriyle yanımda olan *Sevgili Ailem*'e,

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1923

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BEYAN.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
İTHAF.....	İİ
TEŞEKKÜR.....	İİİ
İÇİNDEKİLER	İV
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Göz.....	4
2.2. Retina Tabakasının Yapısı ve Fonksiyonu	4
2.2.1. Retinanın Kanlanması	6
2.2.2. Retinal Arterin Tonüsünün Düzenlenmesi.....	7
2.3. Retina Kaynaklı Gevşetici Faktör (RRF).....	10
2.4. Diabetes Mellitus	15
2.4.1. Diabetes Mellitus ve Tipleri.....	17
2.4.1.1. Tip I Diyabet	17
2.4.1.2. Tip II Diyabet.....	18
2.4.1.3. Gestasyonel Diyabet.....	20
2.4.2. Diabetes Mellitus ile İlişkili Akut Komplikasyonlar	20
2.4.3. Diabetes Mellitus ile İlişkili Kronik Komplikasyonlar.....	21
2.4.3.1. Vasküler Komplikasyonlar.....	22
2.4.3.2. Kardiyak Komplikasyonlar	23
2.4.3.3. Göz ile İlişkili Komplikasyonlar	23
2.4.3.4. Renal Komplikasyonlar.....	29
2.4.3.5. Nörolojik Komplikasyonlar	29
2.4.3.6. Deri İle İlişkili Komplikasyonlar	30

2.4.3.7. Enfeksiyona Eğilim.....	30
2.4.4. Diyabet ve Endotel Disfonksiyonu	32
2.5. Deneysel Diyabet Modelleri	37
2.5.1. Farmakolojik Ajanlar İle Diyabet Oluşturulması.....	37
2.5.2. Cerrahi Girişim İle Diyabet Oluşturulması.....	39
2.5.3. Genetik Diyabet Modelleri.....	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
3.1. Deneysel Hayvanlarının Genel Özellikleri.....	41
3.2. Araç ve Gereçler	41
3.3. Kimyasal Maddeler ve Hazırlanışları	43
3.4. Yöntem.....	45
3.4.1. Sıçanlarda Diyabet Oluşturulması ve Takibi	45
3.4.2. Dokuların Fonksiyonel Çalışmalar İçin Hazırlanması.....	46
3.4.2.1. Sıçan Karotid ve Mezenterik Arteri ile Sığır Retinal Arterin İzolasyonu....	46
3.4.2.2. Sıçan Retina Dokusunun İzolasyonu	47
3.4.2.3. Arterlerin Standardizasyonu.....	47
3.4.3. Fonksiyonel Çalışmalar.....	48
3.4.3.1. İzole Arterlerde Endotel ve Düz Kas Aracılı Gevşeme Yanıtlarının Belirlenmesi	48
3.4.3.2. İzole Arterlerde Kastırıcı Ajana Karşı Reaktivitenin Belirlenmesi	48
3.4.3.3. İzole Arterlerde Sıçan Retinasının Etkisinin İncelenmesi	49
3.4.3.4. İzole Arterlerde Sığır Koroid Dokusunun Etkisinin İncelenmesi	50
3.4.3.5. Sıçan Retinasının Karotid ve Mezenterik Arterleri Üzerindeki Etkisinde Endotel Kaynaklı Vazodilatör Maddelerin Rolünün İncelenmesi	51
3.4.4. İnsülin Düzeylerinin Tayini	51
3.4.5. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal İncelemeler	52
3.5. İstatistiksel Analiz.....	54
4. BULGULAR.....	55
4.1. Fonksiyonel Bulgular.....	55
4.1.1. Kontrol ve Diyabetik Hayvanların Ağırlık, Glukoz ve İnsülin Düzeyleri.....	55
4.1.2. İzole Retinal, Karotid ve Mezenterik Arterlerin Endotel Fonksiyonu.....	58
4.1.2.1. Kontrol Dokularda Asetilkolin'in Gevşetici Etkisi.....	58
4.1.2.2. Diyabetik Dokularda Asetilkolin'in Gevşetici Etkisi	60

4.1.3. İzole Retinal, Karotid ve Mezenterik Arterin Düz Kas Gevşeme Yanıtları	63
4.1.3.1. Kontrol Dokularda Sodyum Nitroprusiyat'ın Gevşetici Etkisi	63
4.1.3.2. Diyabetik Dokularda Sodyum Nitroprusiyat'ın Gevşetici Etkisi	65
4.1.4. İzole Karotid ve Mezenterik Arterinde Prostaglandin F _{2α} 'nın Kastırıcı Etkisinin İncelenmesi	68
4.1.5. Retinanın Etkisi	71
4.1.5.1. Kontrol Sıçan Retinasının Sığır Retinal, Sıçan Karotid ve Mezenterik Arterleri Üzerindeki Gevşetici Etkisi	71
4.1.5.2. Diyabetik Sıçan Retinasının Sığır Retinal, Sıçan Karotid ve Mezenterik Arterleri Üzerindeki Gevşetici Etkisi	75
4.1.6. Sığır Koroid Dokusunun Etkisinin İncelenmesi	82
4.1.7. Retina Kaynaklı Gevşetici Etkinin Mekanizmasının İncelenmesi	85
4.1.7.1. Nitrik Oksit Sentaz İnhibitörü L-NOARG'ın Etkisi	85
4.1.7.2. Guanilat Siklaz İnhibitörü ODQ'nun Etkisi	87
4.1.7.3. Siklooksijenaz İnhibitörü İndometazin'in Etkisi	89
4.2. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal İncelemelerin Sonuçları	93
4.2.1. Dokuların Işık Mikroskopunda İncelenmesi	93
4.2.2. Dokuların Elektron Mikroskopunda İncelenmesi	95
4.2.3. Dokularda İmmünohistokimyasal İnceleme Sonuçları	98
5. TARTIŞMA	101
KAYNAKLAR	113
ETİK KURUL KARARI	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
ÖZGEÇMİŞ	123

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 4-1: İzole sığır retinal, sıçan karotid ve mezenterik arterlerinde asetilkolin'in, E_{maks} ve pD₂ değerleri.	59
Tablo 4-2: Kontrol ve diyabetik sıçanlardan izole edilen karotid ve mezenterik arterinde asetilkolin'in E_{maks} ve pD₂ değerleri	62
Tablo 4-3: İzole sığır retinal arteri, sıçan karotid ve mezenterik arterleri üzerinde sodyum nitroprusiyat'ın prekontraksiyon, E_{maks} ve pD₂ değerleri.	64
Tablo 4-4: Kontrol ve diyabetik sıçanlardan izole edilen karotid ve mezenterik arterlerinde sodyum nitroprusiyat'm, E_{maks} ve pD₂ değerleri	67
Tablo 4-5: Kontrol ve diyabetik grubun izole karotid ve mezenterik arterlerinde PGF_{2α}'nın E_{maks} ve pD₂ değerleri.	70
Tablo 4-6: PGF_{2α} ile prekontrakte edilen sığır retinal, sıçan karotid ve sıçan mezenterik arterlerinde sıçan retinası ile elde edilen gevşeme yanıtları	74
Tablo 4-7: Kontrol ve diyabetik arterlerde PGF_{2α} (3x10⁻⁶M - 3x10⁻⁵M) ile elde edilen prekontraksiyon düzeyleri ve retina dokusuna bağlı olarak oluşan maksimum gevşeme yanıtları	78
Tablo 4-8: PGF_{2α} ile prekontrakte edilmiş sığır retinal, sıçan karotid ve sıçan mezenterik arterlerinde koroid dokusunun etkisi	84
Tablo 4-9: Çeşitli inhibitörler ile inkübe edilen izole karotid arterlerde PGF_{2α} ile elde edilen prekontraksiyon düzeyleri ve retina dokusuna bağlı olarak oluşan maksimum gevşeme yanıtları	91
Tablo 4-10: Çeşitli inhibitörler ile inkübe edilen izole mezenterik arterlerde PGF_{2α} ile elde edilen prekontraksiyon düzeyleri ve retina dokusuna bağlı olarak oluşan maksimum gevşeme yanıtları	92

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Retinayı oluşturan katmanların şematik gösterimi -Bonnie ve Gauner (2007)'den değiştirilerek.....	5
Şekil 2-2: Diyabetik retinopatinin oluşumunda rol oynayan hücrel mekanizmalar.....	27
Şekil 3-1: İzole arter üzerine retina dokusunun yerleştirilmesinin şematik gösterimi (Delaey ve Van de Voorde 1998).....	49
Şekil 4-1: Kontrol ve diyabetik grup hayvanların ağırlıkları.....	55
Şekil 4-2: Kontrol ve diyabetik grup hayvanların kan glukoz düzeyleri.....	56
Şekil 4-3: Kontrol ve diyabetik grup hayvanların serum insülin düzeyleri.....	57
Şekil 4-4: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-6}M - 3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilmiş izole sığır retinal, sığan karotid ve sığan mezenterik arterlerinde asetilkolinin konsantrasyon bağımlı gevşetici etkisi, n=11-13.	58
Şekil 4-5: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-6}M - 3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilmiş kontrol ve diyabetik karotid ve mezenterik arterlerinde asetilkolinin konsantrasyon bağımlı gevşetici etkisi	61
Şekil 4-6: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-6}M - 3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilmiş izole sığır retinal, sığan karotid ve sığan mezenterik arterleri üzerinde sodyum nitroprusiyatın konsantrasyon bağımlı gevşetici etkisi, n=7-16	63
Şekil 4-7: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-6}M - 3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilmiş kontrol ve diyabetik karotid ve mezenterik arterleri üzerinde sodyum nitroprusiyatın konsantrasyon bağımlı gevşetici etkisi, n=8-10	66
Şekil 4-8: Kontrol ve diyabetik karotid ve mezenterik arterlerinde $PGF_{2\alpha}$ ($10^{-9} - 10^{-4} M$) ile elde edilen konsantrasyon yanıt eğrileri.....	69
Şekil 4-9: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-6}M - 3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilmiş A) izole sığır retinal, B) sığan karotid ve C) sığan mezenterik arterleri üzerine sığan retina dokusunun gevşetici etkisi (orijinal trase).	72
Şekil 4-10: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-6}M - 3 \times 10^{-5}M$) ile kastırılmış sığır retinal, sığan karotid ve sığan mezenterik arterleri üzerinde sığan retinasının gevşetici etkisi.....	73
Şekil 4-11: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-6}M - 3 \times 10^{-5}M$) ile kastırılmış karotid ve mezenterik arterlerde kontrol (K) ve diyabetik retina (D) dokusunun etkisi.....	76

Şekil 4-12: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-6}M$ - $3 \times 10^{-5}M$) ile kastırılmış kontrol ve diyabetik karotid ve mezenterik arterler üzerine sırasıyla kontrol ve diyabetik retinaların yerleştirilmesi sonucu elde edilen gevşeme yanıtları	77
Şekil 4-13: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-6}M$ - $3 \times 10^{-5}M$) ile kastırılmış izole sığır retinal arterinde kontrol (K) ve diyabetik retina (D) dokusunun etkisi	80
Şekil 4-14: $PGF_{2\alpha}$ $3 \times 10^{-5}M$ ile kastırılmış sığır retinal arteri üzerine kontrol ve diyabetik sıçan retinaların yerleştirilmesi sonucu elde edilen gevşeme yanıtları ...	81
Şekil 4-15: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-6}M$ - $3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilmiş A) izole sığır retinal, B) sıçan karotid ve C) sıçan mezenterik arterleri üzerinde sıçan retina ve sığır koroid dokusunun etkisi (orijinal trase).....	83
Şekil 4-16: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-6}M$ - $3 \times 10^{-5}M$) ile kastırılmış sığır retinal, sıçan karotid ve sıçan mezenterik arterleri üzerinde sığır koroid dokusunun etkisi (n=6-7).....	84
Şekil 4-17: İzole sıçan karotid (A) ve mezenterik arterinde (B) retina kaynaklı gevşeme yanıtlarında nitrik oksit sentez inhibitörü L-NOARG' ın ($10^{-4}M$) etkisi, n=7-8.....	86
Şekil 4-18: İzole sıçan karotid (A) ve mezenterik arterinde (B) retina kaynaklı gevşeme yanıtlarında guanilat siklaz inhibitörü ODQ'nun ($10^{-5}M$) etkisi, n=6-8 ..	88
Şekil 4-19: İzole sıçan karotid (A) ve mezenterik arterinde (B) retina kaynaklı gevşeme yanıtlarında siklooksijenaz inhibitörü indometazinin ($10^{-5}M$) etkisi, n=6-9	90
Şekil 4-20: Kontrol (A) ve diyabetik (B) gruplardan izole edilen karotid arterlerin ışık mikroskobunda görünümü	94
Şekil 4-21: Kontrol (A) ve diyabetik (B) gruplardan izole edilen mezenterik arterlerin ışık mikroskobunda görünümü.....	94
Şekil 4-22: Kontrol (A) ve diyabetik (B) gruplardan izole edilen retina dokusunun ışık mikroskobunda görünümü	94
Şekil 4-23: Kontrol (A) ve diyabetik (B) karotid arterlerin elektron mikroskobunda görünümü	96
Şekil 4-24: Kontrol (A) ve diyabetik (B) mezenterik arterlerin elektron mikroskobunda görünümü	96
Şekil 4-25: Kontrol (A) ve diyabetik (B) retinaların elektron mikroskobundaki görünümü	97

Şekil 4-26: Kontrol (A) ve diyabetik (B) retinaların elektron mikroskopunda görünümü	97
Şekil 4-27: Kontrol (A) ve diyabetik (B) karotid arterlerde eNOS dağılımı	99
Şekil 4-28: Kontrol (A) ve diyabetik (B) mezenterik arterlerde eNOS dağılımı.....	99
Şekil 4-29: Kontrol (A) ve diyabetik (B) retina dokularında eNOS dağılımı.....	99
Şekil 4-30: Kontrol (A) ve diyabetik (B) karotid arterlerde iNOS dağılımı.....	100
Şekil 4-31: Kontrol (A) ve diyabetik (B) mezenterik arterlerde iNOS dağılımı ...	100
Şekil 4-32: Kontrol (A) ve diyabetik (B) retina dokularında iNOS dağılımı	100

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

PGF_{2α}: Prostaglandin F_{2α}

RRF: Retina kaynaklı gevşetici faktör

NO: Nitrik oksit

sGMP: siklik guanozin monofosfat

ATP: Adenozin trifosfat

K⁺_{ATP}: Adenozin trifosfat duyarlı potasyum kanalları

K⁺_{Ca⁺⁺}: Kalsiyum bağımlı potasyum kanalları

SERCA: Sarkoplazmik/endoplazmik retikulum membranında bulunan Ca⁺⁺ATPaz pompası

STZ: Streptozotosin

eNOS: Endotelial nitrik oksit sentaz

iNOS: İndüklenebilen nitrik oksit sentaz

i.p.: İntraperitoneal

sAMP: Siklik adenozin monofosfat

CGRP: Kalsitonin geni ile ilişkili peptit

ANP: Atriyal natriüretik peptit

BNP: Beyin natriüretik peptit

CNP: C-tipi natriüretik peptit

HbA_{1C}: Glikozillenmiş hemoglobin

i.v.: İntravenöz

s.c.: Subkütan

i.m.: İntamüsküler

PKC: Protein kinaz C

VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü

ICAM-1: İnterselüler adhezyon molekülü-1

NFκ B: Nüklear faktör kappa B

İL-1: İnterlökin-1
TNF α : Tümör nekroz faktörü alfa
TGF β : Transforme edici büyüme faktörü beta
CD 18: Adhezyon molekülü
VCAM-1: Vasküler hücre adhezyon molekülü-1
COX 2: Siklooksijenaz 2
PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PARP: Poli adenzin (difosfo-riboz) polimeraz
AGE: İleri glikasyon son ürünleri
RAGE: İleri glikasyon son ürünü spesifik reseptörü
vWF: von Willebrand faktörü
tPA: Doku tipi plazminojen aktivatörü
PAI-1: Plazminojen aktivatör inhibitörü
P21^{ras}: Transkripsiyon faktörü
IGF-1: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
EGF: Epidermal büyüme faktörü
DAG: Diaçil gliserol
L-NOARG: N^G-Nitro-L-Arginin
ODQ: 1H-[1.2.4]Oxadiazolo-[4,3-a]Quinoxalin-1-One
Indo: İndometazin
Ach: Asetilkolin
SNP: Sodyum nitroprusiyat
PGI₂: Prostatiklin
INT: İç nükleer tabaka
IPT: İç pleksiform tabaka
DNT: Dış nükleer tabaka

ÖZET

Agus M. (2008). Normal Ve Diyabetik Sıçanlardan İzole Edilen Retinanın Retinal Ve Periferel Damarlar Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi Farmakoloji ABD, Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Retina kaynaklı gevşetici faktör (RRF), retinal arterin tonusunun düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülen ancak yapısı, etki mekanizması ve patofizyolojik önemi henüz aydınlatılmamış olan yeni bir gevşetici faktördür. Çalışmamızda retinal sirkülasyonu etkileyebilecek kardiyovasküler bir hastalık olan diyabette, RRF'in retinal ve periferel damarlar üzerindeki etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. Sıçanlarda (Wistar, 250-300g) diyabet oluşumu streptozotosin (65mg/kg, i.p.) injeksiyonu ile sağlanmıştır. Kontrol ve diyabetik hayvanlar ağırlık, kan glukoz ve insülin düzeyleri açısından takip edilmiş ve 8 haftanın sonunda karotid ve mezenterik arterleri ile retina dokuları izole edilmiştir. Miyograf sistemine yerleştirilen karotid ve mezenterik arterlerde endotel ve düz kas fonksiyonları belirlenmiş ve retina dokusunun etkisi araştırılmıştır. Sıçan retinasının izole sığır retinal arteri üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Ayrıca, kontrol ve diyabetik arterler ile retinada histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeler yapılmıştır. Diyabetik karotid ve mezenterik arterlerinde asetilkolinin endotel aracılı gevşeme yanıtlarında ve prostaglandin F2alfa 'nın oluşturduğu kasılma yanıtlarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma belirlenmiştir. Buna karşın, sodyum nitroprusiyatın düz kas aracılı gevşeme yanıtları farklı bulunmamıştır. Sıçan retinası, karotid ve mezenterik arterde, sığır retinal arterinde olduğu gibi, akut başlayan tam bir gevşeme yanıtına neden olmuş ve bu etki nitrik oksit ve prostasiklin ile ilişkili bulunmamıştır. Diyabetik sıçan retinası ile diyabetik karotid ve mezenterik arterlerinde alınan gevşeme yanıtları, kontrol retinanın kontrol arterlerdeki gevşeme yanıtlarından farklılık göstermemiştir. İzole sığır retinal arterinde kontrol ve diyabetik sıçan retinasının gevşetici etkisi de benzer bulunmuştur. Fonksiyonel bulgular histopatolojik ve immünohistokimyasal sonuçlar ile desteklenmiştir. Bulgularımız, endotel fonksiyonun bozulduğu diyabetik koşulda RRF'in etkinliğinin değişmediğini göstermekte ve retinal tonüsün düzenlenmesinde RRF'in kompenzatuvar bir rolünün olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Retina kaynaklı gevşetici faktör (RRF), STZ ile indüklenen diyabet, sıçan karotid arteri, sıçan mezenterik arteri, sığır retinal arteri.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1923.

ABSTRACT

Agus M. (2008). Investigation Of The Effect Of Retina Isolated From Control And Diabetic Rats On Retinal And Peripheral Arteries. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmacology Master Thesis. İstanbul.

Retinal relaxing factor (RRF) is suggested to involve in the regulation of retinal arterial tone whereas, its nature, mechanism of action and importance in pathological conditions is not estimated yet. Herein, we aimed to investigate the effects of RRF on retinal and peripheral arteries in diabetes where retinal circulation is affected. Diabetes was induced in male Wistar rats (250-300g) by streptozotocin (65mg/kg, i.p.) and animals were recorded in terms of weights, blood glucose and insuline levels. After 8 weeks carotid and mesenteric arteries as well as retinas were isolated. The arteries were mounted on myograph and then endothelial, smooth muscle functions and the effect of retina were determined. Effect of retina on isolated bovine retinal artery was also assessed. Moreover, histopathological and immunohistochemical studies were performed in the arteries and retina. Endothelium-dependent relaxations to acetylcholine and contractions to prostaglandin F₂alpha were significantly reduced in diabetic arteries. Whereas, relaxations to sodium nitroprusside were similar to controls. Rat retina produced acute and complete relaxations in carotid and mesenteric arteries, as in retinal arteries, and the relaxations were unrelated to nitric oxide and prostacyclin. Relaxant effects of diabetic retinas on diabetic arteries were not significantly different from corresponding controls. The effects of control and diabetic retinas on retinal arteries were also found similar. Functional findings were supported by histopathological and immunohistochemical results. Our findings showed that RRF effectiveness is unchanged in diabetes where endothelial function is impaired and suggested that RRF may play a compensatory role in the maintenance of retinal vascular tone.

Key Words: Retina derived relaxing factor (RRF), STZ-induced diabetes, rat carotid artery, rat mesenteric artery, bovine retinal artery.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 1923.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hücrelerarası iletişimin ve görme işlevinin sağlanması amacıyla retinadan birçok endojen vazoaaktif madde (prostasiklin, nitrik oksit, endotelin-1 vb.) serbestlenmektedir. Bu vazoaaktif maddeler, otonomik innervasyona sahip olmayan retinal sirkülasyonun düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar. 1998 yılında izole sığır retinal arterinde ve retinasında yapılan bir çalışma ile, retina dokusundan bilinen vazoaaktif maddelerden farklı yeni bir gevşetici faktörün salıverildiği ortaya konmuş ve retinal arterlerin tonusunun düzenlenmesinde rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) ile kastırılmış izole sığır retinal arterleri üzerine bir parça retina dokusunun yerleştirilmesinin retinal arterlerde gevşemeye neden olduğu belirlenmiş ve bu etkiye retinadan serbestlenen gevşetici bir faktörün (retina kaynaklı gevşetici faktör; RRF) aracılık ettiği öne sürülmüştür. Retina dokusu yerine, aynı büyüklükteki koroid dokusunun kastırılmış retinal arter üzerine yerleştirilmesinin benzer bir gevşeme yanıtına neden olmaması ise retina kaynaklı gevşetici yanıtın mekanik bir etkiden kaynaklanmadığını göstermiştir. Farklı türlerden (köpek, domuz, sıçan ve fare) izole edilen retinalar ile yapılan çalışmalarda RRF'in türe özgü olmadığı gösterilmiş ve ayrıca, gevşetici etkisinin retinal arterle sınırlı kalmayıp farklı damarlarda (renal, karotid ve mezenterik arterleri) hatta damar dışı düz kaslarda da (sıçan bronş düz kası) olduğu belirlenmiştir. RRF'in gevşetici etkisinde endotel kaynaklı vazodilatör maddelerin rolü araştırılmış ve nitrik oksit sentaz, guanilat siklaz ve siklooksijenaz enzimlerinin spesifik inhibitörleri varlığında ya da deendotelize edilen retinal arterlerde çalışmalar yürütülmüştür. Bu çalışmalarda RRF'in nitrik oksit (NO) veya siklooksijenaz yolağı ürünlerinden farklı olduğu ve gevşetici etkisinin siklik guanozin monofosfat (sGMP) oluşumu ile ilişkili olmadığı ortaya konulmuştur. Öte yandan, biyoassay çalışmalarında RRF'in polipeptit veya protein yapısında olmayan, hidrofilik özellikte, ısıya dayanıklı stabil bir faktör olduğu belirlenmiş ve gevşetici etkisinin pH değişiminden etkilenmediği ancak hipoksik koşulda potansiyelize olduğu gösterilmiştir. RRF'in genel özelliklerinin ortaya konulduğu bu çalışmaların yanısıra etki mekanizmasına yönelik olarak yapılan çalışmalarda plazmalemmal kalsiyum-ATP_{az}

pompasının aktivasyonunun, gevşetici etkiye kısmen aracılık ettiği öne sürülmüş ancak RRF'in gevşetici etkisinin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır.

Laboratuvarımızda da retinanın retinal arter üzerindeki etkisinin ve etki mekanizmasının incelenmesine yönelik çalışmalar yürütülmüş ve elde edilen ilk bulgular ile RRF'in varlığı desteklenmiş ve ayrıca, özgün olarak, retinal kaynaklı gevşetici etkinin bifazik bir karakter gösterdiği ortaya konmuştur. Sığır retinasının sığır retinal arteri üzerindeki akut gevşetici etkisinin, diğer çalışmalara paralel olarak, endotelden bağımsız bir mekanizma aracılığı ile gerçekleştiği ve NO, prostasiklin gibi endojen vazodilatör maddelerin bu gevşetici etkiye aracılık etmediği belirlenmiştir. Ayrıca, RRF'in retinal damarları gevşetici etkisinde adenozin trifosfat (ATP) duyarlı potasyum (K^+_{ATP}) ve kalsiyum bağımlı potasyum ($K^+_{Ca^{++}}$) kanallarının açılmasının, sarkoplazmik/endoplazmik retikulum membranında bulunan Ca^{++} ATPaz (SERCA) pompasının aktivasyonunun ya da L-tipi voltaj bağımlı Ca^{++} kanallarının kapanmasının rolü olmadığı belirlenmiştir.

RRF'in bazal koşullarda sürekli salıverildiği ve retinal kan akımının düzenlenmesinde fizyolojik bir öneme sahip olabileceği öne sürülmektedir. Buna göre, retina ile ilişkili olup retinal sirkülasyonu etkileyebilecek bazı kardiyovasküler (diyabet, hipertansiyon) hastalıklarda ya da göz ile ilişkili rahatsızlıklarda (retinitis pigmentosa, inen optik atrofi vb.) RRF'in fonksiyonel rolünün belirlenmesinin önemli olduğu öngörülmektedir. Bu doğrultuda çalışmamızda, endotel disfonksiyonuna bağlı vasküler hasara ve gözde retinopati gibi önemli komplikasyonlara yol açabilen bir kardiyovasküler hastalık olan diyabette RRF'in etkinliğinin incelenmesi hedeflenmiştir. Wistar Albino sıçanlarda (250-300g) streptozotosin (65 mg/kg, i.p.) uygulanması ile oluşturulan deneysel diyabette sıçan retina dokusunun gevşetici etkisi (RRF etkinliği) prostaglandin $F_{2\alpha}$ ile kastırılmış olan sığır retinal ve sıçan periferik (karotid ve mezenterik arteri) damarlarında, kontrol retina ile karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Ayrıca, retinanın periferik arterlerdeki gevşetici etkisinin endotel ile ilişkili mekanizmaları incelenmiştir. İzole edilen retinal ve periferik arterlerin endotel ve düz kas fonksiyonları da belirlenmiştir. Fonksiyonel çalışmalara paralel olarak, kontrol ve diyabetik hayvanlardan izole edilen arterler ve retina dokularında ışık ve elektron

mikroskopları altında histopatolojik incelemeler yapılmış ve immünohistokimyasal yöntem ile endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS)'ın dağılımları değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Göz

Görme organı (göz), başın sağ ve solunda yer alan iki göz çukuruna (orbita) yerleşmiş olan bir duyu organıdır. Anatomik olarak göz her biri yaklaşık 24-25 mm çapında ve $6,5 \text{ mm}^3$ hacminde asimetric bir küre görünümünde biyokameradır. Göze dıştan bakıldığında göz bebeği, etrafında renkli kısım (iris) ve onları çevreleyen beyaz renkli sklera tabakası görülmektedir (Yıldırım, 2000 pp.312-313; Putz ve Pabst, 1997).

Göz küresinin duvar yapısı dıştan içe doğru anatomik olarak, fibröz tabaka (tunica fibrosa), vasküler tabaka (tunica vasculosa) ve duysal tabakadan (tunica sensoria) oluşmaktadır. Fibröz tabaka sklera ve korneadan oluşurken, vasküler tabaka koroid, korpus siliare ve iristen, duysal tabaka ise retina tabakasından oluşmaktadır (Yıldırım, 2000 pp.312-313).

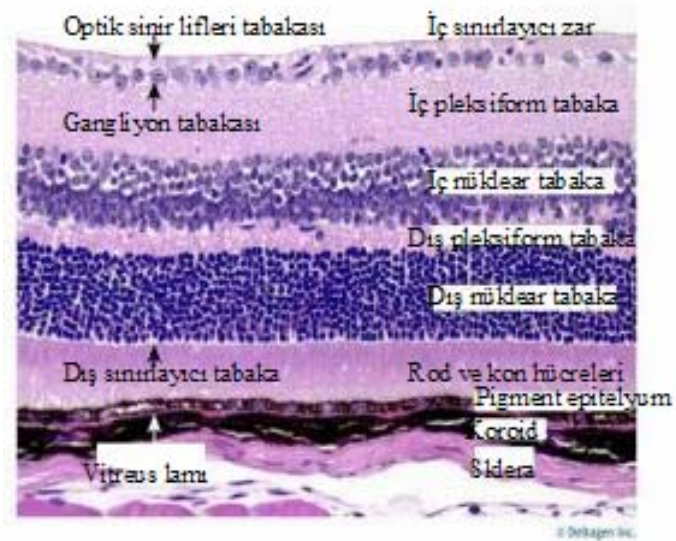
2.2. Retina Tabakasının Yapısı ve Fonksiyonu

Göz küresinin en iç tabakasını oluşturan retina çeşitli hücre katmanlarından, çok sayıda fotoreseptörden (rod ve kon hücreleri) ve nöronlardan oluşan 0,5 mm kalınlığında bir tabakadır (Yıldırım, 2000 pp.312-313; Putz ve Pabst, 1997). Retinanın merkezinde görmede keskinliği sağlayan bölge olan fovea bulunmaktadır. Foveanın biraz uzağında beyaz görünümlü, yuvarlak şekilli, merkezinde optik sinirler ve ana retinal kan damarları bulunan bölge kör noktadır. Burası optik sinirin (nervus opticus) gözü terk ettiği bölgedir ve ışığa duyarsızdır. Optik sinir, gangliyon hücrelerinin aksonlarını içerir ve beyine kadar ulaşır.

Retina dokusundaki rod ve kon hücreleri dışarıdan gelen ışınları algılar ve bunları elektriksel sinyallere dönüştürür. Bu sinyaller optik sinir aracılığı ile beyin korteksine iletilir ve burada görüntüye dönüştürülür. Retina dokusu ile ilişkili en sık karşılaşılan hastalıklar, vasküler retinopatiler, merkezi retinal arter ve ven tıkanmaları, diyabetik retinopati, yaşa bağlı maküler dejenerasyon, retina dekolmanı, retinitis pigmentosa ve glokomdur. Bu hastalıklar retinanın kanlanması, yapısının veya bütünlüğünün bozulmasına yol açarak kısmi veya tam görme kaybına neden olmaktadır (Lang, 2001).

Retina dokusundan dikey olarak bir kesit alındığında dıştan içe doğru katmanlar aşağıdaki gibi sıralanmaktadır (Guyton ve Hall, 1996 pp.637-639);

- Pigment epiteli
- Rod ve kon hücreleri
- Dış sınırlayıcı tabaka
- Dış nükleer tabaka
- Dış pleksiform tabaka
- İç nükleer tabaka
- İç pleksiform tabaka
- Gangliyon tabakası
- Optik sinir lifleri tabakası
- İç sınırlayıcı zar



Şekil 2-1: Retinayı oluşturan katmanların şematik gösterimi -Bonnie ve Gauner (2007)'den değiştirilerek.

2.2.1. Retinanın Kanlanması

Retinanın kanlanmasını sağlayan retinal damarlar, optik sinirin gözü terk ettiği bölgeden başlayarak tüm retina boyunca dağılım gösterir. Ancak retinal damarlar foveaya ulaşmamaktadır. Bu bölgenin beslenmesi koroidal damarlar aracılığı ile olmaktadır.

Çok sayıda reseptör ve sinir hücresi içeren retina tabakasının kanlanması retinal homeostazın oluşumu ve korunması için önemlidir. Bu reseptör ve hücrelerin fonksiyonlarının devamı, ihtiyaç duydukları oksijen ve besinin sağlanması ise retinanın kanlanması (mikrosirkülasyonu) aracılığı ile gerçekleşir. Siliyer arterler tarafından beslenen koroidal sirkülasyon ve merkezi retinal arter ile siliyoretinal arterler tarafından beslenen retinal sirkülasyon bu ihtiyacı karşılamaktadır (Delaey ve Van De Voorde 2000, Yu ve ark. 2003).

Retinal ve koroidal sirkülasyon hem anatomik hem de fonksiyonel olarak farklılıklar göstermektedir. Toplam oküler sirkülasyonun %85'i koroidal sirkülasyon ile sağlanmaktadır Koroidal sirkülasyon sempatik ve parasempatik sistemler tarafından innerve edilir. Koroidal sirkülasyon da dahil olmak üzere diğer birçok vasküler yatağın aksine, retinal doku otonomik innervasyona sahip değildir. Retinal sirkülasyon retinal metabolizmaya göre adapte olabilen bir otheregölasyon mekanizmasına sahiptir. Buna karşın, koroidal sirkülasyonün böyle bir otheregölatöre sahip olmadığı gösterilmiştir (Friedman 1970). Bu otheregölator mekanizma, dokunun kan akımının, dokunun metabolik ihtiyaçlarına göre adapte olabilmesi esasına dayanmakta (Guyton ve Coleman, 1967 pp.1-361) ve esas olarak retinal doku ve endotelial hücrelerden serbestlenen lokal vazoaaktif faktörler tarafından düzenlenmektedir. Retinal sirkülasyon yüksek oksijen düzeyine ve düşük akış hızına sahipken, koroidal sirkülasyon ise düşük oksijen düzeyine ve yüksek kan akış hızına sahiptir (Delaey ve Van De Voorde 2000).

2.2.2. Retinal Arter Tonusunun Düzenlenmesi

Retinal sirkülasyonun otonomik innervasyon almamasından dolayı, lokal vasküler kontrol mekanizmaları retinal homeostazın sağlanmasında oldukça önemlidir. Retinal arterlerin tonüsü, retinanın yapısını oluşturan hücrelerden veya retinal arterlerin endotel tabakalarından serbestlenen birçok vazoaaktif madde ile düzenlenmektedir (Delaey ve Van De Voorde 2000, Haefliger ve ark. 2001, Yu ve ark. 2003). Endotelyal tabakada bu vazoaaktif maddelerin salınımı lokal kan akımına göre, bazal koşullarda ve mekanik veya kimyasal etkilere yanıt olarak gerçekleşmektedir. Vazokonstriktör ve vazodilatör etkili olan bu maddeler sayesinde hem retinal arterin tonusu düzenlenmekte hem de retinada hücrelerarası iletişim sağlanarak görme işlevi yerine getirilmektedir.

Vazokonstriktör etkili peptid yapılı endojen maddelerden olan endotelin-1 oküler vasküler yapıda önemli bir kastırıcı faktördür. İnsanlarda ve deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda endotelin-1'in ekzojen olarak verilmesi sonucu retinada, koroidde ve optik sinirin başında kan akımının azaldığı gösterilmiştir (Sugiyama ve ark. 1996, Dallinger ve ark. 2000). Tavşanlarda yapılan bir çalışmada gözün vitröz hümörüne enjekte edilen endotelin-1'in retinal arterlerde kasılma yanıtına neden olduğu bulunmuştur (Ichikawa ve ark. 2004). Sağlıklı gönüllülerde yapılan bir çalışmada ise, intravenöz endotelin-1 uygulanmasının, deneklerin retinal arterlerinde daralmaya neden olduğu ve bu daralmanın spesifik ET_A reseptör blokleri BQ-123 ile geriye döndüğü ortaya konmuştur (Ichikawa ve ark. 2004). Ayrıca retina ile ilişkili bazı patolojik durumlarda (retinal ven oklüzyonu, glokom, diyabetik mikroanjyopati) endotelin-1'in plazma konsantrasyonunun değiştiği ve normal değerinin yaklaşık iki katına kadar çıktığı gözlenmiştir (Yu ve ark. 2003).

Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ve tromboksan A_2 'nin de retinal arterlerin tonusunun düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir (Yu ve ark. 2003). Bazal tonusdaki retinal arteriyollerde prostaglandin $F_{2\alpha}$ ve tromboksan A_2 analogu U 46619'un doz bağımlı kasılmaya neden olduğu gösterilmiştir. Endotelin-1 ile kastırılmış retinal arterlerde ise U 46619'un kasılma yanıtına, prostaglandin $F_{2\alpha}$ 'nın ise az bir gevşeme yanıtına neden olduğu belirlenmiştir (Yu ve ark. 2001).

Retinal arterler otonomik innervasyona sahip olmadıkları halde dolaşımdaki katekolaminlerin ve serotoninin retinal arterleri kastırıcı etkisi olduğu ve retinal arter tonusunun düzenlenmesinde rolünün olabileceği ileri sürülmüştür (Yu ve ark. 2003). Bu görüşü destekleyici olarak izole sığır retinal arterlerinde yapılan çalışmalarda, noradrenalin (Nyborg ve Nielsen 1990) ve serotoninin (Nyborg ve Nielsen 1990, Delaey ve Van de Voorde 1998) kasılma yanıtı oluşturduğu gösterilmiştir.

Anjiyotensin II, geniş arterlerde ve arteriyollerde güçlü bir kastırıcı maddedir. İnsan ve sığır retinal arterlerinde yapılan radyoligand bağlanma çalışmalarında, anjiyotensin için bağlanma bölgelerinin olduğu bildirilmiştir (Ferrari-Dileo ve ark. 1991). Ancak, sığır retinal arterinde yapılan çalışmalarda, anjiyotensin II'ye olan duyarlılığın düşük olduğu bulunmuştur (Nyborg ve ark. 1990). Buna karşın, sığır, domuz ve insan posterior siliyer arterlerinde ve kedi retinal arterinde yapılan çalışmalarda anjiyotensin II ile doz bağımlı kasılma yanıtları elde edilmiştir. (Rockwood ve ark. 1987, Nyborg ve Nielsen 1990, Meyer ve ark. 1995, Nyborg ve Nielsen 1995). İzole perfüze sıçan gözü ile yapılan çalışmalarda ise belirgin bir doz bağımlı kasılma yanıtı gözlenmemiştir (Su ve ark. 1995).

Vazokonstriktör etkili faktörlerin yanısıra retinal arterlerin tonüsünün düzenlenmesinde vazodilatör maddelerde görev almaktadır (Delaey ve Van De Voorde 2000, Haefliger ve ark. 2001, Yu ve ark. 2003). Retinadan ve/veya retinal arterlerin endotel tabakasından serbestlenen nitrik oksit (NO), düz kasta guanilat siklazı aktive ederek siklik guanozin monofosfat (sGMP) düzeylerini yükseltmekte ve retinal arterlerde gevşeme yanıtı oluşturmaktadır. Ayrıca NO'nun glial hücrelerden salgılanarak retinal düz kas hücrelerinde de etkili olduğu gösterilmiştir (Delaey ve Van De Voorde 2000). Sağlıklı gönüllülere NO sentez inhibitörü L-NMMA uygulanmasının kişilerde ortalama kan basıncı ve kalp atım sayısında artışa neden olurken, retinal arterlerde daralmaya neden olduğu gösterilmiştir. Bu daralmanın retinal arterlerin endotel tabakasından serbestlenen NO'nun sentezinin inhibe olması sonucu olduğu ileri sürülmüştür (Dorner ve ark. 2003). *In vitro* çalışmalarda ise prostaglandin F_{2α} ile prekontrakte edilmiş izole sığır retinal arterlerinde asetilkolin, histamin gibi vazodilatör

maddelerin gevşeme yanıtına neden olduğu ve bu gevşemenin NO aracılı olduğu ortaya konmuştur (Benedito ve ark. 1991a, Benedito ve ark. 1991b, Delaey ve Van de Voorde 1998).

Endotelden serbestlenen bir başka gevşetici faktör ise prostasiklidir (Nielsen ve Nyborg 1990, Brown ve Jampol 1996). Prostrasiklin, arakidonik asidin siklooksijenaz yolağı ürünü olup, damar düz kasında adenilat siklaz enzimini aktive etmekte ve siklik adenozin monofosfat (sAMP) düzeylerini yükselterek gevşemeye neden olmaktadır. İnsan gözünde yapılan bir araştırmada, lamina kribrozanın astrositlerinde siklooksijenaz-1 enziminin bulunduğu ve bu enzimin vazodilatör prostaglandinler ve diğer eikozanoidlerin sentezlenmesine ve serbestlenmesine neden olarak optik sinir hasarında koruyucu rol oynadığı bildirilmiştir (Neufeld ve ark. 1997). İn vitro bir çalışmada ise kümülatif olarak prostasiklin uygulanmasının prostaglandin $F_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilen sığır retinal arterlerinde konsantrasyon-bağımlı gevşemelere neden olduğu gösterilmiştir (Nielsen ve Nyborg 1990).

Bütün bu vazoaaktif maddelerin yanı sıra retinadan serbestlenen gama amino bütirik asit (GABA) (Delaey ve Van de Voorde 1998), glutamat (Delaey ve Van de Voorde 1998), glisin (Delaey ve Van de Voorde 1998, Gadea ve ark. 2002), adenozin (Delaey ve Van de Voorde 1998), adrenomedullin (Boussery ve ark. 2004) ve kalsitonin geni ile ilişkili peptit (CGRP) (Prieto ve ark. 1991, Boussery ve ark. 2005) gibi maddelerin de retinal arterlerin tonüsünün düzenlenmesinde rolünün olabileceği bildirilmektedir. Ayrıca, retinal damarların içinden geçen kanın pH'sının, parsiyel O_2 ve CO_2 basıncının da retinal arterlerin tonüsünün düzenlenmesinde etkisinin olabileceği gösterilmiştir (Delaey ve Van De Voorde 2000, Yu ve ark. 2003).

İnsülinin retinal arterlerin tonusu üzerinde etkisinin olduğu ve diyabetin erken dönemlerinde görülen retinal kan akımı değişikliklerinde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Ancak, insülinin retinal arterler üzerindeki direkt etkisi henüz aydınlatılamamıştır. Retinal arteriyollerde insülin ile dilatasyon olduğu ve bu etkinin prostaglandinler aracılığıyla değil NO aracılığıyla gerçekleştiği bildirilmiştir. Ayrıca, bu

gevşeme mekanizmasında Ca^{++} kanallarının da rolü olabileceği gösterilmiştir. İnsülin konsantrasyonu ile retinal kan akımının, oksijen miktarının ve farmakolojik cevaplılığın ilişkisinin ortaya çıkarılması önemlidir. İnsülinin, diyabete bağlı olarak oluşan vasküler değişikliklerde rol oynayabileceği düşünülmektedir (Yu ve ark. 2003).

1998 yılında sığır retinal arterleri ve retinasında yapılan bir çalışma ile bilinen vazodilatör maddelerden farklı olan yeni bir gevşetici faktörün retinadan serbestlendiği bildirilmiş ve bu faktörün retinal arterlerin tonusunun düzenlenmesinde rolünün olabileceği ileri sürülmüştür (Delaey ve Van de Voorde 1998).

2.3. Retina Kaynaklı Gevşetici Faktör (RRF)

Retinal sirkülasyonun otheregülatör mekanizması kapsamında çevre hücrelerden serbestlenen NO, prostaglandinler, endotelin-1, histamin, adenozin, laktat ve nöropeptidler lokal etkili vazoaktif faktörlerdir (Delaey ve Van De Voorde 2000). 1998 yılında sığır retinal arterinde yapılan bir çalışma da ise retinadan yeni bir gevşetici faktörün salıverildiği ortaya konulmuştur (Delaey ve Van de Voorde 1998). Bu çalışmada, izole sığır retinal arterinin çevresindeki retinal dokunun varlığında prostaglandin $F_{2\alpha}$ 'nın artan konsantrasyonlarına farklı düzeylerde yanıt verdiği gözlenmiştir. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ 'nın artan konsantrasyonlarının retina dokusundan iyi temizlenmemiş retinal arterde zayıf bir kasılma oluşturduğu, ancak retina dokusundan tamamen izole edilmiş retinal arterde oldukça güçlü, doz bağımlı kasılmalara neden olduğu gözlenmiştir. Tromboksan A_2 analogu U46619, serotonin ve endotelin-1 gibi diğer kastırıcı ajanlarla da benzer yanıtlar elde edilmiş ve retinal arterlerin tonüsünün düzenlenmesinde retinanın varlığının önemi ortaya konulmuştur (Delaey ve Van de Voorde 1998). Paralel olarak, prostaglandin $F_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilmiş izole sığır retinal arterlerinin üzerine bir parça sığır retina dokusunun yerleştirilmesinin retinal arterde gevşemeye neden olduğu gösterilmiştir. Bu gevşemenin retinadan serbestlenen gevşetici bir faktör aracılığıyla gerçekleştiği öne sürülmüştür. Retinal kan akımının düzenlenmesinde rolü olabileceği düşünülen bu maddeye "retina kaynaklı gevşetici faktör" kısaca "RRF" adı verilmiştir. Retina dokusunun kaldırılmasıyla retinal arterdeki

gevşemenin hızla ve tamamen geri döndüğü gözlenmiştir. Retina dokusu yerine bir parça koroid dokusunun yerleştirilmesinin retinal arterde benzer düzeyde bir gevşeme oluşturmaması ise retinaya bağlı bu gevşemenin mekanik bir etki ile oluşmadığını açıklamıştır (Delaey ve Van de Voorde 1998). Öte yandan, laboratuvarımızda yürütülen bir çalışmada ise prostaglandin $F_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilmiş sığır retinal arterinde retina kaynaklı gevşemenin çoğunlukla bifazik karakter gösterdiği ortaya konmuştur. Ayrıca, K^+ (120 mM) varlığında bifazik cevabın monofazik hale dönüştüğü ve gevşeme yüzdesinin önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir (Takır ve ark. 2006a; 2006b). RRF'in retinal arterde gözlenen bu bifazik karakteri, gevşeme yanıtının iki kademe oluştuğunu göstermekte bu durum RRF'in etkisini iki farklı mekanizma aracılığı ile oluşturduğunu düşündürmektedir.

Retina kaynaklı gevşetici faktörün varlığının sığır retinası ile sınırlı kalmayıp, köpek, domuz, koyun (Delaey ve Van de Voorde 1998), sıçan (Boussery ve ark. 2002), fare (Boussery ve ark. 2002) retinalarından da serbestlendiği gösterilmiştir. Bu veriler retinal gevşetici faktörün türe özgü olmadığını ortaya koymaktadır. Ayrıca, RRF'in retinal arter dışında sıçan mezenterik, renal (Delaey ve Van de Voorde 1998), karotid (Boussery ve ark. 2002) arterleri ve fare aortası (Boussery ve ark. 2002) gibi farklı damarlar üzerinde de gevşetici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. İlginç olarak, damar dışı bir düz kas olan sıçan bronş düz kasında da retina kaynaklı gevşetici faktörün etkili olduğu gösterilmiştir (Delaey ve Van de Voorde 1998). Tüm bu bulgular, RRF'in retinal arterle sınırlı olmayan daha genel bir gevşetici ajan olduğunu düşündürmektedir (Maenhaut ve ark. 2007). Ayrıca, gerek retinal (Takır ve ark. 2006a; 2006b) gerekse de diğer dedektör dokularda (Delaey ve Van de Voorde 1998, Boussery ve ark. 2002, Boussery ve ark. 2002) yapılan çalışmalar retinanın gevşetici etkisinin tekrar edilebilir nitelikte olduğunu ortaya koymaktadır.

Yapılan biyoassay çalışmalarında, RRF'in polipeptid veya protein yapısında olmayan, hidrofilik karakterde ve ısıya dayanıklı stabil bir faktör olduğu belirlenmiştir (Delaey ve Van de Voorde 1998). pH ve pO_2 basıncındaki değişikliklerin oküler sirkülasyonda damar düz kas tonüsünü etkilediği bilinmektedir (Delaey ve Van De Voorde 2000). Ortam pH'sının değişmesinin RRF'in gevşetici etkisini değiştirmediği

(Delaey ve Van de Voorde 1998) ancak akut hipoksinin ise RRF yanıtını potansiyalize ettiği gösterilmiştir (Delaey ve ark. 2000, Boussery ve ark. 2002, Boussery ve ark. 2002). Retinal arter damar yatağında hipoksi iyi bilinen bir vazodilatör stimulustur. Yüksek oksijen düzeyi, retina gevşemesini azaltırken düşük oksijen düzeyi ise retina gevşemesini stimule etmektedir. Oluşan hipoksi, retinal kan akımını, dokunun metabolik ihtiyacına göre fizyolojik olarak düzenlenmektedir (Hickam ve ark. 1963, Pearce 1995). Retinal metabolizmanın artması (örn. karanlığa adaptasyona bağlı) ve azalan kan akımı (örn. hipotansiyona bağlı) retinal oksijen düzeyini azaltmakta, dolayısıyla metabolik vazodilatasyona neden olmaktadır (Bill ve Sperber 1990). Hipoksik koşulda potansiyalize olan retinal gevşemenin ortamdaki pO₂ basıncının azalmasıyla orantılı olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular doğrultusunda RRF'in hipoksik vazodilatör yanıtın bir mediyatörü olabileceği düşünülmektedir (Delaey ve ark. 2000). Buna göre retinadan serbestlenen RRF'in retinal arter çapının, retinal oksijen düzeyindeki değişikliklere göre uyum sağlamasına aracılık eden bir mekanizma olması mümkündür (Maenhaut ve ark. 2007). Ancak, bu hipoksik vazodilatasyonda RRF'in yanısıra başka mekanizmaların (örn; damarın RRF'e artmış duyarlılığı veya diğer vazodilatör maddelerin serbestlenmesi gibi) rolünün de belirlenmesi gerekmektedir.

RRF'in varlığının ortaya konulmasının ardından çalışmalar, bu faktörün hangi mekanizma ile etki gösterdiğinin aydınlatılmasına yönelik olarak yoğunlaşmıştır. Öncelikle, RRF'in etkisinin endotel bağımlı bir mekanizma ile ilişkili olup olmadığı araştırılmış ve retina ile elde edilen gevşeme yanıtının endotel varlığına ihtiyaç duymadığını ortaya koymuştur (Delaey ve Van de Voorde 1998). Sığır retinal arterinde olduğu gibi sıçan karotid arterinde de RRF'in endotelden bağımsız bir mekanizma ile gevşeme yanıtı oluşturduğu belirlenmiştir (Boussery ve ark. 2002). Ardından RRF'in NO veya siklooksijenaz yolağı ürünleriyle ilişkisi incelenmiştir. NO-sentaz inhibitörü L-nitro-L-arginin (L-NA) varlığında yapılan çalışmalarda RRF'in gevşetici etkisinin ortadan kalkmadığı, NO'nun gevşetici etkisine aracılık eden guanilat siklazın inhibitörleri metilen mavisi (Delaey ve Van de Voorde 1998) ve ODQ (Boussery ve ark. 2002) varlığında retina kaynaklı gevşemede bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Farklı türlerin retinaları ve farklı dedektör damarlarda benzer sonuçlar elde edilmiştir (Boussery ve ark. 2002, Boussery ve ark. 2002). Ayrıca çözünür guanilat siklaz

(sGC $_{\alpha-1}$) geni silinmiş (knock-out) farelerin aortasında RRF yanıtının gözlenmesi de retina kaynaklı gevşemenin sGMP yolağından bağımsız olduğu görüşünü desteklemiştir (Maenhaut ve ark. 2007). Bu bulgular RRF'in NO'dan farklı bir madde olduğunu ortaya koymaktadır.

Öte yandan, siklooksijenaz inhibitörü, indometazin veya diklofenak sodyum varlığında yapılan çalışmalarda RRF'in prostasiklin ve prostaglandin E₁ gibi vazodilatör siklooksijenaz ürünlerinden farklı olduğu belirlenmiştir (Delaey ve Van de Voorde 1998). Bu inhibitörlerin uygulanmasının RRF yanıtını azaltmaması RRF'in bir prostanoid olmadığını veya RRF'in etkisinin prostanoid kaynaklı olmadığını göstermiştir (Boussery ve ark. 2002). Ayrıca, RRF etkisiyle gevşemiş sıçan karotid arterinde ölçülen sAMP düzeyleri aynı kalırken sAMP analogu forskolin ile gevşemiş arterlerde sAMP düzeylerinin yükselmesi bu bulguları desteklemektedir (Maenhaut ve ark. 2007).

Retina kaynaklı gevşetici etkinin hücre içi kalsiyum seviyesini düzenleyen mekanizmalar ile ilişkisi de incelenmiştir. Sarkoplazmik retikulum Ca⁺²- ATPaz (SERCA) inhibitörü tapsigargin ve siklopiyazonik asit varlığında alınan retinal gevşeme yanıtlarının kontrolden farklı bulunmaması RRF gevşemesinin SERCA aktivasyonundan bağımsız olduğu göstermiştir (Boussery ve ark. 2002; Takır ve ark. 2006a). Na⁺-Ca⁺² iyon değiştiricisinin inhibitörleri, DMTU (1,3-dimetil-2-tiyoure) ve amilorid uygulanmasıyla elde edilen bulgularda ise RRF gevşetici etkisinde bu iyon değiştirici mekanizmanın rolünün olmadığı gösterilmiştir (Boussery ve ark. 2002). L-tipi kalsiyum kanal blokörü, nifedipin varlığında retinanın gevşetici etkisini koruması ise RRF yanıtında L-tipi kalsiyum kanallarının önemli bir rolünün olmaması ile açıklanmıştır (Takır ve ark. 2006a). Buna karşın, plazma membran kalsiyum-ATPaz pompası inhibitörü vanadat varlığında retina yanıtında elde edilen anlamlı bir azalma, plazma membran kalsiyum-ATPaz yolu ile kalsiyumun dışa atımının, RRF kaynaklı gevşemede rol oynayabileceğini düşündürmüştür (Boussery ve ark. 2002). Ancak, vanadatin çok spesifik bir inhibitör olmaması, aynı zamanda başka mekanizmaları da etkileyebilmesi (Jin ve ark. 1996) bu yöndeki çalışmaların arttırılmasını gerekli kılmaktadır. Laboratuvarımızda yürütülen bir çalışmada ise RRF'in sığır retinal

arterinde kalsiyumsuz ortamda CaCl_2 ile oluşturulan kasılmaları engellediği ya da tamamen geriye döndürdüğü belirlenmiştir. Bu bulgular doğrultusunda retinanın, düz kasta kontraktıl proteinlerin kalsiyuma karşı duyarlılığını azaltarak gevşemeye neden olduğu ileri sürülmektedir (Takır ve ark. 2006a).

Sığır retinal arterinde yapılan çalışmalarda retina kaynaklı gevşetici faktörün retina kaynaklı nörotransmitterlerden glutamat, glisin, GABA, dopamin ve melatonin ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir (Delaey ve Van de Voorde 1998). Retinal nöronlardan nörotransmitter serbestlenmesini inhibe eden tetradotoksin varlığında RRF yanıtının alınabilmesi ise RRF'in nöronal hücrelerden çok glial hücreler tarafından serbestleniyor olma ihtimalini güçlendirmiştir (Delaey ve Van de Voorde 1998). RRF'in adenozin olabileceği düşünülmüş, ancak non spesifik adenozin reseptör blokörü 8-fenilteofilin varlığında da RRF yanıtının alınması (Delaey ve Van de Voorde 1998) ayrıca, adenozinin çok yüksek konsantrasyonlarının bile RRF'den zayıf bir gevşetici etki oluşturması, RRF'in adenozin olmadığı görüşünü desteklemiştir (Boussery ve ark. 2002).

Gözün normal fizyolojik yapısında (Taniguchi ve ark. 1999) ve ayrıca bazı oküler hastalıkların patofizyolojisinde adrenomedulinin rolü olduğu rapor edilmektedir (Clementi ve ark. 2000). İzole sığır retinal arterinde adrenomedulin uygulanması ile gevşeme yanıtı oluşması RRF'in adrenomedullin olabileceğini düşündürmüştür. Ancak, adrenomedulin ile oluşan gevşemenin endotel aracılı olması ve RRF'den farklı olarak gevşetici etkisinin CGRP_1 (kalsitonin geni ile ilişkili peptid) reseptör antagonisti CGRP 8-37 varlığında ortadan kalkması RRF'in adrenomedulin olmadığını ortaya koymuştur (Boussery ve ark. 2002, Boussery ve ark. 2004). Öte yandan, sığır retinal arterinde endotelial NO aracılı gevşemeye neden olan CGRP lokal retinal kan akımında etkili olan bir düzenleyicidir (Boussery ve ark. 2005). Ancak, RRF yanıtının endotelden bağımsız olarak meydana gelmesi gevşetici etkisinin CGRP ile ilişkili olmadığını göstermektedir (Delaey ve Van de Voorde 1998).

Retinal kan akımının düzenlenmesinde lokal natriüretik peptidlerin de önemli olduğu bildirilmektedir (Rollin ve ark. 2004). Bu doğrultuda RRF'in ANP (atriyal natriüretik peptid), BNP (beyin natriüretik peptid) ve CNP (C-tipi natriüretik peptid) ile ilişkili olabileceği düşünülmüş ancak yapılan araştırmalarda bu lokal natriüretik peptidlerden hiçbirinin prostaglandin $F_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilmiş izole retinal arterlerinde gevşeme oluşturmadığı gözlenmiştir (Boussery ve ark. 2005).

RRF'in bugüne kadar yapılan çalışmalarla tanımlanabilmiş genel özellikleri ile retinal sirkülasyonun lokal olarak düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Herhangi bir spesifik stimula ihtiyaç duymaksızın devamlı olarak serbestlendiği düşünülen bu faktörün özellikle gözle ilişkili olan patofizyolojik durumlarda önemli olacağı öngörülmektedir. RRF'in retinal sirkülasyondaki, esas fizyolojik önemi ise ancak tanımlanmasının ve selektif antagonistlerinin bulunmasıyla açıklanabilecektir.

2.4. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus, hiperglisemi, lipid ve protein metabolizmalarındaki bozuklukların eşlik ettiği göreceli veya mutlak insülin eksikliği sendromudur. İnsülin karbonhidrat içeren besin alımının ardından kana geçen glukozun etkisiyle pankreasın langerhans adacıklarındaki β -hücrelerinden salgılanmaktadır. Salgılanan insülin, glukozun vücutta bütün dokular ve özellikle kaslar, yağ dokusu ve karaciğer tarafından hızla yakalanması, depolanması ve kullanılmasına aracılık etmektedir.

Diyabetin tarihsel olarak ilk farkedilen bulguları glukoz metabolizması ile ilişki olduğundan klinik ve laboratuvar incelemeleri açısından bu verilere önem verilmiştir. Ancak esasen, diyabet yalnızca glukoz metabolizmasının değil, lipid ve protein metabolizmalarının da bozukluğu ile ilişkili bir patolojidir. Diyabet tanısında göz önünde bulundurulmuş başlıca parametre plazma glukoz düzeyidir. Açlık kan glukoz düzeyinin >126 mg/dl olması ve günün herhangi bir saatinde kan glukoz düzeyinin >200 mg/dl ölçülmesi halinde diyabet düşünülmektedir. Ayrıca, glikozillenmiş hemoglobin (HbA_{1C}) düzeyi de diyabet tanısında kullanılan belirleyici bir parametredir.

HbA_{1c}, kan glukoz düzeyinin ölçümünde olduğu gibi ölçüm anındaki glisemi düzeyini değil, son 2-3 ay içindeki gliseminin ortalama düzeyini göstermektedir. Glikozillenmiş hemoglobinin total hemoglobine oranı normalde %5-8 kadarken, uzun süren hiperglisemide %15 ve üzerine çıkmaktadır (Kayaalp, 2005 pp. 1039-1076; Gardner ve Shoback, 2007 pp.661-747).

Diyabetes mellitusun en erken görülen semptomları arasında polidipsi (aşırı su içme), polifaji (aşırı yemek yeme), poliüri (aşırı idrara çıkma), kilo kaybı ve asteni (halsizlik) yer almaktadır.

2.4.1. Diabetes Mellitus ve Tipleri

Diyabetin, Amerikan Diyabet Derneği ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından belirlenen tipleri aşağıdaki gibidir:

- 1)Tip I Diyabet
- 2)Tip II Diyabet
- 3)Gestasyonel Diyabet
- 4)Diğer tipler
 - a) β -hücrelerinin genetik olarak bozukluğu ile gelişen
 - b)İnsülin etkinliğinin genetik olarak bozukluğu ile gelişen
 - c)Pankreas hastalıklarına bağlı olarak ortaya çıkan
 - d)Endokrin sistem bozuklukları ile gelişen
 - e)İlaç veya kimyasallar ile oluşan
 - f)Enfeksiyonlara bağlı olarak gelişen
 - g)Sık rastlanmayan immün sistem rahatsızlıkları ile ortaya çıkan
 - h)Diğer genetik bozukluklar ile ilişkili olarak gelişen

2.4.1.1. Tip I Diyabet

İnsüline bağımlı diyabet tipi olarak da bilinmektedir. %90 oranında immün sistem ile ilgili, %10 oranında ise idiyopatik olarak gelişmektedir. Genellikle çocukluk çağında ve genç erişkinlerde olmak üzere her yaşta ortaya çıkabilmektedir. Tip I diyabet genetik olarak yatkınlığı olan bireylerde enfeksiyon (genellikle viral enfeksiyonlar) sonucu veya bireyin toksik çevresel koşullardan (toksik kimyasallar ve sitotoksinler) etkilenmesi ile pankreasın β -hücrelerinin kendi immün sistemlerince harap edilmesi sonucu oluşmaktadır. β -hücrelerinin harabiyeti sonucunda insülinojenik stimuluslara yanıt verilememekte, sonuç olarak dolaşımdaki insülin yokluğunu takiben plazma

glukagon miktarı artmaktadır. İnsülin yokluğunda, insülinin hedef dokuları (karaciğer, kas ve yağ dokusu), glukozu ve diğer besin maddelerini uygun bir şekilde absorbe edememektedir. Hedef dokular depolarından glukoz, amino asitler ve yağ asitlerini dolaşıma göndermekte ve karaciğerde bu moleküllerin ketonlara (asetoasetat, β -hidroksibutirat ve aseton) dönüşümü artmaktadır. İnsülin yokluğunda ketonların oluşumunun artışı glukozun ve ketonların periferal kullanımlarının azalmasına ve kanda bu moleküllerin birikmesine (diyabetik ketoasidoz) yol açmaktadır. Keton cisimlerinin birikimi metabolik asidoz oluşumuna neden olmaktadır. Ketoasidoz mide bulantısı ve kusma şeklinde belirtilere yol açmaktadır. Bunun sonucunda vasküler tonüs azalmakta ve intravasküler hacim kaybı oluşmaktadır. Organizmaya insülin verilmesi ile bu durum geri döndürülebilmektedir.

İnsülin, Tip I diyabette kullanılabilir tek ilaçtır. İnsülin insan veya hayvan kaynaklı olarak üretilip modifiye edilmiş (regüler insülin) ve modifiye edilmemiş (kısa etki süreli) formlar şeklinde parenteral (subkütan (s.c.) veya intravenöz (i.v.)) olarak uygulanmaktadır. Ayrıca, son yıllarda transdermal, oküler, oral (enterik kaplı), bukkal, nazal, rektal, vajinal ve intrauterin uygulama teknikleri denenmektedir. Halen en fazla denenmiş ve tıbbi kullanıma yeni girmiş olan formülasyonu inhaler insülinidir (Kayaalp, 2005 pp.1039-1076; Daneman 2006; Gardner ve Shoback, 2007 pp.661-747).

2.4.1.2. Tip II Diyabet

İnsülin bağımsız diyabet tipi olarak da bilinen Tip II diyabette pankreasın β -hücrelerinde insülin yapımı ve depolanmasında genellikle bir bozukluk yoktur. Ancak temel bozukluk hedef hücrelerde insülin reseptörü sıklığının azalması veya hücre içinde reseptör sonrası düzeyde insülin etkinliğinin azalması ile insüline direnç gelişmesidir. İnsülin yapımı ve depolanması ile ilgili bir değişiklik olmamasına rağmen β -hücrelerinden insülin salgılanmasında, periferde oluşan bu rezistansı kıramayacak boyutta göreceli bir azalma söz konusudur. Kandaki insülin oranı biraz azalmış, normal veya artmış bulunabilir. Tip II diyabet, kalıtım ve ailesel yatkınlık (predispozisyon) ile

yakından ilişkilidir (Kayaalp, 2005 pp.1039-1076; Gardner ve Shoback, 2007 pp.661-747).

Bireylerde diyabete çoğunlukla obezite de eşlik etmektedir. Tip II diyabetin obez (şişman) ve non-obez (şişman olmayan) alt tipleri vardır. Obezitenin eşlik ettiği Tip II diyabet olguların %60-80'ni oluşturmaktadır. Aşırı beslenme sonucu besin maddelerinin kandan hücrelere geçip depolanmasının azalmasına bu da β -hücrelerinin stimülasyonuna ve hiperinsülinizme neden olmaktadır. Hiperinsülinizm hedef hücrelerde reseptör sıklığını azaltmakta ve reseptör sonrasında insülin yanıtında azalmaya yani insülin direncine yol açmaktadır. Obez Tip II diyabetlilerde insülin direnci ile birlikte hiperinsülinemi, dislipidemi ve hipertansiyon görülmektedir. Bu bireylerde koroner kalp hastalıklarına yakalanma ve miyokard enfarktüs görülme riski yüksektir (Gardner ve Shoback, 2007 pp.661-747).

Obez olmayan Tip II diyabet grubu olguların %20-40'nı oluşturmaktadır. Patojenezinde insülin direnci de olabildiği gibi β -hücresi disfonksiyonunun rol oynadığı düşünülmektedir (Gardner ve Shoback, 2007 pp.661-747).

Tip II diyabet sıklıkla tanı konulmadan yıllarca sürer çünkü hiperglisemi yoğun olarak gelişmez ve asemptomatiktir. Ancak bu bireylerde makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyon oluşma riski yüksektir. Tedavi esası, hipergliseminin olabildiğince normal sınırlara düşürülmesi veya bu sınıra yakın tutulmasıdır. Buna göre, Tip II diyabetin tedavisinde ilk tercih kan glukoz seviyesinin diyet ve egzersiz ile düşürülmesidir. Bu yolla kan glukoz seviyesi optimum sınırlara düşürülemez ise oral antidiyabetik bir ilaç tedaviye eklenir. Tek bir ilacın yeterli olmaması halinde ilaç kombinasyonları uygulanır. Ancak bununda yetersiz kaldığı durumlarda insülin tedavisine geçilir. Son zamanlarda, halen etkin kalan β -hücrelerinin korunması ve glukoz toksisitesinin önlenmesi açısından insüline geçiş ve erken kombinasyon tedavileri önem kazanmıştır (Kayaalp, 2005 pp.1039-1076; Gardner ve Shoback, 2007 pp.661-747).

2.4.1.3. Gestasyonel Diyabet

Genellikle gebelerin %2-8'inde, gebeliğin ikinci yarısında glukoz toleransının bozulması ve insüline duyarlılığın azalması ile oluşmaktadır. Çoğunlukla geçici diyabet durumudur ancak belirtilerin doğumdan sonrada devam etmesi durumunda kalıcı diyabet de oluşabilmektedir. Gebelik süresince annenin ve bebeğin hekim tarafından düzenli olarak kontrol edilmesi ile oluşabilecek hasar önlenmektedir. Gestasyonel diyabet tedavisinde kullanılabilir tek ilaç insülinidir (Kayaalp, 2005 pp.1039-1076; Gardner ve Shoback, 2007 pp.661-747).

2.4.2. Diabetes Mellitus ile İlişkili Akut Komplikasyonlar

Diabetes mellitus ile ilişkili başlıca akut komplikasyonlar hipoglisemi, diyabetik ketoasidoz ve laktik asidozdur.

i. Hipoglisemi

Çoğunlukla insülin tedavisi gören bireyler ile sülfonilüre türevi ilaç tedavisi alan karaciğer ve böbrek hasarı bulunan yaşlı bireylerde ortaya çıkmaktadır. Kan glukoz düzeyinin aniden normal sınırların altına düşmesi (<50-60 mg/dl) ile karakterizedir. Hipoglisemi, öğün alımının gecikmesi, kalori ilavesi yapılmadan normalden fazla egzersiz yapılması veya insülin dozunun artırılması sonucu oluşmaktadır. Başlıca belirtiler taşikardi, terleme, kan basıncı yükselmesi, titreme, sinirlilik, açlık ve halsizlik hissidir. Belirtiler kan glukoz düzeyinin düşme hızına göre değişmektedir. Kan glukoz düzeyinin <35 mg/dl olması durumunda konvülsiyonlar oluşur. Hipogliseminin acil tedavisi beyin hasarının önlenmesi açısından önemlidir. Tedavide %50'lik glukoz solüsyonu (i.v.) veya 0,5 mg glukagon (i.v. veya intarmüsküler (i.m.)) kullanılmaktadır (Kayaalp, 2005 pp.1039-1076; Gardner ve Shoback, 2007 pp.661-747).

ii. Diyabetik Ketoasidoz

Diyabetle ilişkili akut komplikasyonlar arasında hipoglisemiden sonra ikinci sırada gelen ölüm nedenidir. Özellikle Tip I diyabetli bireylerde olmak üzere ağır stres (travma, cerrahi girişim ve sepsis gibi) durumunda Tip II diyabetli bireylerde görülmektedir. Mutlak veya göreceli insülin eksikliği sonucu ortaya çıkmaktadır. Metabolik homeostazın bozulmasıyla karakterizedir. Tedavide sıvı replasmanının sağlanması oldukça önemlidir (Kayaalp, 2005 pp.1039-1076; Gardner ve Shoback, 2007 pp.661-747).

iii. Laktik Asidoz

Diyabetli bireylerde şokun eşlik ettiği miyokard enfarktüsü, sepsis ve fazla kanama veya ağır anemi, ağır akciğer hastalığı ve ağır karaciğer yetmezliği veya zehirlenmeler sırasında oluşmaktadır. Kanda laktik asid birikmesiyle karakterizedir. Tedavisi laktik asid birikmesine yol açan primer hastalığa yönelik olarak yapılmaktadır (Kayaalp, 2005 pp.1039-1076; Gardner ve Shoback, 2007 pp.661-747).

2.4.3. Diabetes Mellitus ile İlişkili Kronik Komplikasyonlar

Diyabet ile ilişkili kronik komplikasyonlar başlıca vasküler sistem olmak üzere sinirler, deri ve göz ile ilişkilidir. Bu komplikasyonlara ek olarak diyabetli bireylerin bazı enfeksiyonlara yakalanmaya daha yatkın oldukları bilinmektedir. Ayrıca sağlıklı insanlara göre enfeksiyonlar ile mücadelede daha zayıftırlar.

2.4.3.1. Vasküler Komplikasyonlar

Diyabet ile ilişkili vasküler komplikasyonlar iki ana başlık altında toplanır:

i. Mikrovasküler hastalığa bağlı komplikasyonlar

Kapillerlerin ve prekapiller arteriollerin, kapiller bazal membran kalınlıklarının artışı ile oluşmaktadır. Diyabetik retinopati, diyabetik nefropati ve kardiyak mikrovasküler hastalığa bağlı kardiyomegali ve kardiyak yetmezlik bu gruptadır (Jin ve ark. 2008).

ii. Makrovasküler hastalığa bağlı komplikasyonlar

Büyük çaplı damarlarda aterosklerozun hızlanmasına bağlı olarak gelişmektedir. Damar duvarı anormallikleri, pıhtılaşma faktörleri, kırmızı kan hücreleri ve lipid metabolizmasındaki değişiklikler önemli rol oynamaktadır. Ayrıca bireyin sigara kullanımı ve hipertansiyon gelişmesi risk faktörleri arasındadır. Koroner kalp hastalığı ve inme gelişimi bu komplikasyonların bir sonucudur (Gardner ve Shoback, 2007 pp.661-747).

Alt ekstremitelerde oluşan iskemi, impotens ve bağırsak anjinası da diyabetin yol açtığı periferel vasküler komplikasyonlar arasındadır. Alt ekstremitelerde oluşan iskemi sonucu gelişen gangren insidansı sağlıklı kişilere göre diyabetli bireylerde 30 kat daha yüksektir. Gangrenin oluşma nedenleri arasında periferel vasküler hastalıkların yanında, küçük damarların hastalığı, periferel nöropati sonucu ağrı hissinde azalma, nörojenik enflamasyon yanıtları ve ikincil enfeksiyonlar bulunmaktadır. Diyabetik ayak ülseri oluşumu halinde medikal tedavi sağlanması ileride ekstremitte kaybının önlenmesi açısından oldukça önemlidir (Gardner ve Shoback, 2007 pp.661-747).

2.4.3.2. Kardiyak Komplikasyonlar

Kalpte mikroanjiyopati sonucu gelişen konjestif kalp hastalıkları ile kardiyomiyopati sonucu gelişen koroner arter hastalıkları diyabetli bireylerde sıkça gelişen komplikasyonlardır. Ayrıca, miyokard enfarktüsü, diyabetli bireylerde sağlıklılara göre 3-5 kat daha yaygın olarak görülmektedir. Diyabetlilerde artan miyokard enfarktüsü insidansının kesin nedeni ortaya konulamamıştır. Ancak bu artışa hiperlipidemi, koagülasyon faktörlerinin anormallikleri, hipertansiyon, oksidatif stress ve enflamasyonun aracılık ettiği düşünülmektedir (Gardner ve Shoback, 2007 pp.661-747).

Yapılan çalışmalarda diyabetli bireylerde miyokard enfarktüsünden korunmak amacıyla kan basıncının $\leq 130/80$ mmHg düzeyinde tutulmasının ve aspirin kullanımının yararlı olacağı gösterilmiştir (Gardner ve Shoback, 2007 pp.661-747).

2.4.3.3. Göz ile İlişkili Komplikasyonlar

i. Diyabetik retinopati

Diyabetik retinopati gelişmiş ülkelerde görme bozukluklarının ve görme kaybının başlıca nedenleri arasındadır. Adolesan çağıdaki veya yetişkin Tip I diyabetli bireyler ile Tip II diyabetli bireylerin tümü retinopati açısından risk altındadır. Ayrıca, diyabete eşlik eden hipertansiyon da diyabetik retinopatinin insidansının artmasına neden olmaktadır. Diyabetik retinopati proliferatif olmayan ve proliferatif olan şekilde ikiye ayrılmaktadır (Aiello 2003, Dodson 2007).

Proliferatif olmayan retinopati retinal hasarın erken evresidir. Mikroanevrizmalar, nokta hemoraji ve retinal ödem ile karakterizedir. Bu dönem boyunca retinal kapillerlerden retina içerisine protein, lipid ve kırmızı kan hücreleri sızmaktadır. Bu olay görme hücrelerinden zengin makula tabakasında gerçekleştiğinde

Tip II diyabetli bireylerde sıklıkla gözlenen görme bozukluklarının nedenini oluşturmaktadır (Aiello 2003).

Proliferatif retinopati, Tip II diyabette de görülebileceği gibi, esas olarak Tip I diyabette daha yaygın olarak görülmektedir. İnce damarların oklüzyonu sonucu retinal hipoksi oluşmakta ve bu durum retina içerisinde ve vitröz kısımda yeni kapillerlerin (neovaskülarizasyon) ve fibröz dokunun oluşmasına neden olmaktadır. Arterioller iskemi ve retinada küçük infarkt alanları ile öne çıkan proproliferatif dönem proliferatif retinopatinin erken evresidir. Görme kaybı, vitröz hemoraji veya retina dekolmanı sonucu oluşmaktadır. 10 yıllık bir diyabet sürecinde bireylerin %50'sinde herhangi bir evrede retinopati görülürken 15 yıllık süreçte bu oran % 80'e çıkmaktadır (Aiello 2003).

Diyabetik retinopatide etkilenen esas kısım retinal mikrodamarlardır. Kapiller endotel hücrelerinin bütünlüğü, çevresindeki retinal dokunun homeostazında oldukça önemlidir. Metabolik ve hücresel düzeyde gelişen değişimleri, diyabetik retinopatinin klinik belirtileri ortaya çıkmadan önce gözlenebilmektedir (Şekil 2-2). Proinflamatuvar transkripsiyon faktörü olan NF κ B'nin diyabetik retinopatinin patojenezinde önemli rolü olduğu belirlenmiştir. Hiperglisemi ile indüklenen biyokimyasal reaksiyonlar sonucu NF κ B aktivasyonunun olduğu ve bu faktörün VEGF, interlökin-1 (İL-1), Tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), transforme edici büyüme faktörü (TGF β) gibi sitokinleri ve CD18, ICAM-1 ve vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) gibi adezyon moleküllerini, ve ayrıca iNOS ve siklooksijenaz-2 (COX-2) gibi proinflamatuvar enzimlerin ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (Goto ve ark. 2005, Toda ve Nakanishi-Toda 2007). Ayrıca, diyabetin başlangıcından kısa bir süre sonra, henüz fonsiyonel ve histolojik bozukluklar başlamadan önce, sitokinlerin arttığı (upregule olduğu) gösterilmiştir. (Kaji ve ark. 2007).

Diyabetin erken döneminde, özellikle protein kinaz C (PKC) ve ayrıca hiperglisemi ile ilişkili diğer biyokimyasal yolların aktivasyonu sonucunda vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) oluşumunun indüklendiği gösterilmiştir. VEGF aktivasyonunun interselüler adezyon molekül-1 (ICAM-1) ekspresyonunu arttırarak

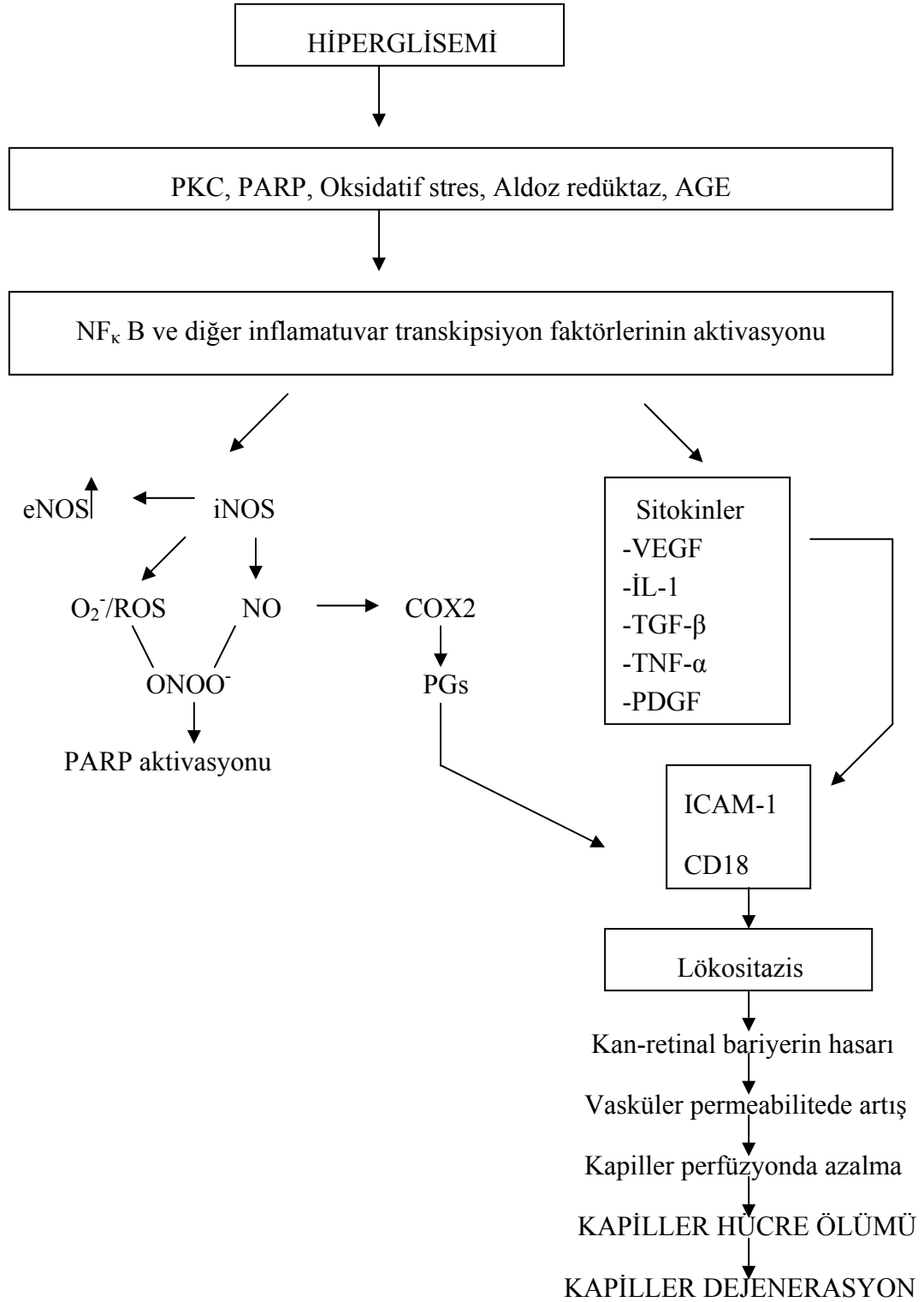
retinal damarlarda lökosit adezyonuna neden olduğu ve böylece kan-retina bariyerinin bozulmasında rol oynadığı bildirilmektedir. VEGF'nin ayrıca diyabetik retinopatide artan vasküler permeabiliteye aracılık ettiği ve anjiogenezi stimule eden önemli bir faktör olduğu da belirlenmiştir. Bunların yanısıra, VEGF'nin diyabette endotelin-1 ve nitrik oksit düzeylerinde gözlenen artış ile ilişkili olduğu ve ekspresyonunun bir proinflamatuvar transkripsiyon faktörü olan nüklear faktör kappa B (NF κ B) tarafından düzenlendiği gösterilmiştir. Ayrıca, diyabetik retinopatide artan trombosit kaynaklı büyüme faktörün (PDGF) ekspresyonunun VEGF oluşumunu artırdığı ortaya konulmuştur (Cukiernik ve ark. 2004).

Diyabetik insanların ve hayvanların retinalarında iNOS ekspresyonunun arttığı gözlenmiş ve iNOS'un diyabetik retinopatinin patojenezinde önemli rol oynadığı öngörülmüştür. iNOS'un spesifik inhibitörü aminoguanidinin kullanıldığı ya da iNOS geni silinmiş hayvanlarda yapılan çalışmalarda diyabetik retinopatiye ait hücresel hasarın ve ilişkili göstergelerin geriye dönmesi bu görüşü desteklemiştir (Kern 2007). iNOS etkisi ile aşırı miktarda oluşan NO'nun diyabette artan serbest radikaller ile birleşerek peroksinitrit (ONOO⁻) oluşumunu arttırdığı, ONOO⁻ ise gerek direk hücresel toksik etki ile gerekse poli adenzin (difosfo-riboz) polimeraz (PARP) aktivasyonu aracılığı ile kapiller dejenerasyona neden olduğu bildirilmektedir (Kern 2007).

Diyabetik hayvanların retinalarında COX-2 enziminin indüklendiği ve prostaglandin oluşumunun arttığı rapor edilmektedir (Joussen ve ark. 2002, Du ve ark. 2004). Destekleyici olarak COX-2 inhibisyonunun retinal prostaglandin ve VEGF oluşumunu azalttığı buna paralel olarak, retinal damar geçirgenliğinde ve lökositazisteki (lökositlerin damar duvarına çekilmesi ve adezyonu) artışı geriye döndürdüğü gösterilmiştir (Kern 2007).

Retinada ileri glikasyon sonu ürünleri (AGE) oluşumunun da önemli rolü olduğu bildirilmektedir. Diyabetik retinal damarlarda AGE oluşumu gösterilmiş ve diyabetik olmayıp i.v. enjeksiyon ile AGE alan hayvanlarda da diyabetik retinopatinin karakteristik özellikleri gözlenmiştir (Stitt ve ark. 2000, Moore ve ark. 2003). AGE'nin

spesifik reseptörü (RAGE) ile etkileşiminin oksidatif stresi ve NF κ B aktivasyonunu artırdığı ve böylece kan retinal bariyerinin bozulmasına ve retinal lökositozise aracılık ettiği bildirilmektedir (Kaji ve ark. 2007).



Şekil 2-2: Diyabetik retinopatinin oluşumunda rol oynayan hücresel mekanizmalar.

PKC: Protein kinaz C, **PARP:** Poli adenozin (difosfo-riboz) polimeraz, **AGE:** İleri glikasyon sonu ürünleri, **NF κ B:** Nükleer faktör kappa B, **NO:** Nitrik oksit, **eNOS:** endotelial nitrik oksit sentaz, **iNOS:** indüklenebilen nitrik oksit sentaz, **ROS:** Serbest oksijen radikalleri, **COX2:** Siklooksijenaz 2, **PGs:** Prostaglandinler, **ONOO⁻:** Peroksinitrit, **ICAM-1:** İnterselüler adhezyon molekülü-1, **CD18:** Adhezyon molekülü, **VEGF:** Vasküler endotelial büyüme faktörü, **İL-1:** İnterlökin-1, **TGF-β:** Transforming büyüme faktörü-β, **TNF-α:** Tümör nekroz faktörü-α, **PDGF:** Trombosit kaynaklı büyüme faktörü.

Diyabetik retinopatide rol oynadığı belirlenen bu hücrel mekanizmalar doğrultusunda aldoz redüktaz inhibitörleri, protein kinaz C inhibitörleri, tirozin kinaz inhibitörleri, aspirin (non selektif COX inhibitörü), steroidler, VEGF antagonistleri, TNF α reseptör antagonistleri, minosiklin, PARP inhibitörleri ile antioksidanların kullanımının ve ayrıca AGE/RAGE etkileşiminin engellenmesinin diyabetik retinopatinin tedavisinde yararlı olacağı öngörülmektedir (Kern 2007). Bunun yanısıra halen fonksiyonel kalan canlı dokunun daha yüksek oranda oksijenden yararlanabilmesi ve böylece hipoksi sonucu yeni damar oluşumunun (neovaskülarizasyon) azaltılması da diyabetik retinopati tedavisinde hedeflenen mekanizmalar arasındadır (Gardner ve Shoback, 2007 pp.661-747).

ii. Katarakt

Diyabetik bireylerde, subkapsüler katarakt ve senil katarakt olmak üzere iki tip katarakt oluşmaktadır. Sübkapsüler katarakt lens kapsülünün hemen altında oluşmakta ve Tip I diyabetlilerde daha yaygın olarak görülmektedir. Kontrol altına alınmamış diyabet sonucu oluşan hiperglisemi ile katarakt oluşumu ve hızla ilerlemesi arasında belirgin bir korelasyon vardır. Senil katarakt lens nükleusunda sklerotik değişiklikler ile oluşmakta ve özellikle glisemik kontrolün zayıf olduğu diyabetli bireylerde görülmektedir (Gardner ve Shoback, 2007 pp.661-747).

iii. Glokom

Diyabetli bireylerin yaklaşık %6'sında görülmektedir. Diyabetin optik sinir liflerini mikrovasküler iskemiye duyarlılaştırması ile diyabetik bireylerin glokoma yatkınlığının arttığı gözlenmiştir (Gardner ve Shoback, 2007 pp.661-747).

2.4.3.4. Renal Komplikasyonlar

i. Diyabetik nefropati

Diyabetik nefropati, Tip I diyabetli bireylerde Tip II diyabetlilere göre daha sık görülmektedir. İlk olarak proteinüri ile ortaya çıkar ve böbrek fonksiyonlarının bozulması sonucu üre ve kreatinin kanda birikmesiyle devam eder. Ayrıca, diyabetik nefropati ile birlikte artmış mikroalbüminüre de görülebilmektedir. Glisemik kontrolün düzenli ve dikkatli yapılması erken diyabet dönemindeki hastaları hiperfiltrasyon ve mikroalbüminüreden korumaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalar, düşük protein ağırlıklı beslenmenin ve hipertansiyon olmaksızın anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri ya da anjiyotensin II reseptör blokerleri ile tedavinin diyabetik hastalarda mikroalbüminüreyi azaltmakta yararlı olduğunu göstermektedir (Gardner ve Shoback, 2007 pp.661-747).

ii. Progresif diyabetik nefropati

Proteinüre, hipotalbüminemi, ödem ve dolaşımda düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) yükselmesiyle karakterizedir. İlerleyici diyabetik nefropati ile birlikte hipertansiyon, koroner ve serebral ateroskleroz hızlanmaktadır (Gardner ve Shoback, 2007 pp.661-747).

2.4.3.5. Nörolojik Komplikasyonlar

Tip I ve Tip II diyabette sıkça görülen komplikasyonlardan biridir. Patojenezi halen tam olarak bilinmemektedir.

i. Periferik nöropati

Diyabetik ayak sendromu oluşumunun nedenlerinden biri olan periferik sinirlerin hasarı ile ortaya çıkan periferik nöropati motor fonksiyon bozukluklarına yol açmaktadır. Başlıca belirtileri arasında özellikle geceleri ortaya çıkan ve hafif

dokunmaya karşı aşırı hassasiyet ile karakterize yanma şeklinde ağrı bulunmaktadır (Gardner ve Shoback, 2007 pp.661-747).

ii. Otonomik nöropati

Uzun dönem diyabetlilerde sıklıkla görülmektedir. Otonomik nöropati çeşitli sistemleri tutarak diyabetik gastroparezi, kronik diyare, sfinkter kusurları, istirahat taşikardisi, postural hipotansiyon ve impotense (iktidarsızlık) neden olmaktadır (Gardner ve Shoback, 2007 pp.661-747).

2.4.3.6. Deri İle İlişkili Komplikasyonlar

Vaskülopati ve doku proteinlerinin artmış glikolizasyonu sonucu oluşan kahverengi lekeler ile karakterize olan diyabetik dermopati diyabetin deri üzerinde oluşturduğu komplikasyonlar arasındadır (Gardner ve Shoback, 2007 pp.661-747).

2.4.3.7. Enfeksiyona Eğilim

Diyabetik bireylerde sağlıklı insanlara kıyasla kandida enfeksiyonları daha sıklıkla görülmektedir. Özellikle kontrol altına alınmamış kronik diyabetli bayanlarda vulvovajinit yaygın olarak görülmektedir. Diyabetli bireylerin enfeksiyonlara yakalanma riski sağlıklı bireylere göre yüksektir. Diyabetli bireyler sağlıklı insanlara göre enfeksiyonla güçlükle mücadelede ederler (Gardner ve Shoback, 2007 pp.661-747).

Diyabet ile ilişkili kronik komplikasyonların diyabet tiplerine göre prevalansı farklılık göstermektedir. Bu komplikasyonlar her iki diyabet tipinde de gelişebileceği gibi bazıları belirli bir tipte daha sık görülmektedir. Tip I diyabette mikrovasküler nefropatiye bağlı gelişen böbrek yetmezliği sıklıkla oluşurken Tip II diyabette maküler ödem ve iskemiye bağlı gelişen görme kaybı yaygındır. Tip I diyabette oluşan görme

kaybı çoğunlukla proliferatif retinopati kaynaklı vitröz hemoraj ve retina dekolmanı sonucu oluşmaktadır. Ayrıca, Tip I diyabette otonomik nöropati, gastroparezi ile birlikte diyabetik diyare ve dinlenme taşikardisi ve postural hipotansiyon görülmektedir (Gardner ve Shoback, 2007 pp.661-747).

2.4.4. Diyabet ve Endotel Disfonksiyonu

Diyabet ile ilişkili vasküler hastalıkların oluşumunda rol oynayan temel durum, endotel tabakasının düzenleyici rolünü kaybetmesidir. Damar endoteli başlıca vasküler tonusun ve geçirgenliğinin düzenlenmesi olmak üzere, koagülasyon ve fibrinoliz arasındaki dengenin sağlanması, subendotelyal matriks birleşiminin korunması, lökositlerin adezyonunun ve ekstrasvazyonunun düzenlenmesi, damar duvarındaki enflamatuvar aktivitenin düzenlenmesi ve endotel hücreleri dışında kalan diğer hücrelerin (düz kas hücreleri, trombositler, lökositler, retinal perisitler, renal mesangial hücreler, büyük arterlerin makrofajları gibi) fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Buna göre, diyabete bağlı olarak oluşan makro ve mikrovasküler hastalıkların temelinde yatan patolojik durum, endotel fonksiyonun hasarlanması sonucu oluşan endotel disfonksiyondur (Schalkwijk ve Stehouwer 2005).

DeneySEL diyabet modellerinde ve diyabetik insanlarda yürütülen *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda genel olarak endotel aracılı yanıtların bozulduğu bildirilmektedir (Gazis ve ark. 1999, Vallejo ve ark. 2000, Rizzoni ve ark. 2001, Ajay ve ark. 2006, Elmi ve ark. 2008). Esasen endotel disfonksiyonu direkt olarak ölçülememektedir. Ancak, indirekt olarak endotel disfonksiyonun belirlenmesi endotel bağımlı vazodilatasyonun incelenmesi, endotel kaynaklı çeşitli düzenleyici faktörlerin (endotelin-1, von Willebrand faktör (vWF), sTrombomodulin, doku tipi plazminojen aktivatörü (t-PA), plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1), VCAM-1, ICAM-1, hücreSEL fibronektin ve tip IV kolajen plazma düzeylerinin ölçülmesi ve mikroalbuminüreye düzeyinin tayini ile mümkün olabilmektedir. Ayrıca, arteryal sertlik ve karotid arterde intima/media kalınlığının ölçümü de endotel disfonksiyon hakkında bilgi verebilecek vasküler özelliklerdendir. Ancak, bu parametrelerin endotel disfonksiyonu ne kadar doğru yansıttığı da tartışmalıdır (Schalkwijk ve Stehouwer 2005).

Diyabette endotel disfonksiyonun oluşumundan sorumlu başlıca 3 mekanizma öngörülmektedir (Schalkwijk ve Stehouwer 2005):

- i. Hiperglisemi ve etkili olduğu biyokimyasal mekanizmalar.
- ii. Yüksek glukoz düzeyinin indirekt olarak diğer hücrelerde büyüme faktörlerinin ve vazoaaktif maddelerin sentezini artırması sonucu endotel fonksiyonu etkilemesi.
- iii. Metabolik sendrom oluşturan durumların endotel fonksiyonu üzerine etkileridir.

i. Hiperglisemi ve etkili olduğu biyokimyasal mekanizmalar

Hipergliseminin endotel disfonksiyonu oluşturmada etkili olduğu düşünülen 4 biyokimyasal mekanizma bulunmaktadır.

a) Sorbitol yolağı

Bu yolak glukozun aldoz redüktaz ile sorbitol ve ardından fruktoza dönüşmesini içermektedir. Diyabet ile birlikte intraselüler glukoz düzeyinin artışı sorbitol yolağı aracılığı ile glukozun sorbitole dönüşmesi artmaktadır. Bu durum üç mekanizma ile endotel disfonksiyona yol açmaktadır. İlki, oluşan sorbitolün birikimi sonucu osmotik stres oluşmasıdır. İkincisi, sitozolik NADH/NAD⁺ oranındaki artış ile dokuda hipoksik bir durumun oluşumudur. Endotel disfonksiyona yol açan üçüncü durum ise, redoks dengesinin değişmesi sonucu trioz fosfataz birikimi ile AGE (ileri glikasyon son ürünleri) oluşumu ve oksidatif stresin artmasıdır (De Vriese ve ark. 2000, Brownlee 2001, Schalkwijk ve Stehouwer 2005).

b) DAG/PKC yolağı

Diaçil gliserol (DAG) oluşumunun artışı ile protein kinaz C (PKC) yolağının aktivasyonunun direkt veya indirekt olarak vasküler geçirgenliğinin bozulmasına, eNOS aktivitesindeki azalma ve endotelin-1 (ET-1) sentezindeki artışa bağlı olarak kan akımı düzeninde bozulmaya, transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) etkisiyle artan tip IV kolajen ve fibronektin sentezi aracılığı ile bazal membran kalınlaşmasına ayrıca plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) sentezi artışı ile fibrinolizin bozulmasına ve NADPH oksidazın regülasyonu ile oksidatif stresin artışına neden olduğu bildirilmektedir (De Vriese ve ark. 2000, Brownlee 2001, Schalkwijk ve Stehouwer 2005).

c) Heksozamin yolağı

Bu yolak aracılığı ile fruktoz-6-fosfattan glutamin:fruktoz-6-fosfat amidotransferaz enzimi ile glukozamin-6 fosfat oluşumu artmaktadır. Bu artış PKC aktivasyonuna ve eNOS modifikasyonuna neden olmaktadır. Yapılan bir çalışmada modifiye olmuş eNOS'un aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (De Vriese ve ark. 2000, Brownlee 2001, Du ve ark. 2001, Schalkwijk ve Stehouwer 2005).

d) Enzimatik olmayan glikasyon yolağı

Glukoz ve glukoz kaynaklı dikarbonil bileşiklerin enzimatik olmayan yolla glikasyonu, AGE oluşumuna neden olmaktadır. AGE'nin kendi reseptörlerine (RAGE) bağlanmasının reaktif oksijen radikallerini (ROS) indüklediği ve NF- κ B ve P21^{ras} gibi proinflamatuvar transkripsiyon faktörlerini aktive ettiği gösterilmiştir. AGE'nin etkisi ile endotel hücrelerinde trombomodulin, doku faktörleri ve VCAM genlerinin ekspresyonunun olumsuz yönde etkilendiği, makrofajlarda ise interlökin-1 (IL-1), tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ve TGF- β gibi sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin arttığı bildirilmiştir. Hayvan modellerinde AGE reseptörlerinin bloke edilmesi makrovasküler hastalıkların ve diyabetik nefropatinin gelişimini inhibe etmektedir. Buna göre, ileri glikasyon son ürünlerinin artışının diyabette vasküler hasarın oluşumuna aracılık ettiği öngörülmektedir (De Vriese ve ark. 2000, Brownlee 2001, Schalkwijk ve Stehouwer 2005).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda hiperglisemi aracılığı ile mitokondride aşırı miktarda oluşan ROS'un bu biyokimyasal yolların aktivasyonunda rol oynadığı bildirilmektedir. Destekleyici olarak hiperglisemi nedeniyle artan ROS üretiminin engellenmesinin söz konusu bu dört biyokimyasal yolağın aktivasyonunu önlediği gösterilmiştir (Du ve ark. 2003).

Diyabette reaktif oksijen radikallerini oluşturan mekanizmalar arasında mitokondrial kenetsizleşme, glukozun otooksidasyonu ve enzimatik olmayan glikasyon, iNOS düzeyinin artışı, NADPH oksidazın aktivasyonu, antioksidan mekanizmaların hasarlanması ve eNOS kenetsizleşmesi yer almaktadır. eNOS'un kenetsizleşmesinin prekürsörü olan L-arjininin veya kofaktörü olan BH₄'nin düşük düzeyde bulunması halinde gerçekleştiği ve eNOS kenetsizleşmesinin nitrik oksit yerine süperoksit oluşmasına aracılık ettiği bildirilmektedir (Baynes ve Thorpe 1999, Guzik ve ark. 2002, Li ve Shah 2004, Sindhu ve ark. 2004). Hiperglisemide artan oksidatif stresin varlığı, lipidperoksid düzeylerinin artışı ve üriner sekresyonda 8-iso-PGF_{2α} atılması ile belirlenebilmektedir (Davi ve ark. 1999, Davi ve ark. 2003). Buna göre, oksidatif stresin endotel disfonksiyonunu başlatan temel bir mekanizma olduğu ileri sürülmektedir (Brownlee 2001).

Reaktif oksijen radikalleri ayrıca, birçok sinyal ileti yolağını da (G-protein aracılı, protein kinaz aracılı ve iyon kanalları aracılı sinyal ileti yolları) etkilemek suretiyle endotel disfonksiyon oluşumuna yol açmaktadır. Bunun yanısıra, reaktif oksijen radikalleri endotele direkt etki ile membran lipidlerinin peroksidasyonuna, NF-κ B aktivasyonuna ve NO biyoyararlanımının engellenmesine neden olmaktadır (Madamanchi ve ark. 2005, Schalkwijk ve Stehouwer 2005).

Öte yandan, oksidatif stresin insanlarda diyabete bağlı oluşan endotel disfonksiyonunun rolü üzerinde çelişkili veriler de bulunmaktadır. Kısa dönemli klinik çalışmalarda, antioksidan etkili yüksek doz C vitamini uygulanmasının endotel disfonksiyonunu kısmen düzelttiği bildirilmektedir (Ting ve ark. 1996). Ancak, randomize klinik çalışmalar, antioksidanların kardiyovasküler hastalıkların oluşmasını

önlediğini göstermemektedir (Sacco ve ark. 2003). Ayrıca, diyabetli insanlarda uzun dönem antioksidan etkili vitamin E kullanımının endotel veya sol ventrikül fonksiyonlarında yararlı etkisi olmadığı da belirlenmiştir (Economides ve ark. 2005).

iii. Yüksek glukoz düzeyinin indirekt olarak diğer hücrelerde büyüme faktörlerinin ve vazoaaktif maddelerin sentezini artırması

Diyabette oluşan endotel disfonksiyondan sorumlu tutulan bir diğer mekanizma ise yüksek glukoz düzeyinin indirekt olarak büyüme faktörleri ile sitokinlerin sentezinin artışına neden olmasıdır. Örneğin TGF- β ile insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), epidermal büyüme faktörü (EGF), gibi diğer büyüme faktörlerinin artışının diyabetik nefropati oluşumunda önemli olduğu bildirilmektedir (Ziyadeh 2004) VEGF (vasküler endotelyal büyüme faktörü) ise diyabetik retinopatide önemli rol oynadığı belirlenen bir büyüme faktörüdür (Frank 2004). TNF- α 'nın da insülin direncine yol açarak büyük arterlerde ve mikrosirkülasyonda endotel disfonksiyona ve sonucunda da ateroskleroz ve mikroangiopati oluşumunda önemli olduğu ortaya konulmuştur (Schalkwijk ve Stehouwer 2005).

iv. Metabolik sendrom oluşturan durumların etkileri

Endotel fonksiyonun metabolik sendroma yol açan durumlar ile ilişkisi de diyabette önem kazanmaktadır. Metabolik sendromun bileşenlerinden olan insülin, insülin prekürsörleri, insülin rezistansı, diyabete eşlik eden hipertansiyon, dislipidemi ve obezitenin çeşitli mekanizmalar ile endotel fonksiyonu etkilediği gösterilmiştir (Schalkwijk ve Stehouwer 2005).

Diyabette oluşan endotel disfonksiyonun mekanizması ile ilişkili yapılacak yeni çalışmalar, uygulanacak tedavi stratejileri açısından önemlidir.

2.5. Deneysel Diyabet Modelleri

Diyabet ve diyabet sonucu oluşan komplikasyonların incelenebilmesi için deney hayvanlarında farmakolojik, cerrahi ve genetik manipülasyon yöntemleri ile diyabet oluşturulmaktadır (Rees ve Alcolado 2005, Nitenberg 2007, Frode ve Medeiros 2008, Matteucci ve Giampietro 2008). Bu yöntemler fare, sıçan gibi küçük laboratuvar hayvanlarına uygulanabildiği gibi daha büyük hayvanlara da (ör: köpek, maymun) uygulanabilmektedir.

2.5.1. Farmakolojik Ajanlar İle Diyabet Oluşturulması

Streptozotosin (STZ, %69) ve alloksan (%31) deneysel diyabet oluşturmak amacıyla sıklıkla kullanılan ilaçlardır. Her iki ilaç da diyabetojenik etkilerini parenteral uygulama ile (intravenöz, intraperitoneal ve subkütan) göstermektedirler. Diyabet oluşturulmak üzere verilecek dozun miktarı kullanılacak hayvanın cinsine, ilacın verilmiş yoluna ve hayvanın beslenme şekline göre belirlenmektedir. Verilen doza bağlı olarak, bu ajanlar ile, Tip 1 ve Tip 2 diyabet ile glukoz intoleransı oluşturulabilir (Frode ve Medeiros 2008). Her iki ilacın kullanılacağı günde, uygun tampon çözeltisi ile uygun pH'da hazırlanması stabiliteleri açısından önemlidir (Miranda ve ark. 2006). İki ilaç da reaktif oksijen radikalleri oluşturarak sitotoksik etki göstermektedirler (Szkudelski 2001, Federiuk ve ark. 2004).

Alloksan, redüksiyonu sonucu oluşan dialürik asit ile birlikte redoks tepkimesi ile süperoksid radikalleri oluşturmakta ve böylece pankreatik β -hücrelerinde hasara neden olmaktadır (Szkudelski 2001). Sıçanlarda sıklıkla intravenöz olarak 65 mg/kg dozda kullanılmaktadır. Ancak intraperitoneal ve subkütan yolla verilirken bu doz 150 mg/kg'a kadar yükselmektedir (Federiuk ve ark. 2004). Farelerde ise alloksan 100-200 mg/kg dozları arasında intravenöz yolla uygulanmaktadır (Miranda ve ark. 2006). Diyabetojenik doz aralığının çok dar olmasından dolayı, ufak bir doz kayması ile hayvanlarda toksik doza ulaşıp hayvanlar kaybedilebilmektedir (Frode ve Medeiros 2008).

Streptozotosin, pankreatik β -hücrelerine glukoz taşıyıcısı (GLUT-2) ile girerek burada DNA'nın alkilasyonuna neden olmaktadır. DNA alkilasyonu ise pankreatik β -hücrelerin kaybına yol açmaktadır. Toksik etkisi bununla sınırlı olmamakla birlikte böbrek hasarına (Valentovic ve ark. 2006), oksidatif stress sonucu enflamasyona ve endotel disfonksiyona (Lei ve ark. 2005) yol açabilmektedir.

Streptozotosinin yetişkin sıçanlarda en yaygın olarak kullanılan dozu 60 mg/kg'dır, ancak daha yüksek dozlarda da kullanılabilir. Streptozotosin enjeksiyon ile deney hayvanlarında insüline bağımlı olan Tip I diyabet modeli oluşturulmaktadır (Patel ve ark. 2006). Literatürde protokollerde olabilecek farklılıklara göre streptozotosinin intravenöz enjeksiyon ile 40-70 mg/kg, intraperitoneal enjeksiyon ile 35-65 mg/kg arası dozlarda kullanıldığı görülmektedir (Dincer ve ark. 2001, Matteucci ve Giampietro 2008). Genellikle, streptozotosin enjeksiyonundan 2 gün sonra 200-300 mg/dl kan glukoz düzeylerine ulaşılan hayvanlar diyabetik olarak kabul edilmektedir (Matteucci ve Giampietro 2008).

Farklı protokoller ve farklı dozlarda streptozotosin uygulanması ile farklı diyabetik modeller oluşturulabilmektedir. Doğumu izleyen ilk günlerden itibaren i.v. veya i.p. enjeksiyon ile streptozotosin uygulanan sıçanlarda Tip 2 diyabet oluşmaktadır. Bu hayvanlarda pankreatik β -hücrelerinde glukozu karşı duyarlılık kaybı oluşmaktadır (Pascoe ve Storlien 1990). Ayrıca, yetişkin farelere 5 gün boyunca tekrarlayan dozlarda (40 mg/kg, i.v.) streptozotosin uygulanması ile adacık enflamasyonuna ve β -hücrelerinin nekrozu sonucu otoimmün forma benzer şekilde Tip 1 diyabet oluşmaktadır (Rees ve Alcolado 2005). Buna karşın, sistemik olarak tek doz 60-100 mg/kg streptozotosin uygulanması ile otoimmün profile sahip olmayan insüline bağlı diyabet oluşturulmaktadır (Lei ve ark. 2005) (Yu ve ark. 2000). Tavşan ve domuzlar streptozotosine karşı daha dirençli olmakla birlikte sıçan, fare, köpek ve maymun, streptozotosin ile diyabet modeli oluşturmak için kullanılan en uygun hayvan cinsleridir (Rees ve Alcolado 2005).

Alloksan ve streptozotosin ile oluşturulan diyabet modellerinin esası β - hücrelerinin harabiyetine dayanmaktadır. Bunun sonucunda çok yüksek miktarda insülin salıverilmesi hayvanlarda ölümcül olabilecek hipoglisemi oluşmasına neden olabilmektedir. Bunu önlemek amacıyla, bu ajanların uygulanmasından sonra 12-24 saat boyunca hayvanlara %5lik glukoz çözeltisi verilebilir. Genel olarak farmakolojik ajanlar ile deneysel diyabet modelleri oluşturma protokollerine göre; streptozotosin veya alloksan uygulanmasının, tercihen 8-12 saatlik açlık periyodundan sonra yapılması ve hipoglisemiden korunmak amacıyla uygulama sonrası hayvanlara glukoz çözeltisi verilmesi önerilmektedir (Frode ve Medeiros 2008).

Vacor, dithizone (diphenylthiocarbazone) ve 8-hydroxyquinolone maddeleri de deneysel diyabet oluşturmak amacıyla kullanılmış ancak toksisite seviyeleri nedeniyle kullanımları yasaklanmış olan maddelerdir (Clark ve ark. 1994).

2.5.2. Cerrahi Girişim İle Diyabet Oluşturulması

Hayvanlarda deneysel diyabetin oluşturulmasında kullanılan bir başka yöntem ise pankreasın tamamen çıkartılmasıdır (pankreatektomi). İlk olarak, 1890 yılında Von Merhing ve Minkowski, köpek pankreasının tümüyle çıkartılması sonucu akut diabetes mellitus oluşturmuştur (Minkowski 1989). Daha sonra cerrahi olmayan yöntemlerin kullanılması yaygınlaşmış olsa da parsiyel pankreatektomi halen uygulanmaktadır. Örneğin, sıçanlarda pankreasın %80'inden de fazla bir bölümünün çıkartılması diyabet oluşturulması için uygun olacağı bildirilmektedir. (Frode ve Medeiros 2008).

Ancak, cerrahi girişim ile diyabet oluşturmak için bazı gereklilikler sağlanmalıdır. Bu teknikle ilgili yeterli cerrahi bilgiye sahip kişilerin ve bu işleme uygun streil operasyon koşullarının varolması gerekmektedir. Ayrıca, postoperatif dönemde ağrı kesici ve antibiyotik uygulanması ile, malabsorpsiyonun önlenmesi amacıyla pankreatik enzimler ile destek sağlanmalıdır. Cerrahi işlemin kendisinin taşıdığı riskler yanında hayvanın enfeksiyon kapma riski ve pankreasın fizyolojik

düzeninin bozulması ile oluşabilecek hipoglisemi riski de göz önünde bulundurulmalıdır (Frode ve Medeiros 2008).

2.5.3. Genetik Diyabet Modelleri

Laboratuvar hayvanlarında yapılan çeşitli çalışmalar ile genetik olarak diyabetik hayvanların oluşturulması mümkündür. Laboratuvar ortamında uygun yaşama, beslenme ve üreme koşullarının sağlanması ile spontan Tip I ve spontan Tip II diyabetik hayvanlar elde edilmektedir. NOD (obez olmayan diyabetik) fareler, (bio breeding) BB sıçan, LETL (Long Evans Tokushima) sıçan, New Zealand beyaz tavşan, Keeshond köpek, Chinese hamster ve Celebes black ape spontan Tip I diyabetli hayvanlardır (Rees ve Alcolado 2005).

Spontan Tip II diyabetik hayvanlara örnek olarak, Ob/Ob fare, db/db fare, Zucker (fa/fa) sıçan, Goto Kakizaki sıçan, KK fare ve OLETF sıçan verilebilir (Rees ve Alcolado 2005).

Diyabet çalışmalarında hayvanların kullanımının artması ile birlikte bu alanda moleküler biyoloji tekniklerinin de kullanılması önem kazanmıştır. Bu doğrultuda gen hedefleme yöntemi ile, geni silinmiş (knock-out) hayvanlar, spesifik doku silinmiş hayvanlar (tissue-specific knock-out) β -hücrelerinin silinmesiyle diyabetik hayvanlar elde edilebilmektedir. Ayrıca modifiye edilmiş genlerin zigotlara yerleştirilmesi ile genetik (transgenic) olarak diyabetik hayvanlar yetiştirmek mümkün olmaktadır (Rees ve Alcolado 2005).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanlarının Genel Özellikleri

Çalışmamızda ortalama 250-300 g ağırlığında Wistar Albino cinsi erkek sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma ve Üretim Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Hayvanlar standart sıçan yemi ile beslenmişlerdir. İçme suyu olarak musluk suyu kullanılmıştır. Hayvanlar 20 ± 2 °C'de 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyodunun sağlandığı bir ortamda muhafaza edilmişlerdir. Hergün düzenli olarak kafeslerin temizliği sağlanmıştır.

Çalışmamızda kullanılan retinal arterler erkek veya dişi sığırların gözlerinden izole edilmiştir. Gözler, Coşkun Et ve Et Mamülleri A.Ş. mezbahasında yapılan veteriner kontrolünden geçmiş günlük sığır kesimlerinden elde edilmiştir. Deneyler, İ.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 03.10.2007 tarihli 13 no'lu etik kurul kararına uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2. Araç ve Gereçler

- Dört kanallı miyograf sistemi (DMT&ADInstruments; Model 610M)
- %95 O₂ + CO₂ içeren gaz karışımı tüpü
- Mikropipet (Eppendorf)
- Cerrahi makas ve pens
- 40 µm çapında paslanmaz çelik tel
- Vorteks (Velp Scientifica)
- Petri kutusu
- Diseksiyon mikroskobu (Zeiss 2000)

- Soğuk ışık kaynağı (Schott)
- Termostatlı su banyosu (Thermomiks)
- Glukometre ve test stripleri (Major II)
- Santrifüj (3000 devir/dk) (Ettich)
- Elektronik Terazı (Sartorius)
- Elektronik Hassas Terazı (Sartorius)
- Derin dondurucu (-20 °C) (Electrolux)
- Işık mikroskobu (Leica)
- Image Pro-Plus fotoğraflama sistemi
- Elektron mikroskobu (Jeol Jem 1011)
- Mikrotom (Leica RM 2125 RT)

- Bilgisayar ve yazıcı
- Chart5 for Windows yazılım programı (ADInstruments Powerlab)
- DMT Normalization v1 for Windows yazılım programı (ADInstruments Powerlab)”
- GraphPad Prism 4 yazılım programı
- Insulin EIA kit (DRG International) 96 Testlik, %100 sıçan uyumlu

3.3. Kimyasal Maddeler ve Hazırlanışları

Streptozotosin (Sigma): Pankreasda insülin salıverilmesinden sorumlu β hücrelerini tahrip ederek deneysel diyabet oluşturmak için kullanılmıştır.

Stok çözeltisi Serum Fizyolojik (%0,9) içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Streptozotosin (STZ) deney hayvanına uygulanmadan hemen önce çözülmüş ve 65 mg/kg dozda intraperitoneal (i.p.) olarak uygulanmıştır.

Prostaglandin F_{2 α} (MP Biomedicals): Vazokonstriktör ajan.

Stok çözeltisi 10⁻⁴M olarak distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

Noradrenalin (Sigma): Vazokonstriktör ajan. Preparatların standardizasyonu için

10⁻⁴M konsantrasyonda ve 120 mM KCl ile birlikte kullanılmıştır.

Stok çözeltisi 10⁻⁴M olarak 0,001N HCl içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Maddenin stabilizasyonunun sağlanması amacıyla hazırlama esnasında 1 mg/ml oranında askorbik asit (Merck) ilave edilmiştir. Stok çözeltisi ve dilüsyonlar ışıktan korunmuştur.

KCl (Merck): Kastırıcı ajan. Stok çözeltisi 10⁻²M olarak distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

Asetilkolin HCl (Sigma): Endotel bağımlı gevşetici ajan.

Stok çözeltisi 10⁻⁴M olarak 0,001N HCl içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

Sodyum nitroprusiyat (Sigma): Düz kas gevşetici ajan, nitrovazodilatör.

Stok çözeltisi 10⁻⁴M olarak distile suda çözülerek hazırlanmıştır. Stok çözeltisi ve dilüsyonlar ışıktan korunmuştur.

N^G-Nitro-L-Arginin (Sigma): Nitrik oksid (NO) sentez inhibitörü.

Stok çözeltisi 10⁻⁴M olarak distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

1H-[1.2.4]Oxadiazolo-[4,3-a]Quinoxalin-1-One (ODQ; Sigma): Guanilat siklaz inhibitörü.

Stok çözeltisi 10⁻⁵M olarak DMSO içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

İndometazin (Sigma): Prostaglandin (PG) sentez inhibitörü.

Stok çözeltisi 10^{-5} M olarak %5 NaH₂CO₃ içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

Formaldehit (Merck): Histolojik inceleme için doku tespit edici.

%37'lik formaldehid distile su ile %10'luk çözeltisine seyreltilmiştir.

Glutaraldehit:Elektron mikroskopunda incelenecek dokuların tespit edilmesi amacıyla kullanılmıştır. % 2'lik glutaraldehit +4 °C'de sörensens fosfat tamponu (pH:7.4) ile hazırlanmıştır.

Ozmiyum tetroksit (OsO₄): % 1'lik çözeltisi +4 °C'de sörensens fosfat tamponu (pH:7.4) ile hazırlanarak %2'lik glutaraldehit ile birlikte elektron mikroskopunda incelenecek dokuların tespiti için kullanılmıştır.

Hemotoksilen-Eozin: Dokuların ışık mikroskopunda incelenmesi amacıyla boyama maddesi olarak kullanılmıştır.

Rabbit anti eNOS antikoru (eNOS Rabbit Pab Neomarker, RB-1711-P): Antikor sulandırıcısında (Lab vision, TA-125-UD) 1:100 oranında sulandırılarak dokuların immünohistokimyasal olarak eNOS dağılımlarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

Rabbit anti iNOS antikoru (iNOS Rabbit Pab Neomarker, RB-1605-P): Antikor sulandırıcısında (Lab vision, TA-125-UD) 1:100 oranında sulandırılarak dokuların immünohistokimyasal olarak iNOS dağılımlarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

Ketamin (Richter Pharma AG, Ketazol): Anestezik ajan.

%10'luk enjeksiyonluk solüsyonu kullanılmıştır. Sıçanlara 50 mg/kg dozda ksilazin ile kombine edilerek i.p. olarak uygulanmıştır.

Ksilazin (Alfasan International): Anestezik ajan.

%2'lik enjeksiyonluk solüsyonu kullanılmıştır. Sıçanlara 10 mg/kg dozda ketamin ile kombine edilerek i.p. olarak uygulanmıştır.

Deneylerde kullanılan ilaç solüsyonları derin dondurucuda saklanan stoklardan Krebs Ringer-bikarbonat çözeltisi ile dilüe edilerek hergün taze olarak hazırlanmıştır. Krebs Ringer-bikarbonat çözeltisinin içeriği şu şekildedir: (NaCl: 135mM, KCl: 5 mM, NaHCO₃: 20 mM, Glukoz: 10 mM, CaCl₂: 2.5mM, MgSO₄.7H₂O: 1.3Mm, KH₂PO₄:

1.2mM, EDTA: 0.026mM). Bazı kimyasal maddeler için çözücü olarak kullanılan DMSO ve NaH₂CO₃'ün organ banyosundaki konsantrasyonları %0.1'den düşüktür. Kullanılan çözücülerin izole damar preparatları üzerine direkt etkilerinin olmadığı belirlenmiştir.

3.4. Yöntem

Çalışmalar izole sıçan karotid ve mezenterik arteri ile sığır retinal arterinde yürütülmüş ve diyabetik ve normal (kontrol) sıçanlardan izole edilen retina dokusunun etkisi incelenmiştir.

3.4.1. Sıçanlarda Diyabet Oluşturulması ve Takibi

Çalışmamızda kullandığımız 10-12 haftalık Wistar Albino erkek sıçanlar (250-300 g) kontrol ve diyabetik olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Diyabetik gruptaki sıçanlara i.p. enjeksiyon ile 65mg/kg dozda, serum fizyolojik içerisinde çözülmüş streptozotosin (STZ) uygulanmıştır. Kontrol grubuna ise aynı miktarda serum fizyolojik (i.p.) verilmiştir. STZ enjeksiyonunu izleyen 3. günde hayvanların kan glukoz değerleri bir glukometre ile ölçülmüştür. Ölçüm için gerekli miktardaki kan örneği (1-2 damla) sıçanlara hafif eter anestezisi uygulanması sonrasında kuyruktan hafif bir kesi ile alınmıştır. Ölçümler kontrol ve diyabetik gruplarda paralel olarak gerçekleştirilmiştir. STZ uygulanan ve kan glukoz değerleri >200 mg/dl olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edilmiştir.

Kontrol ve diyabetik gruplardaki hayvanların vucüt ağırlıkları 8 hafta boyunca takip edilmiş ve ölçümler her hafta aynı günde yapılmıştır. Kan glukoz değerleri ise 8 hafta boyunca her iki haftada bir yapılan ölçümler ile izlenmiştir. İnsülin düzeylerinin ölçümü ise 8. haftanın sonunda yapılmıştır.

Sekiz hafta süresince hayvanların yaşam koşullarına özellikle içme sularının ve yemlerinin eksiksiz oluşuna ve kafes temizliklerine dikkat edilmiştir.

3.4.2. Dokuların Fonksiyonel Çalışmalar İçin Hazırlanması

3.4.2.1. Sıçan Karotid ve Mezenterik Arteri ile Sığır Retinal Arterin İzolasyonu

Sekizinci haftanın sonunda diyabetik ve kontrol grubu sıçanlar Ketamin (50 mg/kg) ve Ksilazin (10 mg/kg) karışımı ile anestezi edilmiştir. Boyun bölgeleri açılarak karotid arterleri ve karın bölgeleri açılarak mezenterik arterleri izole edilmiştir. İzole edilen arterler Krebs-Ringer bikarbonat çözeltisi içeren petri kutularına alınmıştır.

Retinal arterler ise veteriner kontrolünde yeni kesilmiş erkek ve dişi sığırlardan alınan gözlerden izole edilmiştir. Mezbahada yeni kesilmiş sığırlardan alınan gözler soğuk ve kısmen buzlu Krebs-Ringer bikarbonat çözeltisi içeren bir taşıma kabı ile hızla laboratuvara taşınmıştır. Gözler, ekstraoküler kasları ve bağ dokularından temizlendikten sonra korneal bölgenin gerisinden kesilerek ikiye ayrılmıştır. Anterior kısım atıldıktan sonra, geri kalan içi vitröz hümör dolu kısım bir petri kutusuna alınmıştır. Retinaya zarar vermeden dikkatle vitröz hümör akıtılarak retinadan uzaklaştırılmıştır. Petri kutusu içerisinde ve diseksiyon mikroskobu altında merkezi retinal arter izole edilmiştir.

İzole edilen karotid, mezenterik ve retinal arterler diseksiyon mikroskobu altında çevre dokulardan temizlenmiş ve her bir damar dokusundan miyograf sisteminin doku tutucuları arasına girecek uzunlukta preparatlar hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatların her biri 40 µm çapında iki paslanmaz çelik telden geçirilmek suretiyle miyografın doku tutucuları arasına yerleştirilmiştir. Bu tellerden biri güç duyarlı (force displacement) transdüser, diğeri ise mikrometreye fikse edilmiştir. Uygulanan deney protokolüne göre karotid, mezenterik ve retinal arterler paralel olarak çalışılmıştır.

3.4.2.2. Sıçan Retina Dokusunun İzolasyonu

Sekiz haftanın sonunda deneye alınan diyabetik ve normal (kontrol) hayvanlar anestezi altına alındıktan sonra göz küreleri izole edilmiştir. Krebs Ringer bikarbonat çözeltisi içerisine alınan göz kürelerinden mikroskop altında retinal doku ince bir pens yardımı ile dokuya hasar vermeden dikkatle çekilerek ayrılmıştır. İzole edilen retina dokusu deney süresince oksijenlenmiş taze Krebs-Ringer bikarbonat çözeltisi içerisinde muhafaza edilmiştir.

3.4.2.3. Arterlerin Standardizasyonu

Krebs-Ringer bikarbonat çözeltisi içeren miyograf sistemine yerleştirilen damarlar %95 O₂ + %5 CO₂ gaz karışımı ile havalandırılmış ve 37⁰C'de bir saat süreyle dengelenmeye bırakılmıştır. Dengelenme sırasında Krebs-Ringer bikarbonat çözeltisi her 10 dakikada bir değiştirilmiştir. Dengelenme süresinin ardından mezenterik ve retinal arterler için normalizasyon işlemine geçilmiştir. Normalizasyon işlemi sırasında mezenterik ve retinal arterlere uygulanan gerim kademeli olarak artırılmış ve pasif damar duvar gerimi-iç çevre ilişkisi çalışılmıştır. Böylece normal fizyolojik koşullarda, tamamen gevşemiş damarın içinden geçen kanın duvara yaptığı basıncın (transmural basınç; 13,3 kPa [100 mmHg]), %90'ına karşılık gelen iç çevre belirlenerek arterlerin gerimi mikrometre yardımı ile bu düzeye getirilmiştir (Mulvany ve Halpern 1977). Karotid arterlere ise 0,5 g (4,905mN)'lık ön gerim verilmiştir (Boussery ve ark. 2002). İzole arterler uygulanan uygun ön gerimde 30 dakika süreyle tekrar dengelenmeye bırakılmıştır. Dengelenme sürecinin ardından preparatlar 20'şer dakika ara ile iki defa potasyum klorür (KCl; 120 mM) ve noradrenalin (NA; 10⁻⁴ M) kombinasyonu (NAK) ile kastrılarak standardize edilmişlerdir.

3.4.3. Fonksiyonel Çalışmalar

3.4.3.1. İzole Arterlerde Endotel ve Düz Kas Aracılı Gevşeme Yanıtlarının Belirlenmesi

İzole sığır retinal, sıçan karotid ve mezenterik arterlerinde endotel aracılı gevşeme yanıtlarının belirlenmesi amacı ile prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$ 3×10^{-6} - $3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilen (önceden kastırılan) arterlere kümülatif olarak asetilkolin (Ach; $10^{-10}M$ - $10^{-4}M$) uygulanmıştır.

İzole sığır retinal, sıçan karotid ve mezenterik arterlerinde düz kas gevşeme fonksiyonunun belirlenmesi amacı ile prostaglandin $F_{2\alpha}$ (3×10^{-6} - $3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilen arterlere kümülatif olarak sodyum nitroprusiyat (SNP; $10^{-10}M$ - $10^{-4}M$) uygulanmıştır.

Diyabetik sıçanlardan izole edilen karotid ve mezenterik arterlerden elde edilen endotel ve düz kas gevşeme yanıtları normal (kontrol) sıçanların izole karotid ve mezenterik arterlerinden elde edilen yanıtlar ile karşılaştırılmıştır.

3.4.3.2. İzole Arterlerde Kastırıcı Ajana Karşı Reaktivitenin Belirlenmesi

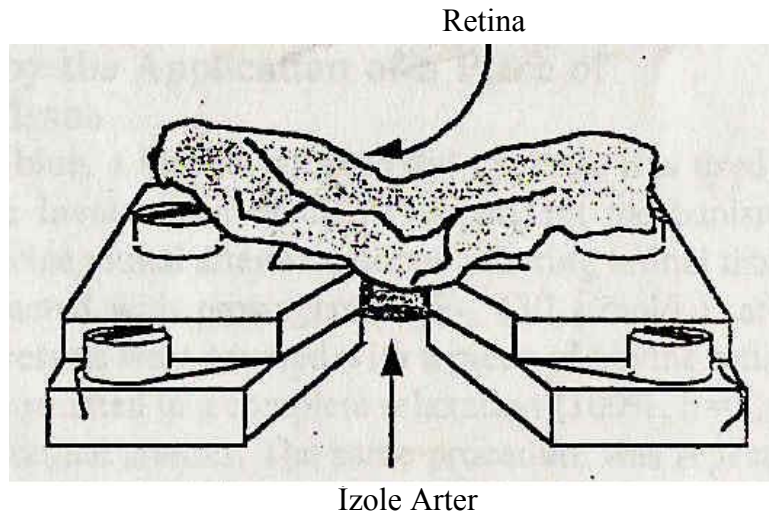
Diyabetik ve normal (kontrol) sıçanlardan izole edilen arterlerde vazokonstriktör ajanlara karşı reaktivitenin belirlenmesi amacıyla, prostaglandin $F_{2\alpha}$ izole sıçan ve mezenterik arterlerine $10^{-9}M$ - $10^{-4}M$ konsantrasyonlarda kümülatif olarak uygulanmış ve konsantrasyon-yanıt eğrileri elde edilmiştir.

Diyabetik sıçanlardan izole edilen karotid ve mezenterik arterlerde prostaglandin $F_{2\alpha}$ ile elde edilen kasılma yanıtları normal (kontrol) sıçanların izole karotid ve

mezenterik arterlerinde prostaglandin $F_{2\alpha}$ ile elde edilen kasılma yanıtlar ile karşılaştırılmıştır.

3.4.3.3. İzole Arterlerde Sığır Retinasının Etkisinin İncelenmesi

Retinaya bağlı yanıtlar, Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-6}M - 3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilen sığır retinal, sığır karotid ve mezenterik arterleri üzerine sığır retina dokusunun yerleştirilmesi suretiyle incelenmiştir (Şekil 3-1).



Şekil 3-1: İzole arter üzerine retina dokusunun yerleştirilmesinin şematik gösterimi (Delaey ve Van de Voorde 1998).

Retinanın etkisi iki temel başlıkta araştırılmıştır:

i. Retinanın retinal ve periferal (karotid ve mezenterik) arterler üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.

Sığır retinasının sığır retinal, sığır karotid ve mezenterik arteri üzerindeki etkisi miyograf sisteminde paralel olarak incelenmiştir. Böylece retinanın retinal arter dışındaki arterler üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

ii. Diyabetik koşulda retinanın periferal (karotid ve mezenterik) ve retinal arterler üzerindeki etkisinin belirlenmesi.

Diyabetik sıçanlardan izole edilen retina dokusunun etkisi, prostaglandin $F_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilmiş diyabetik sıçan karotid ve mezenterik arterlerinde paralel olarak çalışılmıştır. Diyabetik sıçan retinasının diyabetik karotid ve mezenterik arterlerdeki yanıtları, normal (kontrol) sıçanların retina dokusunun kontrol karotid ve mezenterik arterler üzerindeki etkileri ile karşılaştırılmıştır.

Bir grup deneyde ise diyabetik retina dokusunun etkisi normal (kontrol) karotid ve mezenterik arterlerinde, normal retina dokusu ile paralel olarak, incelenmiştir. Böylece aynı kontrol dokuda diyabetik ve normal retinanın etkisi karşılaştırılmıştır.

Benzer şekilde, normal retina dokusunun etkisi de diyabetik karotid ve mezenterik arterlerinde, diyabetik retina ile paralel olarak, çalışılmıştır. Böylece aynı diyabetik dokuda diyabetik ve normal retinanın etkisi karşılaştırılmıştır.

Ayrıca, diyabetik ve kontrol sıçanlardan izole edilen retina dokusunun etkisi, prostaglandin $F_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilmiş izole sığır retinal arterinde de incelenmiştir.

3.4.3.4. İzole Arterlerde Sığır Koroid Dokusunun Etkisinin İncelenmesi

İzole retinal, karotid ve mezenterik arterler üzerine retina dokusunun yerleştirilmesi ile ortaya çıkan yanıtlarda mekanik bir etkinin rolünün olup olmadığı da araştırılmıştır. Bu amaçla prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-6}M$ - $3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilen izole arterler üzerine retina ile benzer büyüklükte sığır koroid dokusu yerleştirilmiştir.

3.4.3.5. Sıçan Retinasının Karotid ve Mezenterik Arterleri Üzerindeki Etkisinde Endotel Kaynaklı Vazodilatör Maddelerin Rolünün İncelenmesi

Sıçan karotid ve mezenterik arterinde elde edilen retina kaynaklı gevşetici etkide, endotel kaynaklı vazodilatör maddeler olan NO ve prostasiklin (PGI₂)'in rolü araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) (3x10⁻⁶M - 3x10⁻⁵M) ile prekontrakte edilen sıçan karotid ve mezenterik arterleri üzerine sıçan retinasının yerleştirilmesiyle oluşan gevşeme yanıtları (kontrol) elde edilmiştir. Ardından, hem retina dokusu hem de karotid ve mezenterik arterler, NO sentezine aracılık eden NO sentetaz (NOS) enziminin inhibitörü L-NOARG (10⁻⁴M, 30 dk), NO'nun etkisine aracılık eden guanilat siklaz enziminin spesifik inhibitörü ODQ (10⁻⁵M, 30 dk) veya PGI₂'nin sentezine aracılık eden siklooksijenaz enziminin spesifik inhibitörü indometazin (10⁻⁵M, 30 dk) ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından arterler prostaglandin F_{2α} (3x10⁻⁶M - 3x10⁻⁵M) ile tekrar prekontrakte edilmiş ve retinaya bağlı gevşeme yanıtının inhibitörler varlığında değişip değişmediği incelenmiştir.

3.4.4. İnsülin Düzeylerinin Tayini

Sekiz hafta sonunda deneye alınan sıçanların kalplerinden anestezi altında yeterli miktarda (3-5 ml) kan alınmıştır. Heparin ile yıkanmış enjektörler içine alınan kan örnekleri santrifüj edilerek serum ve plazma kısımlarının ayrılması sağlanmıştır. Ayrılan kan serumları ependorf tüpler içerisinde -4⁰C' de ölçüm zamanına kadar muhafaza edilmişlerdir. Toplanan serum örneklerinde insülin düzeyleri enzim immünoessay (ELISA) yöntemi ile analiz edilmiştir.

3.4.5. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal İncelemeler

Fonksiyonel çalışmalara paralel olarak, diyabetik ve kontrol sıçanlardan izole edilen damarlar ve retina dokusunda histopatolojik incelemeler yapılmıştır. İzole edilen dokulardan alınan örnekler uygun takip ve boyama işlemlerinden sonra ışık ve elektron mikroskoplarında histopatolojik olarak değerlendirilmiş ve immünohistokimyasal yöntemle eNOS ve iNOS dağılımları incelenmiştir.

Işık mikroskobu ve immünohistokimyasal incelemeler için karotid ve mezenterik arterler ile retina dokusu %10'luk nötral formalinde tespit edildikten 24 saat sonra, %70'lik alkole alınmıştır. Daha sonra yükselen alkol serilerinden geçirilerek ksilolde saydamlaştırılan dokular 58°C'lik parafine gömülmüştür. Parafin bloklardan mikrotom aracılığı ile 4µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Bu kesitler ışık mikroskobu incelemeleri için rutin Hematoksilin-Eozin ile boyanarak ışık mikroskobunda incelenmiş ve Image Pro-Plus sistemi aracılığı ile fotoğraflanmıştır.

İmmünohistokimyasal incelemeler için ise bu kesitler bir gece 56 °C'de tutulduktan sonra, ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek suya kadar getirilmiştir. Sitrat tamponu (pH 6,0) içerisinde mikrodalgada 700 Watt'da 10 dakika tutulduktan sonra, 20 dakika oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Soğuma işlemini takiben distile suya alınan kesitlerin etrafı, pap pen ile işaretlenmiştir. Endojen peroksidaz aktivitesi için, %3 H₂O₂ (Lab vision, TA-060-HP) ile 10 dakika oda sıcaklığında tutulmuştur. Kesitler, distile sudan geçirildikten sonra her basamakta üç defa olacak şekilde fosfat tamponunda (PBS) 15 dakika yıkanmıştır ardından kesitlere, oda sıcaklığında 5 dakika Ultra V Blok (Lab vision, TA-60-UB) uygulanmıştır. Daha sonra kesitler, rabbit anti eNOS (1:100) (eNOS Rabbit Pab Neomarker, RB-1711-P) ve iNOS (1:100) (iNOS Rabbit Pab Neomarker, RB-1605-P) antikoları ile bir gece buzdolabında +4 °C'de inkübe edilmişlerdir (Antikolar, antikor sulandırıcısında (Lab vision, TA-125-UD) 1:100 oranında sulandırılmıştır). Kesitler, PBS'de yıkandıktan sonra biotinlenmiş goat anti-rabbit (Lab vision, TR-060-BN) ile oda sıcaklığında 30 dakika bırakılmıştır. PBS ile yıkanan kesitlere, 30 dakika streptavidin peroxidase label reagent (Lab vision, TS-060-HR) uygulanmış ve ardından kesitler PBS ile yıkanmıştır. Beş dakika AEC (Lab

vision, TA-004–HAC) inkübasyonu ile renkli reaksiyon ürünü sağlanmıştır. Kontrol olarak kabul edilen kesitlere PBS uygulanmıştır. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra, Mayer hematoksilen ile zıt boyama yapılmış ve gliserol jelatin ile kapatılmıştır (McNaughton ve ark. 2002). Hazırlanan preparatlar Leica ışık mikroskobu ile incelenerek, Image Pro-Plus sistemi aracılığı ile fotoğraflanmıştır.

Elektron mikroskobu incelemeleri için kontrol ve diyabetik hayvanlardan izole edilen karotid ve mezenterik arterler ile retina dokusu +4 °C'de Sörensen fosfat tamponu (pH:7,4) ile hazırlanan % 2'lik glutaraldehitde bir gece, yine aynı tamponda hazırlanan % 1'lik ozmiyum tetroksit (OsO_4)'de ise bir saat tespit edilmiştir. Doku parçaları, 2 saat süresince fosfat tamponunda yıkandıktan sonra, yükselen alkol serileri ve propilen oksitten geçirilerek Araldite gömülmüştür. 5000-6000 A° kalınlığında alınan yarı ince kesitler jelatin kaplı lamalar üzerine yerleştirilmiştir. Kesitler toluidin mavisiyle boyandıktan sonra ışık mikroskobunda incelenmiştir. 300-500 A° kalınlığında alınan ince kesitler ise 200 delikli bakır gridlere yerleştirilmiştir. Kesitler, uranil asetat (Watson 1958) ve kurşun sitrat (Reynolds 1963) ile boyandıktan sonra, elektron mikroskobunda incelenmiştir.

3.5. İstatistiksel Analiz

Veriler “ortalama \pm standart hata” şeklinde gösterilmiştir. Deney gruplarında belirtilen “n” farklı hayvanlardan izole edilerek çalışılan arter sayısını göstermektedir. Kasılma yanıtları “mN/mm”, prekontrakte edilen damarlarda retina ve koroid dokusuna bağlı olarak görülen gevşeme veya kasılma yönündeki yanıtlar ise prekontraksiyona göre “%” cinsinden verilmiştir. E_{maks} ; prostaglandin $F_{2\alpha}$ ve koroid ile elde edilen maksimum kasılma yanıtlarını ya da retina, koroid, asetilkolin ve sodyum nitroprusiyat ile oluşan maksimum gevşeme yanıtlarını ifade etmektedir. pD_2 ; maksimum yanıtın (kasılma veya gevşeme) %50’sini oluşturan konsantrasyonun, yani EC_{50} ’nin (-) logaritmasını göstermektedir.

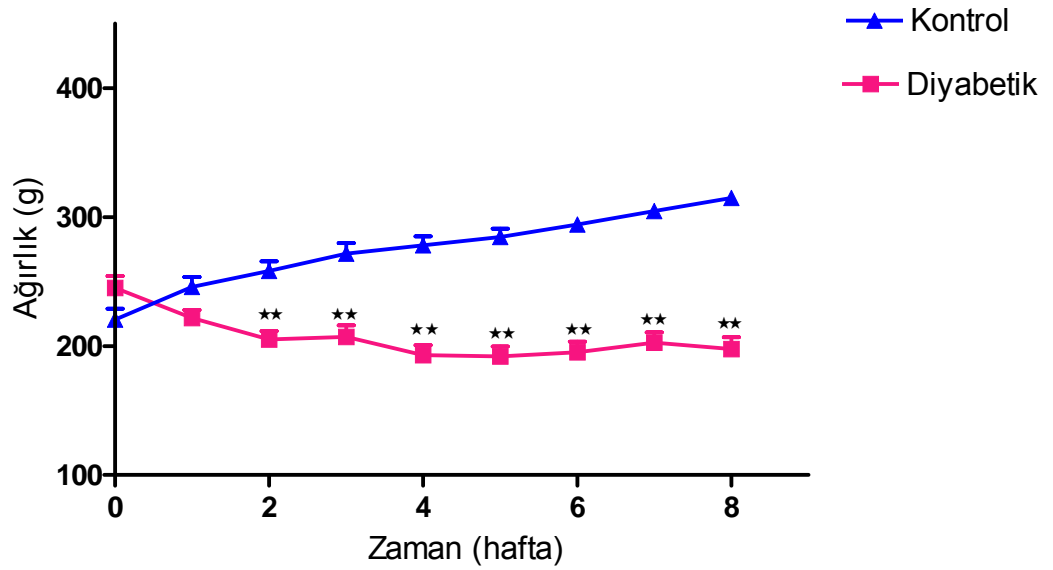
İstatistiksel analizde “Student’s t testi (iki eş arasındaki farkın anlamlılık testi ve gruplar arası farkın anlamlılık testi) ile tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve sonrasında Tukey-Kramer’in çoklu karşılaştırmalar testi aracılığıyla kullanılmıştır. “p” değeri 0,05’den küçük olan karşılaştırmalar anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Fonksiyonel Bulgular

4.1.1. Kontrol ve Diyabetik Hayvanların Ağırlık, Glukoz ve İnsülin Düzeyleri

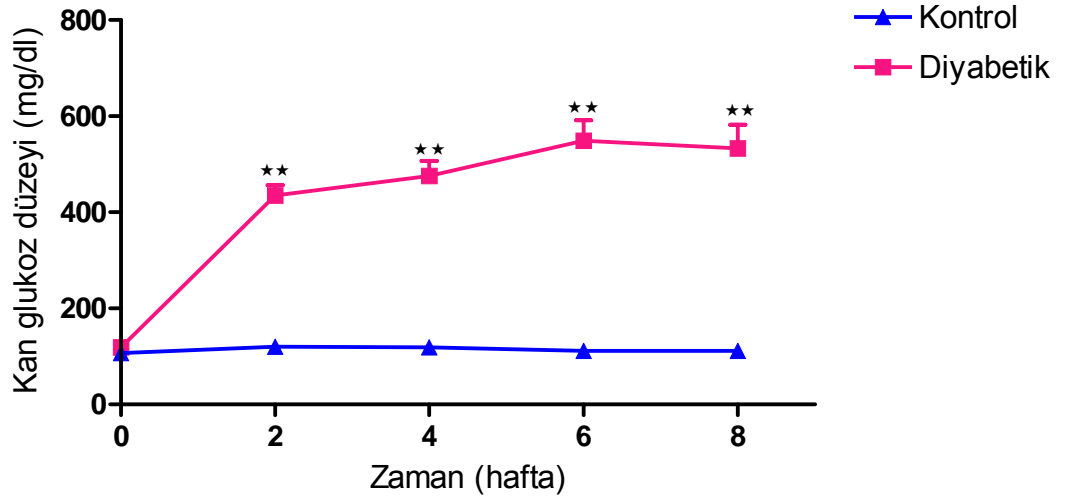
Kontrol ve diyabetik grup hayvanların ağırlıkları sırasıyla, serum fizyolojik ve STZ (65 mg/kg, i.p.) enjeksiyonundan sonraki 8 hafta süresince izlendiğinde elde edilen veriler, diyabetik hayvanların ağırlıklarında 2. haftadan itibaren kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma olduğunu göstermiştir (Şekil 4-1).



Şekil 4-1: Kontrol ve diyabetik grup hayvanların ağırlıkları

**: $p < 0,001$, kontrol ile karşılaştırıldığında, $n = 14$.

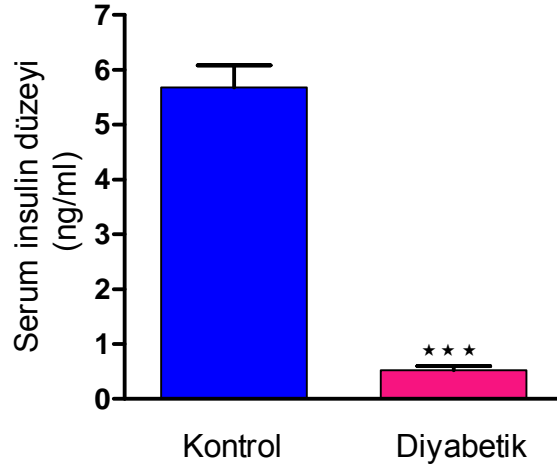
Kontrol ve diyabetik grup hayvanların sırasıyla, serum fizyolojik ve STZ (65 mg/kg, i.p.) enjeksiyonunu takiben her iki haftada bir ölçülen kan glukoz düzeyleri değerlendirildiğinde; diyabetik hayvanlardaki kan glukoz düzeylerinin 2. haftadan itibaren kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gözlenmiştir (Şekil 4-2).



Şekil 4-2: Kontrol ve diyabetik grup hayvanların kan glukoz düzeyleri

**p<0,001, kontrol ile karşılaştırıldığında, n= 14.

Sekizinci haftanın sonunda kontrol ve diyabetik hayvanlardan alınan kan örneklerinde ölçülen insülin düzeylerinin diyabetik grupta kontrol gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 4-3).



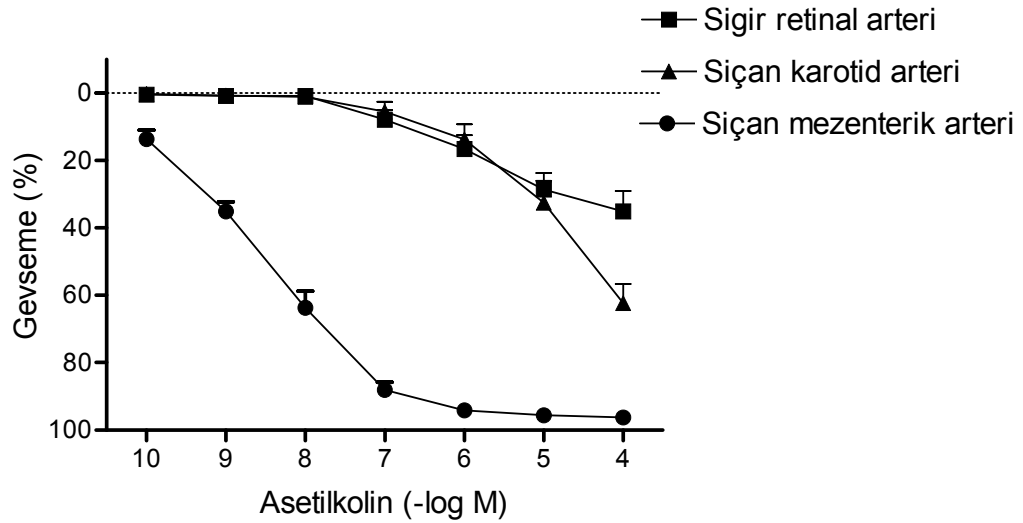
Şekil 4-3: Kontrol ve diyabetik grup hayvanların serum insülin düzeyleri

*** $p < 0,0001$ kontrol ile karşılaştırıldığında, $n = 14$.

4.1.2. İzole Retinal, Karotid ve Mezenterik Arterlerin Endotel Fonksiyonu

4.1.2.1. Kontrol Dokularda Asetilkolin'in Gevşetici Etkisi

Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (3×10^{-6} M - 3×10^{-5} M) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal, siçan karotid ve siçan mezenterik arterleri üzerine kümülatif olarak asetilkolin (10^{-10} M- 10^{-4} M) uygulanması konsantrasyon bağımlı gevşeme yanıtları oluşturmuştur (Şekil 4-4).



Şekil 4-4: $PGF_{2\alpha}$ (3×10^{-6} M- 3×10^{-5} M) ile prekontrakte edilmiş izole sığır retinal, siçan karotid ve siçan mezenterik arterlerinde asetilkolinin konsantrasyon bağımlı gevşetici etkisi, n=11-13.

Asetilkolinin maksimum gevşetici etkisinin ve pD_2 değerlerinin sıçan mezenterik arterinde, sığır retinal ve sıçan karotid arterine oranla daha yüksek düzeyde olduğu gözlenmiştir. Asetilkolin ile elde edilen maksimum gevşetici etki retinal arterde en düşük düzeydedir. (Tablo 4-1).

Tablo 4-1: İzole sığır retinal, sıçan karotid ve mezenterik arterlerinde asetilkolin'in, E_{maks} ve pD_2 değerleri.

	Asetilkolin		
	E_{maks} (%)	pD_2	n
Sığır retinal arteri	35,19±6,06	5,89±0,29	13
Sıçan karotid arteri	62,36±5,69**	4,97±0,03*	11
Sıçan mezenterik arteri	96,24±1,07**,#	8,25±0,02**,#	11

pD_2 : Maksimum gevşeme yanıtının %50'sini oluşturan konsantrasyonun (-) logaritma değeri (- log EC₅₀).

E_{maks} : Maksimum gevşeme yanıtı.

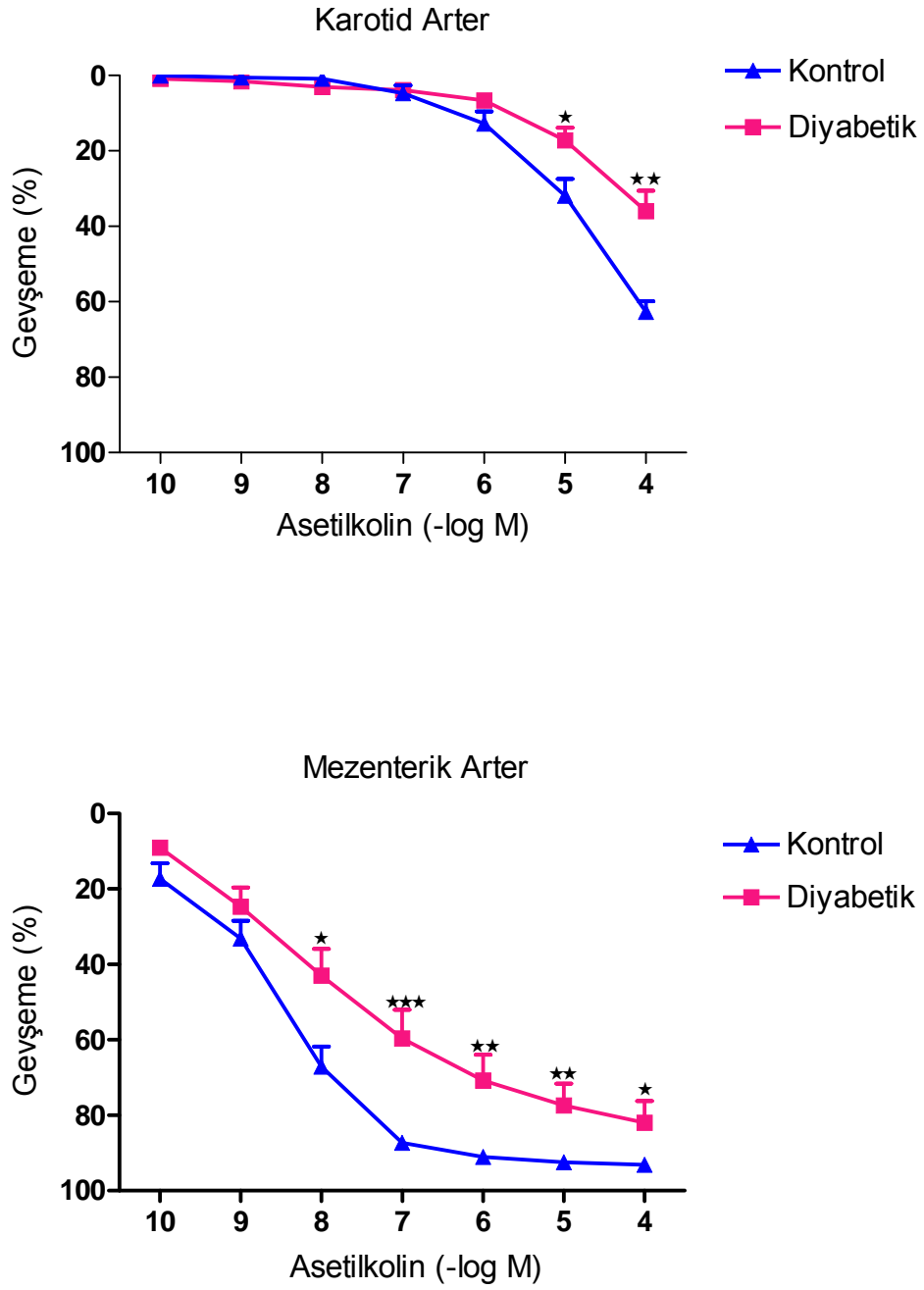
n : İzole arter sayısı.

* **$p<0,05$** ve ** **$p<0,001$** ; Retinal arterdeki gevşeme yüzdesi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

$p<0,001$; Karotid arterdeki gevşeme yüzdesi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

4.1.2.2. Diyabetik Dokularda Asetilkolin'in Gevşetici Etkisi

Diyabetik sıçanlardan izole edilen karotid ve mezenterik arterlerde asetilkolin ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtları kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma göstermektedir (Şekil 4-5). Asetilkolinin pD_2 değerleri kıyaslandığında, karotid arterde diyabetik ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Mezenterik arterde ise diyabetik grupta kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür. Kontrol ve diyabetik arterlerde prostaglandin $F_{2\alpha}$ ile oluşturulan prekontraksiyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. (Tablo 4-2).



Şekil 4-5: $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-6} \text{M}$ - $3 \times 10^{-5} \text{M}$) ile prekontrakte edilmiş kontrol ve diyabetik karotid ve mezenterik arterlerinde asetilkolinin konsantrasyon bağımlı gevşetici etkisi

* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ kontrol ile karşılaştırıldığında, $n=9-16$.

Tablo 4-2: Kontrol ve diyabetik sıçanlardan izole edilen karotid ve mezenterik arterinde asetilkolin'in E_{maks} ve pD₂ değerleri

Asetilkolin				
	Prekontraksiyon (mN/mm)	E_{maks} (%)	pD₂	n
<u>Karotid Arter</u>				
Kontrol	2,27±0,19	62,82±2,87	4,94±0,09	16
Diyabetik	2,38±0,29	36,05±5,46 ^{***}	4,81±0,17	9
<u>Mezenterik Arter</u>				
Kontrol	2,54±0,34	93,16±1,00	8,34±0,09	14
Diyabetik	3,09±0,50	82,04±5,71 [*]	7,88±0,20 [*]	9

pD₂: Maksimum gevşeme yanıtının %50'sini oluşturan konsantrasyonun (-) logaritma değeri (- log EC₅₀).

E_{maks} :Maksimum gevşeme yanıtı.

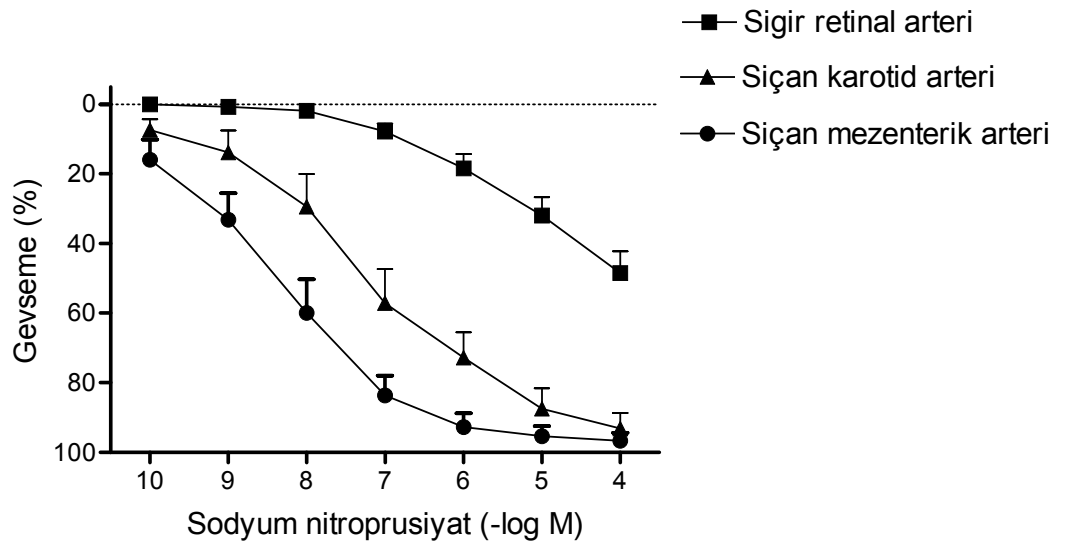
n : İzole arter sayısı.

^{*}**p<0,05**, ^{***}**p<0,0001**: Kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.

4.1.3. İzole Retinal, Karotid ve Mezenterik Arterin Düz Kas Gevşeme Yanıtları

4.1.3.1. Kontrol Dokularda Sodyum Nitroprusiyat'ın Gevşetici Etkisi

Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-6}M$ - $3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilmiş izole sığır retinal, sığan karotid ve sığan mezenterik arterleri üzerine kümülatif olarak sodyum nitroprusiyat ($10^{-10}M$ - $10^{-4}M$) uygulanması konsantrasyon bağımlı gevşeme yanıtları oluşturmuştur (Şekil 4-6).



Şekil 4-6: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-6}M$ - $3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilmiş izole sığır retinal, sığan karotid ve sığan mezenterik arterleri üzerinde sodyum nitroprusiyatın konsantrasyon bağımlı gevşetici etkisi, n=7-16

Sodyum nitroprusiyatın maksimum gevşetici etkisinin sıçan karotid ve mezenterik arterinde benzerlik gösterdiği, sığır retinal arterinde ise her iki periferik artere göre daha düşük düzeyde olduğu gözlenmiştir. Sodyum nitroprusiyatın pD_2 değerinin ise sıçan mezenterik ve karotid arterinde birbiriyle benzer ve sığır retinal arterine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Tablo 4-3).

Tablo 4-3: İzole sığır retinal arteri, sıçan karotid ve mezenterik arterleri üzerinde sodyum nitroprusiyat'ın prekontraksiyon, E_{maks} ve pD_2 değerleri.

Sodyum Nitroprusiyat			
	E_{maks} (%)	pD_2	n
Sığır retinal arteri	48,50±6,20	5,39±0,25	16
Sıçan karotid arteri	93,27±4,43**	7,24±0,20**	8
Sıçan mezenterik arteri	96,74±2,33**	8,09±0,16**	7

pD_2 : Maksimum gevşeme yanıtının %50'sini oluşturan konsantrasyonun (-) logaritma değeri (- log EC₅₀).

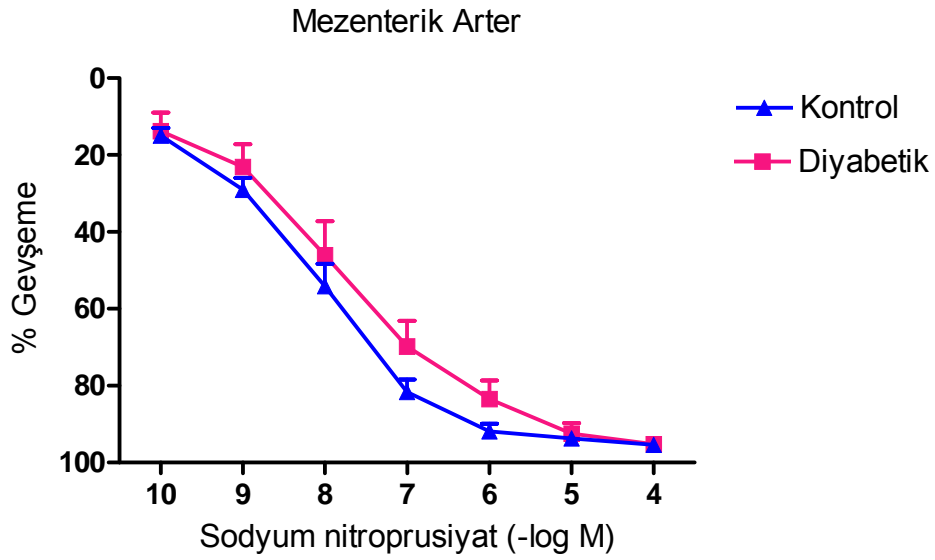
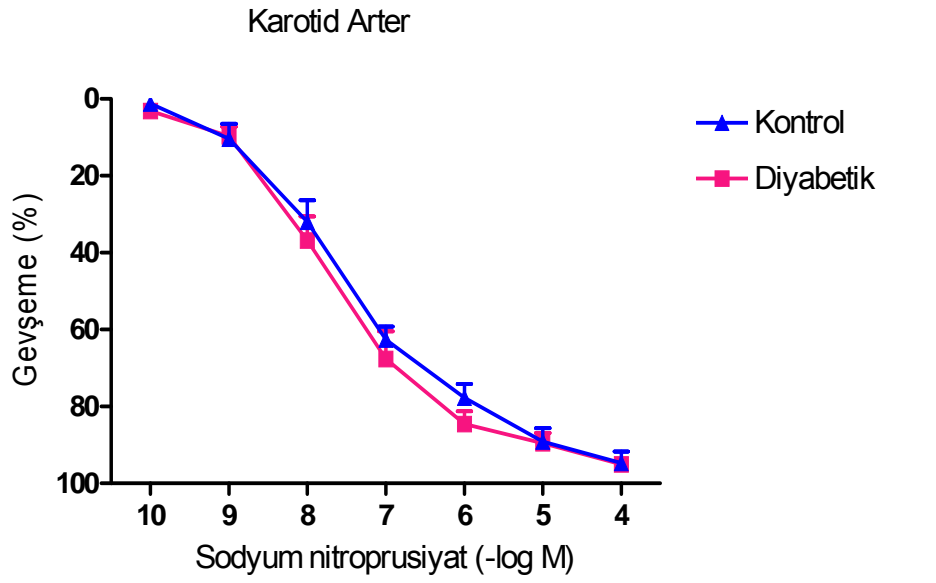
E_{maks} : Maksimum gevşeme yanıtı.

n: İzole arter sayısı.

****p<0,001;** Retinal arterdeki gevşeme yüzdesi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

4.1.3.2. Diyabetik Dokularda Sodyum Nitroprusiyat'ın Gevşetici Etkisi

Kontrol ve diyabetik sıçanlardan izole edilen karotid ve mezenterik arterlerinde sodyum nitroprusiyat'ın maksimum gevşetici etkisi ve pD_2 değerleri istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir. (Şekil 4-7, Tablo 4-4). Kontrol ve diyabetik arterlerde prostaglandin $F_{2\alpha}$ ile oluşturulan prekontraksiyon düzeyleri de birbiri ile uyumludur (Tablo 4-4).



Şekil 4-7: $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-6} \text{ M}$ - $3 \times 10^{-5} \text{ M}$) ile prekontrakte edilmiş kontrol ve diyabetik karotid ve mezenterik arterleri üzerinde sodyum nitroprusiyatın konsantrasyon bağımlı gevşetici etkisi, $n=8-10$

Tablo 4-4: Kontrol ve diyabetik sıçanlardan izole edilen karotid ve mezenterik arterlerinde sodyum nitroprusiyat'ın, E_{maks} ve pD₂ değerleri

Sodyum Nitroprusiyat				
	Prekontraksiyon (mN/mm)	E_{maks} (%)	pD₂	n
Karotid Arter				
Kontrol	2,73±0,38	94,75±2,98	7,50±0,10	10
Diyabetik	2,32±0,31	95,08±1,29	7,67±0,10	9
Mezenterik Arter				
Kontrol	2,38±0,44	95,49±1,39	7,96±0,08	10
Diyabetik	2,67±0,25	95,31±1,46	7,69±0,16	8

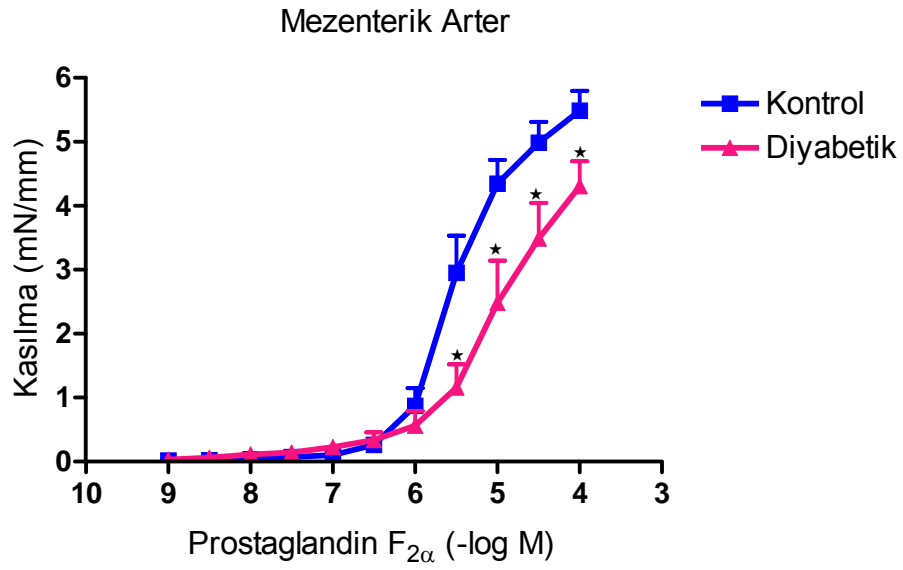
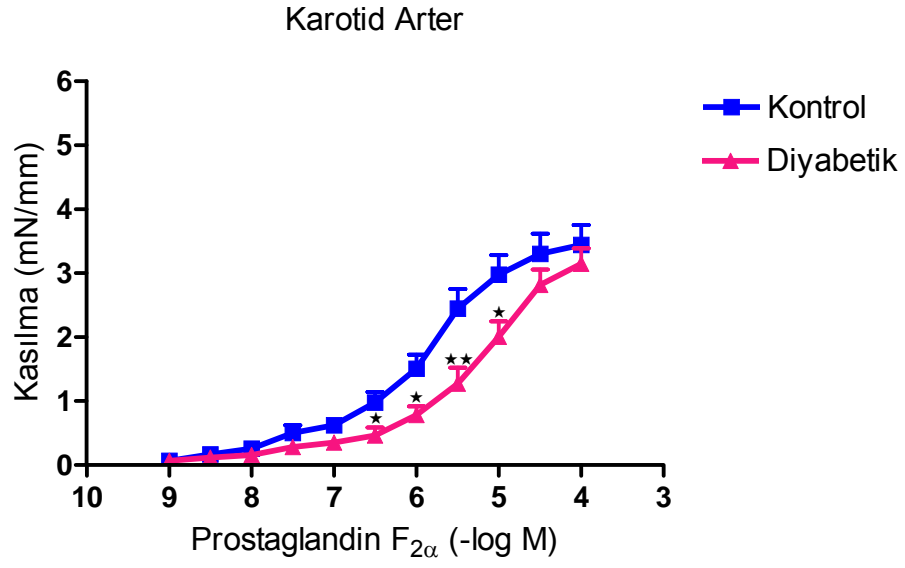
pD₂: Maksimum gevşeme yanıtının %50'sini oluşturan konsantrasyonun (-) logaritma değeri (log EC₅₀).

E_{maks} :Maksimum gevşeme yanıtı.

n : İzole arter sayısı.

4.1.4. İzole Karotid ve Mezenterik Arterinde Prostaglandin F_{2α}'nın Kastırıcı Etkisinin İncelenmesi

Kontrol ve diyabetik sıçanlardan izole edilen karotid ve mezenterik arterleri üzerine prostaglandin F_{2α}'nın (10⁻⁹M-10⁻⁴M) kümülatif olarak uygulanması konsantrasyon bağımlı kasılmalara neden olmuştur. Karotid arterde prostaglandin F_{2α}'nın maksimum kastırıcı etkisi kontrol ve diyabetik grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir. Buna karşın mezenterik arterdeki maksimum kastırıcı etkide anlamlı bir azalma görülmektedir. Öte yandan, prostaglandin F_{2α}'nın karotid ve mezenterik arterlerdeki pD₂ değerleri, diyabetik grupta kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermektedir. (Şekil 4-8, Tablo 4-5).



Şekil 4-8: Kontrol ve diyabetik karotid ve mezenterik arterlerinde PGF_{2α} (10⁻⁹ – 10⁻⁴ M) ile elde edilen konsantrasyon yanıt eğrileri

*p<0,05, **p<0,001 kontrol ile karşılaştırıldığında, n=8-11.

Tablo 4-5: Kontrol ve diyabetik grubun izole karotid ve mezenterik arterlerinde PGF_{2α}'nın E_{maks} ve pD₂ değerleri.

	Prostaglandin F _{2α}		
	E _{maks} (mN/mm)	pD ₂	n
Karotid Arter			
Kontrol	3,44±0,31	5,86±0,10	11
Diyabetik	3,14±0,23	5,21±0,09***	10
Mezenterik Arter			
Kontrol	5,48±0,30	5,46±0,07	10
Diyabetik	4,30±0,39*	5,00±0,13**	8

pD₂: Maksimum kasılma yanıtının %50'sini oluşturan konsantrasyonun (-) logaritma değeri (- log EC₅₀).

E_{maks}: Maksimum kasılma yanıtı.

n : İzole arter sayısı.

* p<0,05, ** p<0,001, *** p<0,0001: Kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.

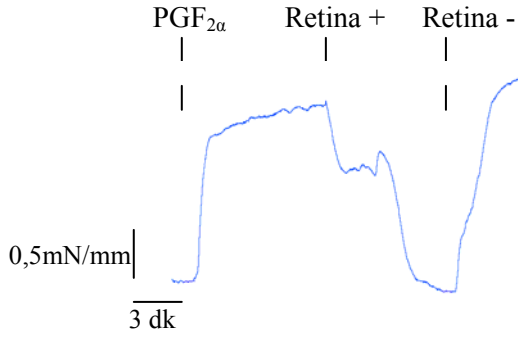
4.1.5. Retinanın Etkisi

4.1.5.1. Kontrol Sıçan Retinasının Sığır Retinal, Sıçan Karotid ve Mezenterik Arterleri Üzerindeki Gevşetici Etkisi

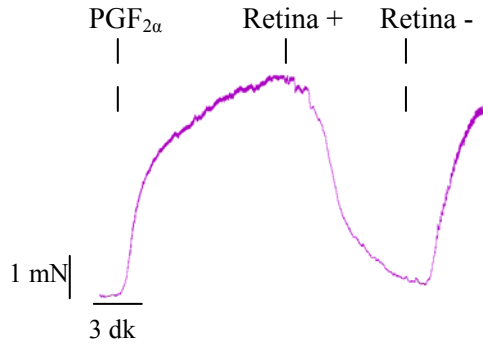
Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-6}M$ - $3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal, sıçan karotid ve sıçan mezenterik arterleri üzerine sıçan retina dokusunun yerleştirilmesi akut başlayan ve özellikle retinal ve mezenterik arterde bifazik karakter gösteren tam bir gevşeme yanıtına neden olmuştur (Şekil 4-9 ve 4-10). Retinal, karotid ve mezenterik arterlerde sıçan retina dokusu ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtları benzer düzeydedir, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Tablo 4-6). Retinaya bağlı gevşeme yanıtları, retina dokusu izole arterlerin üzerinden kaldırıldığında tamamen geriye dönmektedir (Şekil 4-9). Ayrıca retina dokusu ile sığır retinal arteri ile sıçan karotid ve mezenterik arterlerinde elde edilen gevşeme yanıtları tekrarlanabilir özelliktedir.

İzole sığır retinal arteri, sıçan karotid arteri ve sıçan mezenterik arterlerinde prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-6}M$ - $3 \times 10^{-5}M$) ile oluşturulan prekontraksiyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Sığır retinal arteri: $1,52 \pm 0,29$ mN/mm, n=11; sıçan karotid arteri: $2,13 \pm 0,32$ mN/mm, n=14; sıçan mezenterik arteri: $2,41 \pm 0,34$ mN/mm, n=16, $p > 0,05$).

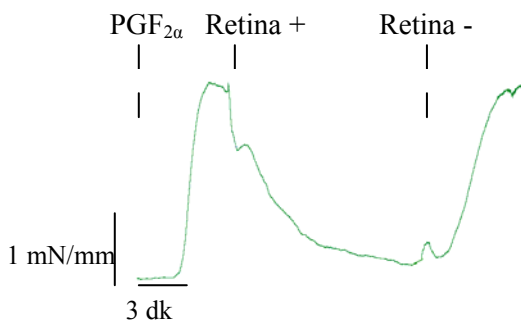
A) Sığır Retinal Arteri



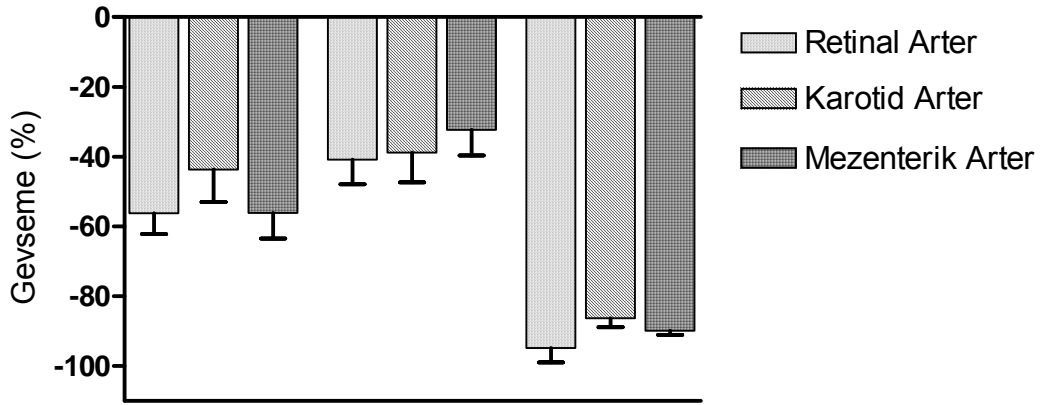
B) Sıçan Karotid Arteri



C) Sıçan Mezenterik Arteri



Şekil 4-9: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-6}M - 3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilmiş A) izole sığır retinal, B) sıçan karotid ve C) sıçan mezenterik arterleri üzerine sıçan retina dokusunun gevşetici etkisi (orijinal trase).



Şekil 4-10: PGF_{2α} (3x10⁻⁶M - 3x10⁻⁵M) ile kastırılmış sığır retinal, sıçan karotid ve sıçan mezenterik arterleri üzerinde sıçan retinasının gevşetici etkisi

R1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

R2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

Emaks.: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (E_{maks}), % cinsinden değeri.

p>0,05, n=11-16

Tablo 4-6: PGF₂ α ile prekontrakte edilen sığır retinal, sıçan karotid ve sıçan mezenterik arterlerinde sıçan retinası ile elde edilen gevşeme yanıtları

	Retinal Gevşeme				
	R1 (%)	R2 (%)	n	RT (%)	n
Sığır retinal arteri	56.22±5.99	40.86±7.02	8	94.86±4.10	11
Sıçan karotid arteri	43.68±9.33	38.84±8.48	7	86.29±2.56	16
Sıçan mezenterik arteri	56.18±7.30	32.34±7.27	10	89.87±1.16	16

R1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

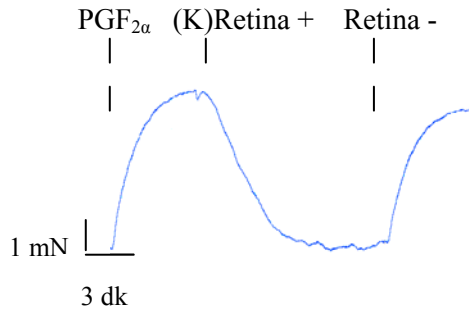
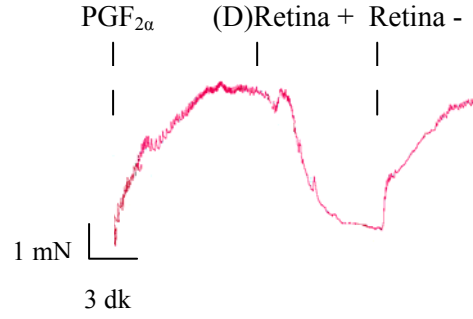
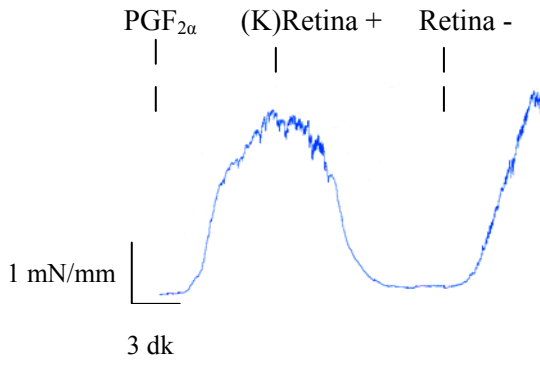
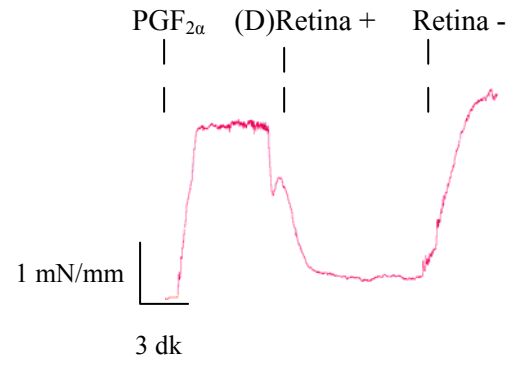
R2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

RT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (E_{maks}) % cinsinden değeri.

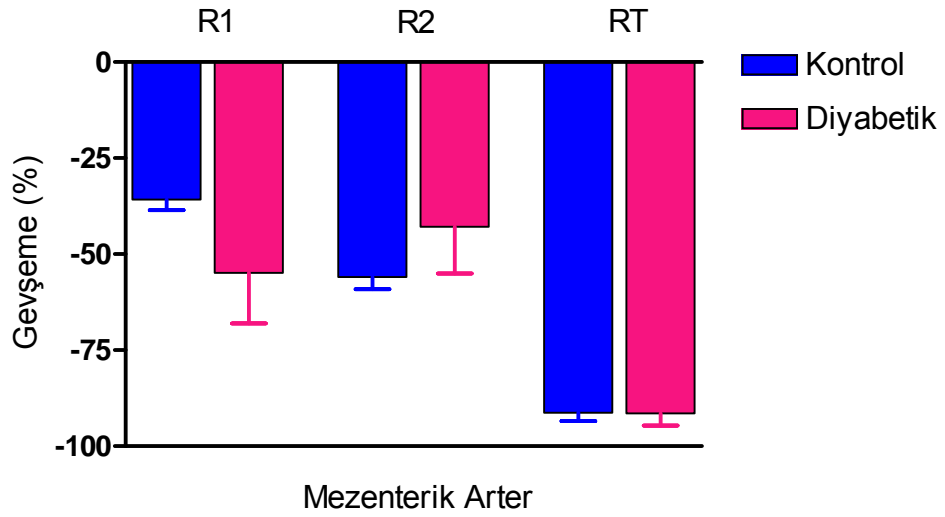
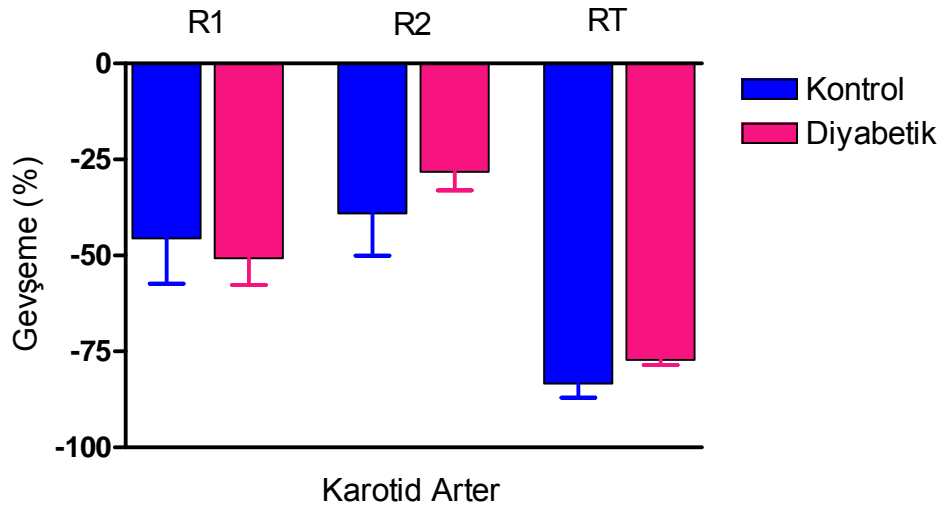
n: İzole arter sayısı.

4.1.5.2. Diyabetik Sıçan Retinasının Sığır Retinal, Sıçan Karotid ve Mezenterik Arterleri Üzerindeki Gevşetici Etkisi

Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-6}M$ - $3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilen diyabetik karotid ve mezenterik arterlerin üzerine diyabetik sıçanlardan izole edilen retina dokusunun yerleştirilmesi kontrol dokularda olduğu gibi akut başlayan ve mezenterik arterde daha belirgin olmak üzere, bifazik karakter gösteren tam bir gevşeme yanıtına neden olmuştur (Şekil 4-11). Diyabetik ve kontrol arterler arasında retina kaynaklı gevşeme yanıtlarının ilk faz, ikinci faz ve maksimum düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir (Şekil 4-12 ve Tablo 4-7).

A) Kontrol Karotid Arter**B) Diyabetik Karotid Arter****C) Kontrol Mezenterik Arter****D) Diyabetik Mezenterik Arter**

Şekil 4-11: PGF_{2α} ($3 \times 10^{-6}M - 3 \times 10^{-5}M$) ile kastırılmış karotid ve mezenterik arterlerde kontrol (K) ve diyabetik retina (D) dokusunun etkisi



Şekil 4-12: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-6}M - 3 \times 10^{-5}M$) ile kastırılmış kontrol ve diyabetik karotid ve mezenterik arterler üzerine sırasıyla kontrol ve diyabetik retinaların yerleştirilmesi sonucu elde edilen gevşeme yanıtları

R1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri

R2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

Emaks.: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (E_{maks}), % cinsinden değeri.

$p > 0,05$, $n = 8-9$.

Tablo 4-7: Kontrol ve diyabetik arterlerde $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-6}\text{M}$ - $3 \times 10^{-5}\text{M}$) ile elde edilen prekontraksiyon düzeyleri ve retina dokusuna bağlı olarak oluşan maksimum gevşeme yanıtları

	Prekontraksiyon	Retinal Gevşeme	n
	(mN/mm)	E _{maks.} (%)	
Karotid Arter			
Kontrol	2,31±0,45	83,41±3,64	10
Diyabetik	2,24±0,21	77,17±1,40	8
Mezenterik Arter			
Kontrol	2,45±0,44	91,25±2,24	8
Diyabetik	2,34±0,33	91,47±3,17	9

E_{maks.}: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (E_{maks.}) % cinsinden değeri.

n: İzole arter sayısı

p>0,05: İstatistiksel anlamlılık düzeyi.

Öte yandan diyabetik sıçanlardan izole edilen retinal doku, kontrol karotid ve mezenterik arterde, kontrol retinal doku ile benzer düzeyde, gevşeme yanıtına neden olmuştur.

Kontrol karotid arter: diyabetik retina: %83,83±4,89, n=5;

kontrol retina: %80,39±3,79, n=8, p>0,05.

Kontrol mezenterik arter: diyabetik retina: %80,74±5,19, n=5,

kontrol retina: %91,25±2,24, n=8, p>0,05.

Paralel olarak, kontrol sıçanlardan izole edilen retinal doku diyabetik karotid ve mezenterik arterde, diyabetik retina ile benzer düzeyde gevşeme oluşturmuştur.

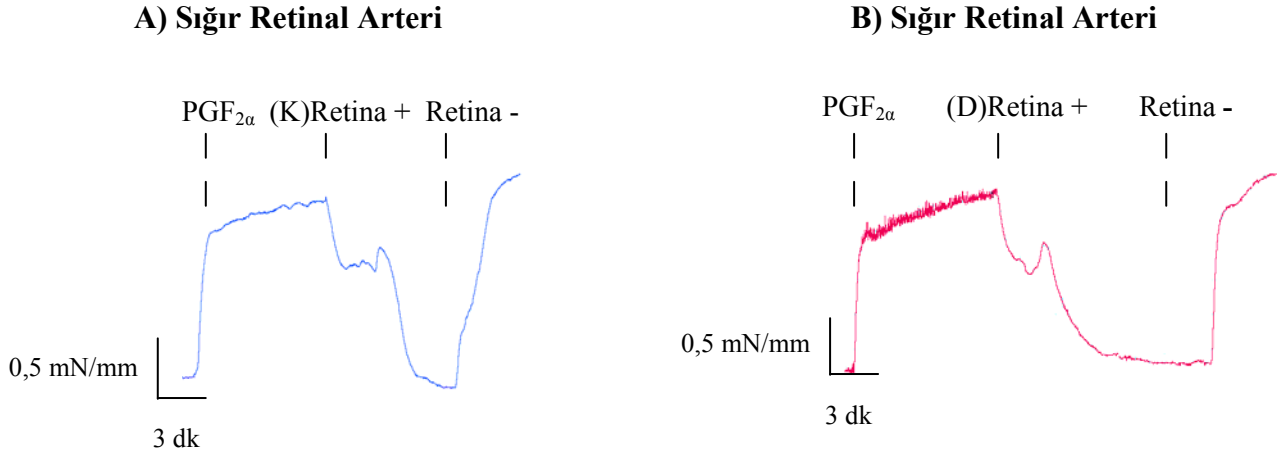
Diyabetik karotid arter: kontrol retina: %77,94±5,05, n=8

diyabetik retina: %77,17±1,40, n=8, p>0,05.

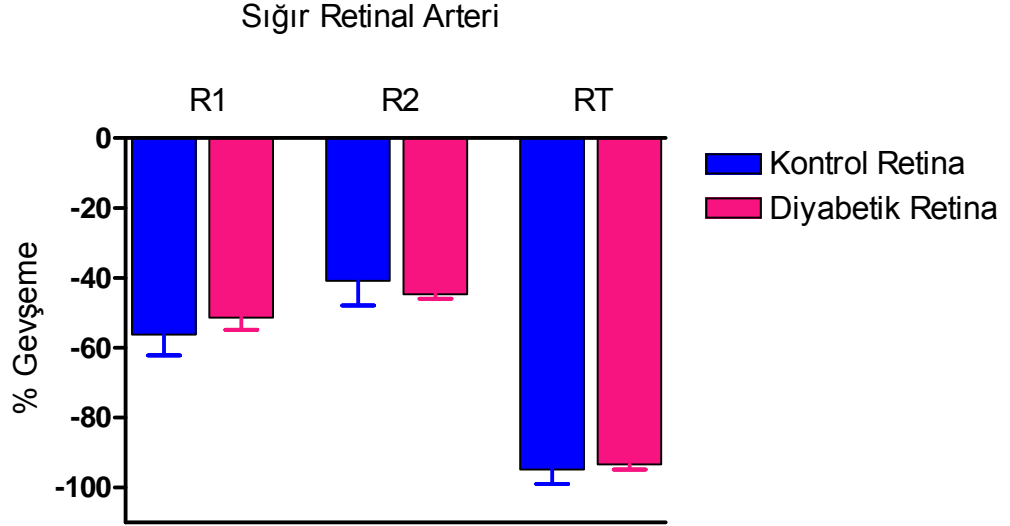
Diyabetik mezenterik arter: kontrol retina: %90,37±3,32, n=8

diyabetik retina: %91,47±3,17, n=9, p>0,05.

Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilmiş izole sığır retinal arteri üzerine diyabetik sıçanlardan izole edilmiş retina dokusunun yerleştirilmesi kontrol retina dokusu ile elde edildiği gibi akut başlayan tam bir gevşeme yanıtına neden olmuştur (Şekil 4-13). Sığır retinal arteri üzerinde diyabetik sıçan retinası ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtları kontrol retina ile elde edilen yanıtlardan istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir (Şekil 4-14).



Şekil 4-13: PGF_{2α} ($3 \times 10^{-6}M$ - $3 \times 10^{-5}M$) ile kastırılmış izole sığır retinal arterinde kontrol (K) ve diyabetik retina (D) dokusunun etkisi



Şekil 4-14: $PGF_{2\alpha}$ $3 \times 10^{-5}M$ ile kastırılmış sığır retinal arteri üzerine kontrol ve diyabetik sıçan retinaların yerleştirilmesi sonucu elde edilen gevşeme yanıtları

R1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri

R2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

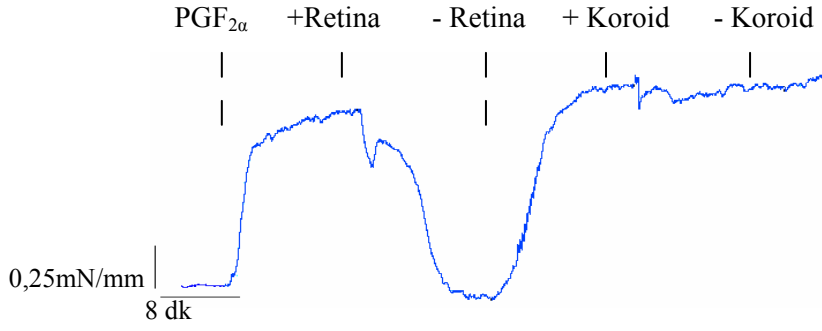
Emaks.: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (E_{maks}), % cinsinden değeri.

$p > 0,05$, $n = 4-6$.

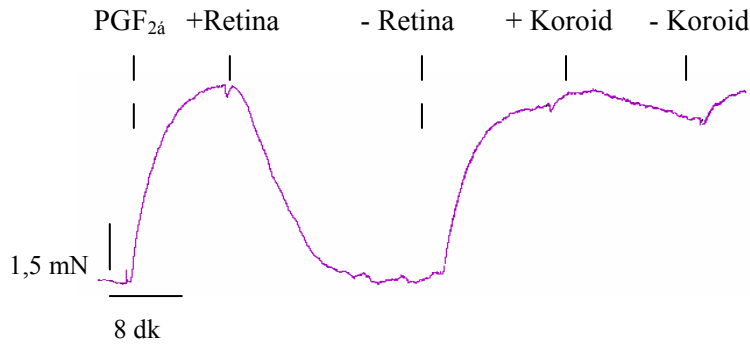
4.1.6. Sığır Koroid Dokusunun Etkisinin İncelenmesi

Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-6}M$ - $3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilmiş izole sığır retinal, sıçan karotid ve sıçan mezenterik arterleri üzerine sıçan retina dokusuna benzer boyutta sığır koroid dokusunun yerleştirilmesi, sıçan retinasından farklı olarak, zayıf bir gevşeme veya hafif bir kasılma yanıtına neden olmuştur (Şekil 4-15 ve 4-16, Tablo 4-8).

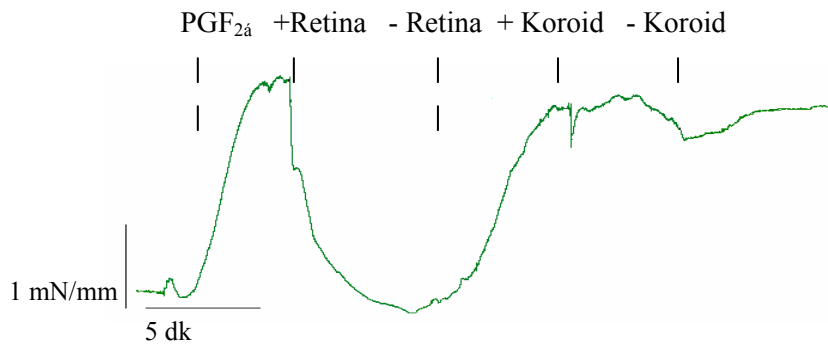
A) Sığır Retinal Arteri



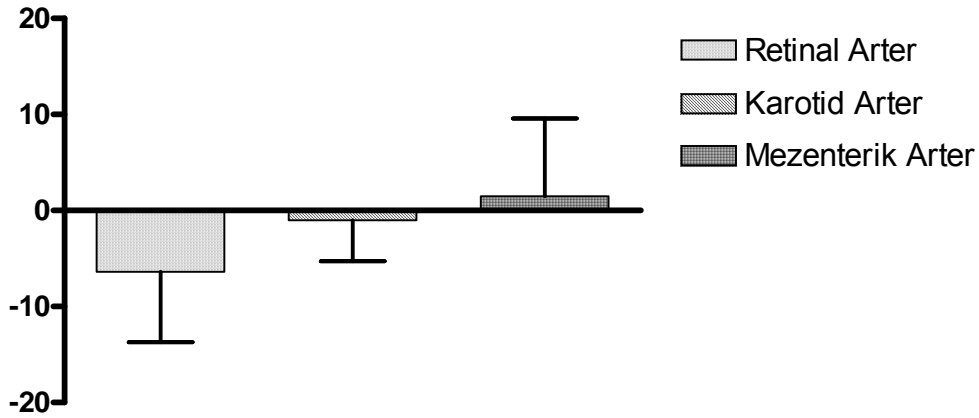
B) Sıçan Karotid Arteri



C) Sıçan Mezenterik Arteri



Şekil 4-15: PGF_{2α} ($3 \times 10^{-6} \text{ M}$ - $3 \times 10^{-5} \text{ M}$) ile prekontrakte edilmiş A) izole sığır retinal, B) sıçan karotid ve C) sıçan mezenterik arterleri üzerinde sıçan retina ve sığır koroid dokusunun etkisi (orijinal trase)



Şekil 4-16: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-6}M$ - $3 \times 10^{-5}M$) ile kastırılmış sığır retinal, sıçan karotid ve sıçan mezenterik arterleri üzerinde sığır koroid dokusunun etkisi (n=6-7)

Tablo 4-8: $PGF_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilmiş sığır retinal, sıçan karotid ve sıçan mezenterik arterlerinde koroid dokusunun etkisi

	Koroid	
	% Yanıt	n
Sığır retinal arteri	-6,37±7,35	6
Sıçan karotid arteri	-1,02±4,24	7
Sıçan mezenterik arteri	1,49±8,07	6

Koroide bağlı oluşan toplam yanıtın % cinsinden gösteriminde (-) değerler gevşeme, (+) değerler ise kasılma yönündeki yanıtları ifade etmektedir.

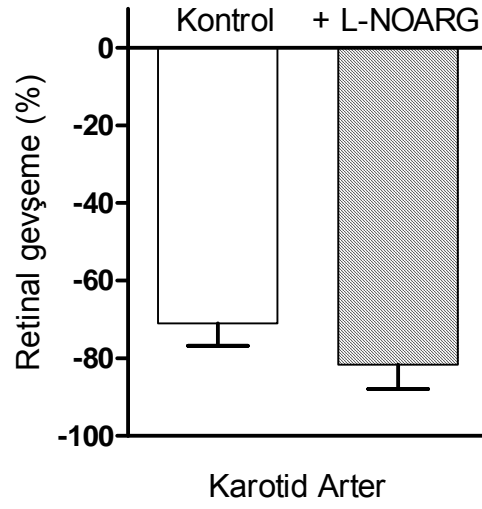
n: İzole arter sayısı.

4.1.7. Retina Kaynaklı Gevşetici Etkinin Mekanizmasının İncelenmesi

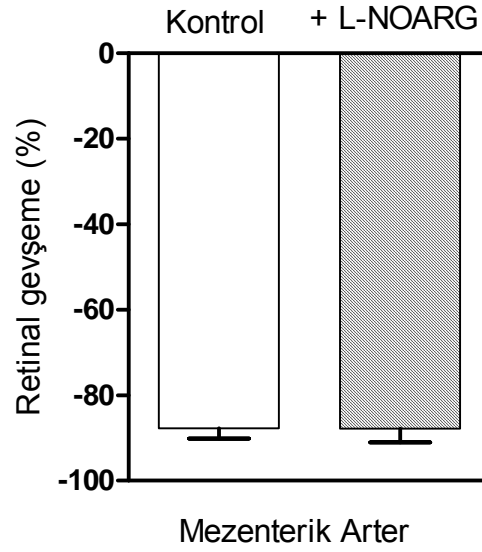
4.1.7.1. Nitrik Oksit Sentaz İnhibitörü L-NOARG'ın Etkisi

NO sentez inhibitörü, L-NOARG ($10^{-4}M$) varlığında sıçan karotid (Şekil 4-17A ve Tablo 4-9) ve mezenterik arterinde (Şekil 4-17B ve Tablo 4-10) sıçan retinası ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtları aynı dokuda inhibitör uygulaması öncesi elde edilen retinal gevşeme yanıtları (kontrol) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir.

A)



B)

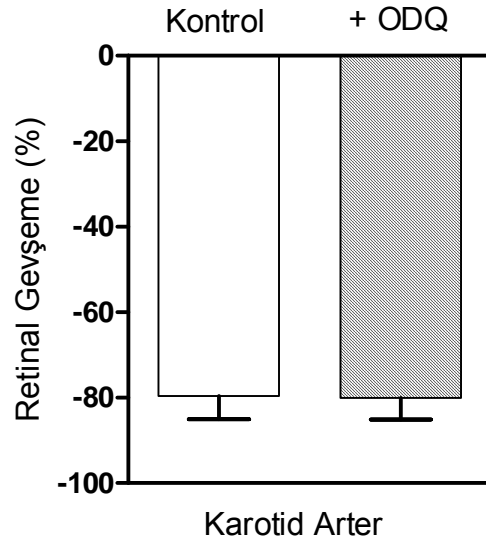


Şekil 4-17: İzole sıçan karotid (A) ve mezenterik arterinde (B) retina kaynaklı gevşeme yanıtlarında nitrik oksit sentez inhibitörü L-NOARG' ın (10^{-4} M) etkisi, n=7-8

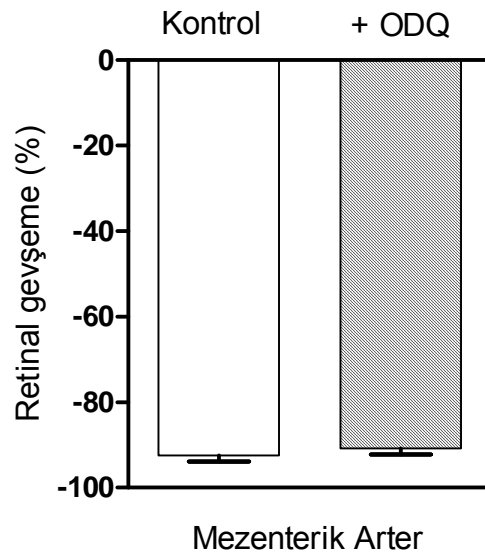
4.1.7.2. Guanilat Siklaz İnhibitörü ODQ'nun Etkisi

Guanilat siklaz inhibitörü, ODQ ($10^{-5}M$) varlığında sıçan karotid (Şekil 4-18A ve Tablo 4-9) ve mezenterik arterinde (Şekil 4-18B ve Tablo 4-10) sıçan retinası ile maksimum gevşeme yanıtları inhibitör uygulaması öncesi elde edilen retinal gevşeme yanıtları (kontrol) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir.

A)



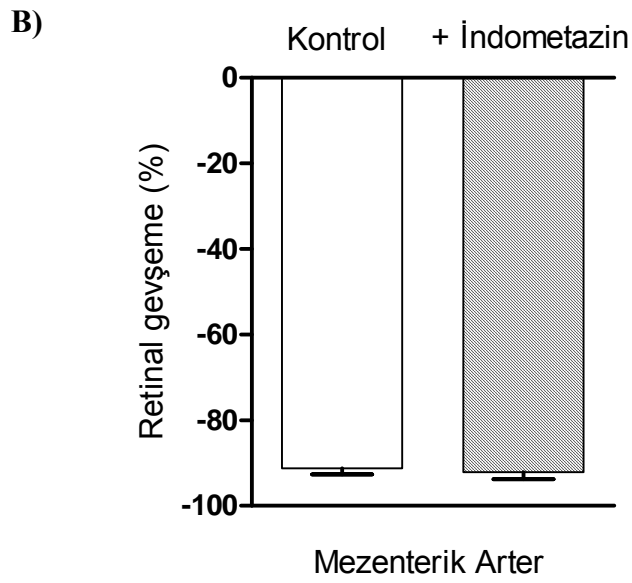
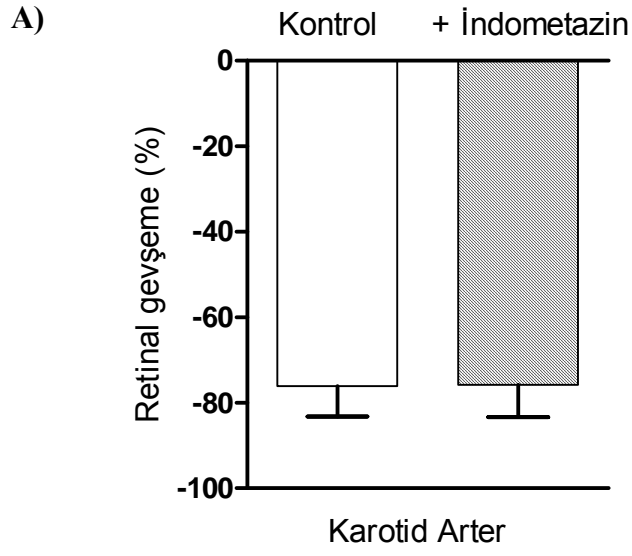
B)



Şekil 4-18: İzole sıçan karotid (A) ve mezenterik arterinde (B) retina kaynaklı gevşeme yanıtlarında guanilat siklaz inhibitörü ODQ'nun ($10^{-5}M$) etkisi, n=6-8

4.1.7.3. Siklooksijenaz İnhibitörü İndometazin Etkisi

Siklooksijenaz inhibitörü, indometazin (İNDÖ, 10^{-5} M) varlığında sıçan karotid (Şekil 4-19A ve Tablo 4-9) ve mezenterik arterinde (Şekil 4-19B ve Tablo 4-10) sıçan retinası ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtları inhibitör uygulaması öncesi elde edilen retinal gevşeme yanıtları (kontrol) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir.



Şekil 4-19: İzole sıçan karotid (A) ve mezenterik arterinde (B) retina kaynaklı gevşeme yanıtlarında siklooksijenaz inhibitörü indometazin (10^{-5} M) etkisi, n=6-9

Tablo 4-9: Çeşitli inhibitörler ile inkübe edilen izole karotid arterlerde $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile elde edilen prekontraksiyon düzeyleri ve retina dokusuna bağlı olarak oluşan maksimum gevşeme yanıtları

	Prekontraksiyon (mN/mm)	$E_{\text{maks.}}$ (%)	n
Kontrol	2,02±0,39	79,77±5,79	8
+L-NOARG (10^{-4}M)	1,97±0,23	81,65±6,30	8
Kontrol	2,41±0,47	79,62±5,44	6
+ODQ (10^{-5}M)	2,66±0,45	80,11±5,02	6
Kontrol	2,75±0,21	76,13±7,15	6
+INDO. (10^{-5}M)	2,17±0,25	75,81±7,60	6

$R_{\text{maks.}}$: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının ($E_{\text{maks.}}$) % cinsinden değeri.

n: İzole arter sayısı

Tablo 4-10: Çeşitli inhibitörler ile inkübe edilen izole mezenterik arterlerde $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile elde edilen prekontraksiyon düzeyleri ve retina dokusuna bağlı olarak oluşan maksimum gevşeme yanıtları

	Prekontraksiyon (mN/mm)	$E_{\text{maks.}}$ (%)	n
Kontrol	2,73±0,37	87,76±2,38	7
+L-NOARG (10^{-4}M)	2,88±0,40	87,83±3,22	7
Kontrol	2,87±0,43	92,50±1,42	8
+ODQ (10^{-5}M)	2,99±0,35	90,82±1,39	8
Kontrol	2,91±0,35	91,27±1,42	9
+INDO. (10^{-5}M)	2,68±0,30	92,14±1,64	9

$R_{\text{maks.}}$: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının ($E_{\text{maks.}}$) % cinsinden değeri.

n: İzole arter sayısı

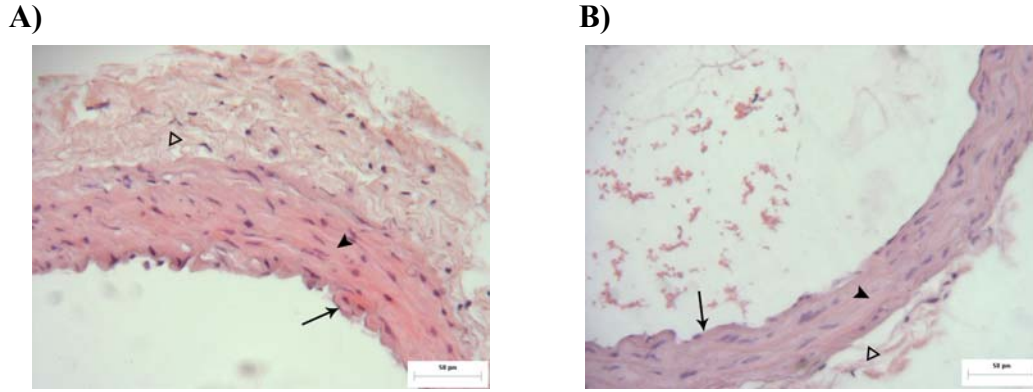
4.2. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal İncelemelerin Sonuçları

4.2.1. Dokuların Işık Mikroskobunda İncelenmesi

Kontrol ve diyabetik hayvanlardan izole edilen karotid arterlerin ışık mikroskobunda incelenmesiyle elde edilen bulgularda diyabetik karotid arterlerin tunika intima ve tunika media tabaklarının genişliğinin kontrollere göre oldukça azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4-20).

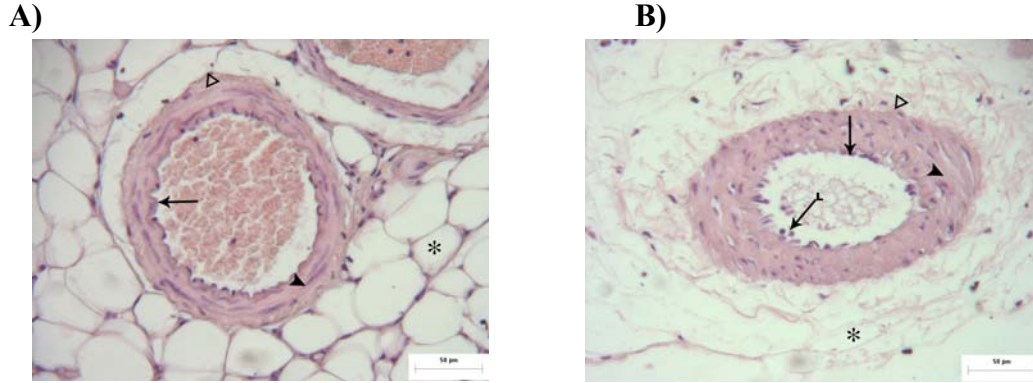
Kontrol ve diyabetik hayvanlardan izole edilen mezenterik arterlerin ışık mikroskobunda incelenmesiyle elde edilen bulgularda, özellikle mezenterik yağ dokusunun diyabetik mezenterik arterlerde belirgin şekilde azaldığı ve damar endoteliyle ilişkili ve ilişkisiz lökositlerin varlığı gözlenmiştir. Yine endotel düzeninin bozulduğu ve damar duvarının inceldiği tespit edilmiştir (Şekil 4-21).

Kontrol ve diyabetik gruplardan izole edilen retina dokusunun ışık mikroskobu ile incelenmesi sonucu elde edilen bulgularda, diyabetik grupta özellikle gangliyonik hücre tabakasında yer alan gangliyon hücrelerinde morfolojik değişiklikler gözlenmiş ve bu tabaka ile iç nükleer tabaka (INT) hücrelerinin oluşturduğu dendritik iç pleksiform tabakasının (İPT) görünüşünün diyabetle birlikte bozulduğu ve dendritik alanların genişlediği gözlenmiştir. Diyabetik grupta kontrol ile karşılaştırıldığında dış nükleer tabakadaki (DNT) rod ve kon hücreleri arasında yer yer hücre kayıplarının ve bozulmaların olduğu görülmüştür (Şekil 4-22).



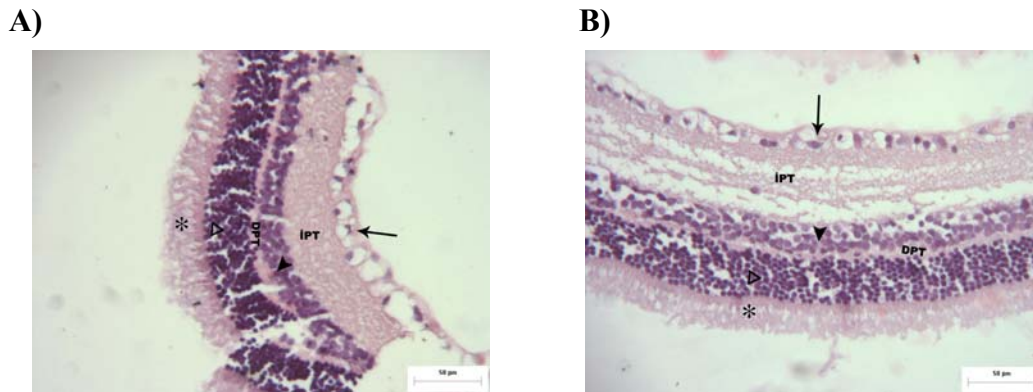
Şekil 4-20: Kontrol (A) ve diyabetik (B) gruplardan izole edilen karotid arterlerin ışık mikroskopunda görünümü

tunika intima (→), tunika media (►) ve tunika adventisya (Δ) n=4-6. Bar=50µm.



Şekil 4-21: Kontrol (A) ve diyabetik (B) gruplardan izole edilen mezenterik arterlerin ışık mikroskopunda görünümü

tunika intima (→), tunika media (►), tunika adventisya (Δ), yağ dokusu (*), endotelle ilişkili lökositler (L) n=4-6. Bar=50µm.



Şekil 4-22: Kontrol (A) ve diyabetik (B) gruplardan izole edilen retina dokusunun ışık mikroskopunda görünümü

gangliyonik hücre tabakası (→), iç pleksiform tabaka (İPT), iç nüklear tabaka (►), dış pleksiform tabaka (DPT), dış nüklear tabaka (Δ) ile rod ve konlar (*)n=4-6. Bar=50µm.

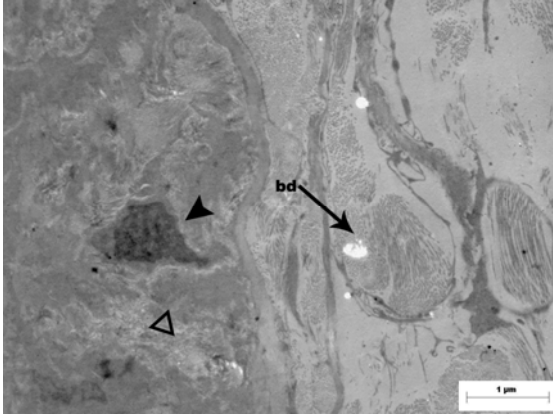
4.2.2. Dokuların Elektron Mikroskopunda İncelenmesi

Diyabetik karotid arterlerinde yapılan elektron mikroskobu incelemesinde endotel hücrelerinin oluşturduğu endotel tabakasının kontrol gruba göre genel yapısının bozulduğu ve yer yer endotele yapışmış lökositlerin bulunduğu belirlenmiştir. Diyabetik karotid arterlerinde tunika media tabakasında yer alan düz kas hücrelerinin yapılarının bozulduğu ve atrofiye olduğu, hücrelerarası bağlantılarda hasarların olduğu gözlenmiştir (Şekil 4-23).

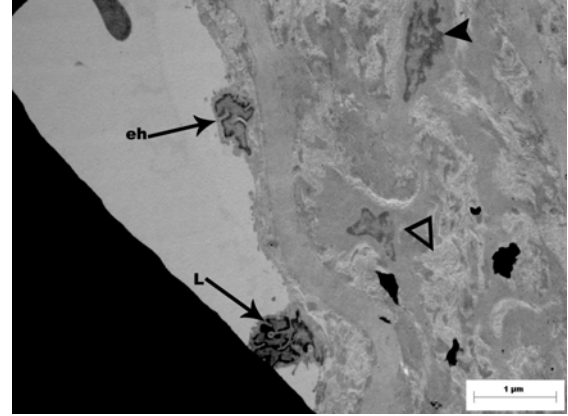
Diyabetik mezenterik arterlerde endotelle ilişkili ve ayrıca alt kas tabakasına infiltrat olmuş lökositlerin varlığı tespit edilmiştir. Diyabetik grupta tunika intima tabakasının hemen altında yer alan tunika media ,düz kas hücre tabakasının, düzeninin ve genel hücresel yapının bozulduğu görülmüştür (Şekil 4-24).

Diyabetik ve kontrol grubu hayvanlarından izole edilen retina dokularında yapılan elektron mikroskobu incelemelerinde özellikle diyabetik grupta iç pleksiform tabakalarının kalınlığının azaldığı ve iç nükleer tabakada yer alan bipolar ve horizontal hücrelerinin genel düzenlerinin ve yapılarının bozulduğu tespit edilmiştir. Dış nükleer tabakada yer alan hücrelerin de genel düzenlerinin bozulduğu hücrelerarası bağlantılarında hasarlar olduğu fakat kromatin yoğunluğunun ve hücre şeklinin diyabetik ve kontrol retina dokularında benzer olduğu görülmüştür (Şekil 4-25 ve 4-26).

A)



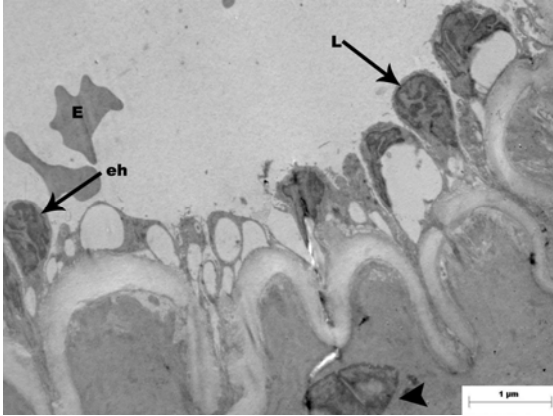
B)



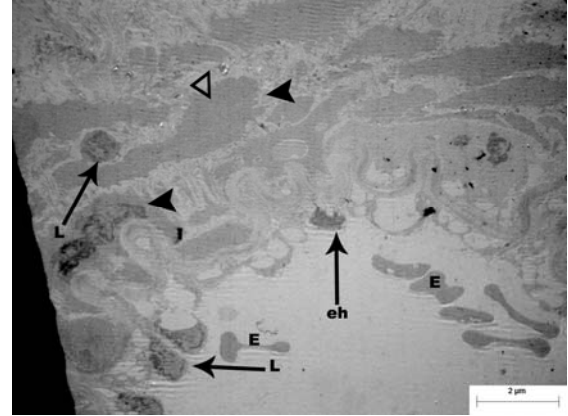
Şekil 4-23: Kontrol (A) ve diyabetik (B) karotid arterlerin elektron mikroskobunda görünümü

Düz kas hücresi (▶), hücrelerarası alan (△) ve bağ dokusu (bd), endotel hücresi (eh) ve lökosit (L) n=4-6. Bar= 1 μm.

A)

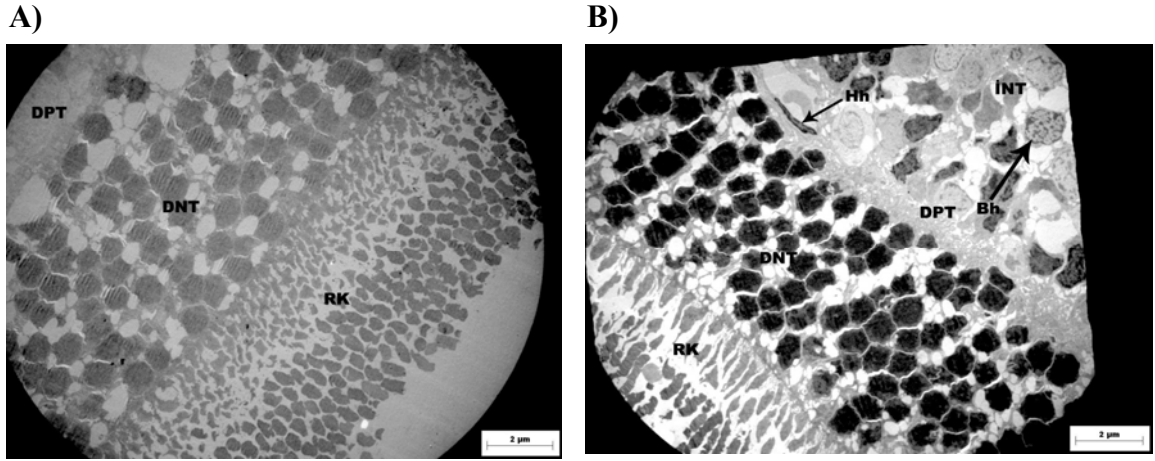


B)



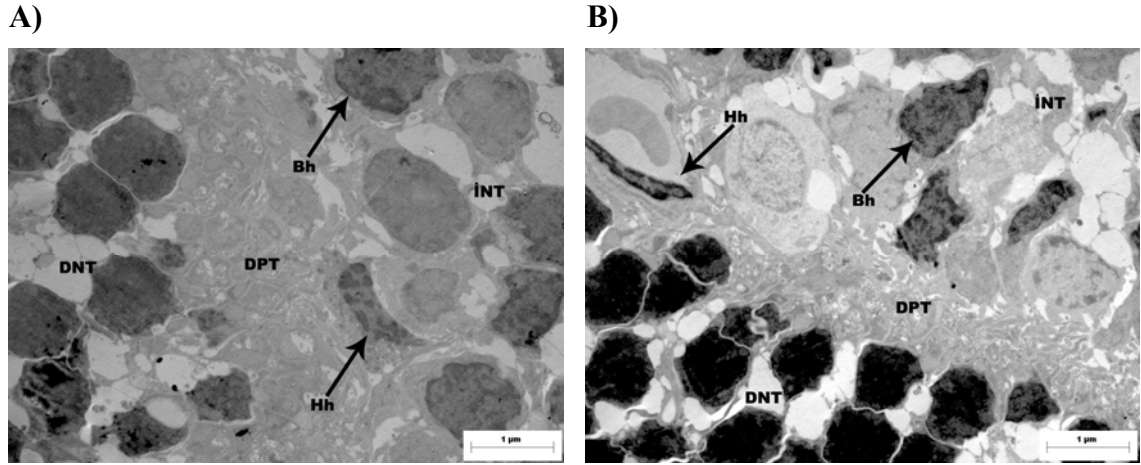
Şekil 4-24: Kontrol (A) ve diyabetik (B) mezenterik arterlerin elektron mikroskobunda görünümü

Eritrositler (E), endotel hücresi (eh), lökositler (L) ve düz kas hücresi (▶), hücrelerarası alan (△) n=4-6. Bar= 1 μm.



Şekil 4-25: Kontrol (A) ve diyabetik (B) retinaların elektron mikroskobundaki görünümü

Rod ve konlar (RK), dış nükleer tabaka (DNT) ile dış pleksiform tabaka (DPT), horizontal hücre (Hh), bipolar hücre (Bh) ve iç nükleer tabaka (İNT) n=4-6. Bar= 2 µm.



Şekil 4-26: Kontrol (A) ve diyabetik (B) retinaların elektron mikroskobunda görünümü

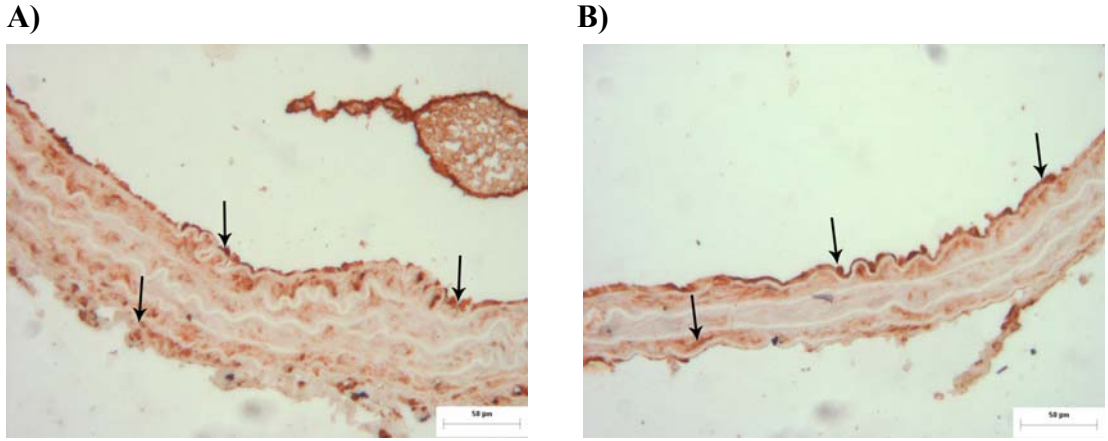
İç nükleer tabaka (İNT), dış pleksiform tabaka (DPT), bipolar hücre (Bh), horizontal hücre (Hh), bipolar hücre (Bh) ve dış nükleer tabaka (DNT) n=4-6 Bar= 1 µm.

4.2.3. Dokularda İmmünohistokimyasal İnceleme Sonuçları

Diyabetik karotid arterde yapılan immünohistokimyasal inceleme sonucunda, endotel tabakasında ve altındaki kas tabakasında eNOS dağılımının kontrol ile benzer olduğu tespit edilmiştir. iNOS dağılımının ise diyabette yoğun olarak tunika intima' da ve az miktarda da tunika adventisya' da artmış olduğu belirlenmiştir (Şekil 4-27 ve 4-30).

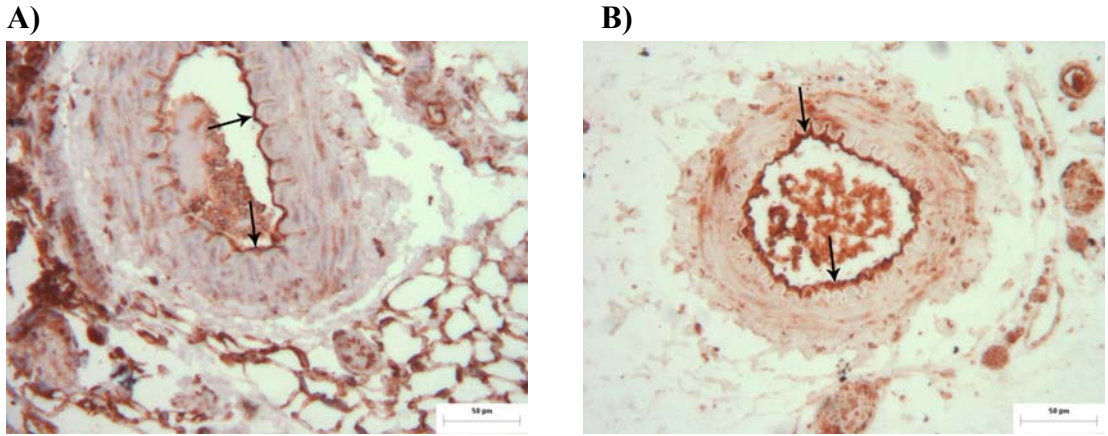
Mezenterik arterde yapılan immünohistokimyasal inceleme sonucunda, diyabetle birlikte eNOS dağılımının özellikle endotelde arttığı, iNOS dağılımının ise genel doku düzeyinde arttığı belirlenmiştir. (Şekil 4-28 ve 4-31).

Retina dokusu üzerinde yapılan immünohistokimyasal incelemede kontrol grupta sadece gangliyonik hücre katmanında gözlenen zayıf iNOS dağılımının diyabetik grupta belirgin şekilde yükseldiği tespit edilmiştir. Kontrol retina dokusunda genel doku düzeyinde eNOS dağılımının yüksek olduğu gözlenmiştir. Diyabetik retinada ise özellikle gangliyonik hücre tabakası ve iç nükleer tabaka hücrelerinde eNOS dağılımının belirgin ve kontrole benzer düzeyde olduğu görülmüştür (Şekil 4-29 ve 4-32).



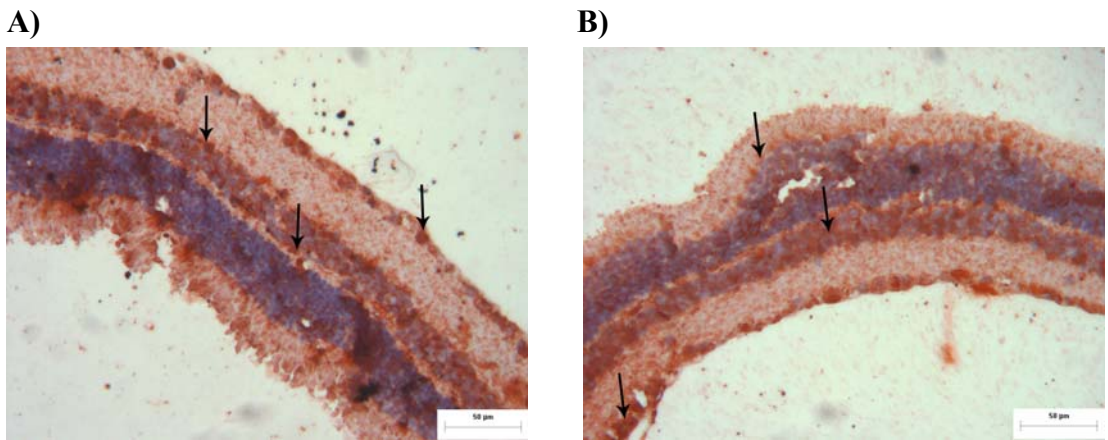
Şekil 4-27: Kontrol (A) ve diyabetik (B) karotid arterlerde eNOS dağılımı

n=4-6. Bar=50µm.



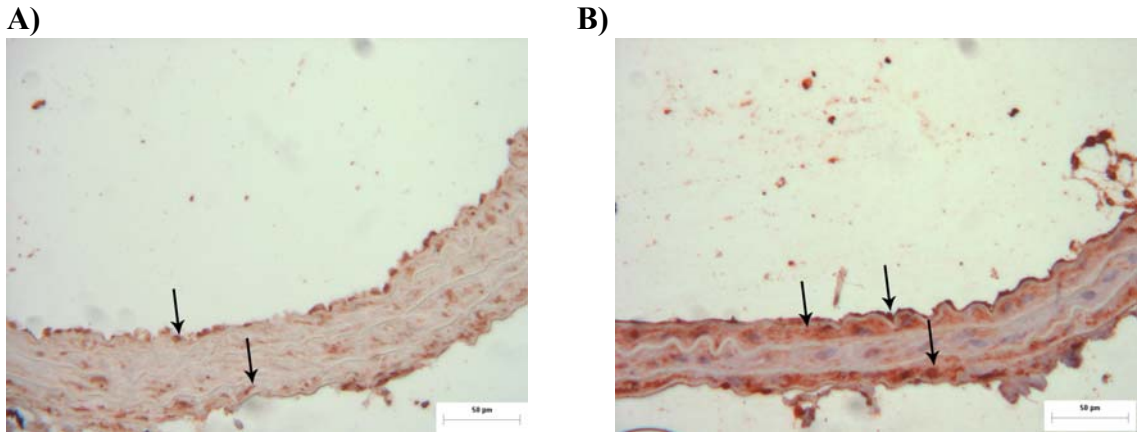
Şekil 4-28: Kontrol (A) ve diyabetik (B) mezenterik arterlerde eNOS dağılımı

n=4-6. Bar=50µm.



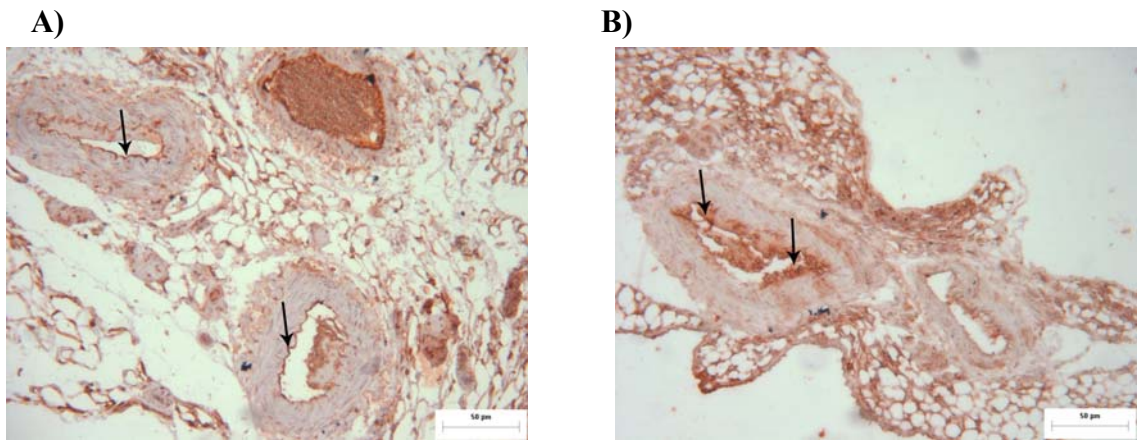
Şekil 4-29: Kontrol (A) ve diyabetik (B) retina dokularında eNOS dağılımı

n=4-6. Bar=50µm.



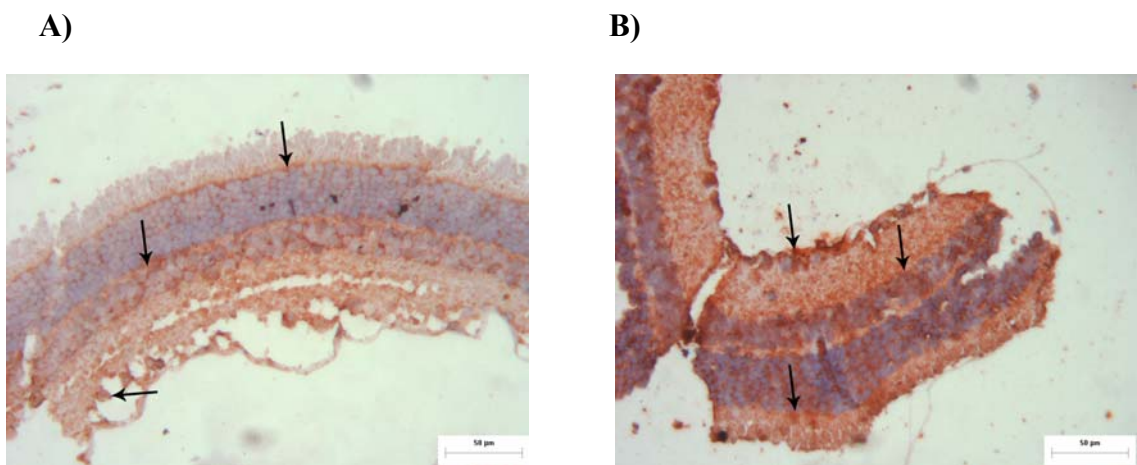
Şekil 4-30: Kontrol (A) ve diyabetik (B) karotid arterlerde iNOS dağılımı

n=4-6. Bar=50µm.



Şekil 4-31: Kontrol (A) ve diyabetik (B) mezenterik arterlerde iNOS dağılımı

n=4-6. Bar=50µm.



Şekil 4-32: Kontrol (A) ve diyabetik (B) retina dokularında iNOS dağılımı

n=4-6. Bar=50µm.

5. TARTIŞMA

Retinal gevşetici faktör (RRF), retinadan salıverilen ve retinal arter tonusunun düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülen ancak yapısı, etki mekanizması ve patofizyolojik önemi henüz aydınlatılmamış olan yeni bir gevşetici faktördür. Çalışmamızda RRF'in etkisinin, vasküler sistemde ve gözde önemli komplikasyonlara yol açabilen kardiyovasküler bir hastalık olan diyabette incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, streptozotosin ile diyabet oluşturulan sıçanlardan izole edilen retina dokusunun gevşetici etkisi (RRF'in etkisi) prostaglandin $F_{2\alpha}$ ile kastırılmış olan sıçan karotid ve mezenterik arterleri ile sığır retinal arterinde, kontrol retinanın etkisi ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Ayrıca, retinanın karotid ve mezenterik arterlerdeki gevşetici etkisinin endotel ile ilişkili mekanizmaları araştırılmıştır. RRF etkisinin incelendiği izole karotid, mezenterik ve retinal arterlerde endotel ve düz kas fonksiyonları da belirlenmiştir. Fonksiyonel çalışmalara paralel olarak, kontrol ve diyabetik hayvanlardan izole edilen arterler ve retina dokularında ışık ve elektron mikroskopları altında histopatolojik incelemeler yapılmış ve immünohistokimyasal yöntem ile eNOS ve iNOS dağılımları değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda ilk olarak, izole sıçan retinasının sıçan karotid ve mezenterik arterleri üzerindeki etkisi incelenmiş ve sığır retinal arterindeki etkisi ile karşılaştırılmıştır. İzole edilen arterlerin miyograf sistemine yerleştirilmesi ve standardizasyonunun ardından, endotel ve düz kas aracılı gevşeme kapasiteleri belirlenmiştir. Retinanın etkisi prostaglandin $F_{2\alpha}$ ile kastırılan izole karotid ve mezenterik arterleri üzerine bir parça sıçan retina dokusunun yerleştirilmesi ile araştırılmıştır. Elde ettiğimiz bulgular, sıçan karotid ve mezenterik arterinin daha güçlü endotel ve düz kas gevşeme kapasiteleri ile sığır retinal arterinden farklılık gösterdiğini ancak sıçan retinasının her üç arterde de tam bir gevşeme yanıtına neden olduğunu ortaya koymuştur. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilen arterlerden elde edilen retina kaynaklı gevşeme yanıtının, mezenterik ve retinal arterde daha belirgin olmak üzere, genellikle bifazik karakter gösterdiği ve periferik arterlerdeki (karotid ve mezenterik) retinal gevşeme yanıtlarının retinal arterde elde edilen gevşeme yanıtları ile

benzerlik gösterdiği gözlenmiştir. Gevşetici etki, retina dokusu kaldırıldığında tamamen geriye dönmekte ve tekrarlanabilir özellik göstermektedir. Bu bulgular, gerek retinal arterde gerekse retinal arterden farklı dedektör arterlerde retinanın etkisinin incelendiği diğer çalışmaların sonuçlarıyla uyumluluk göstermekte ve RRF 'in varlığını desteklemektedir (Delaey ve Van de Voorde 1998, Boussery ve ark. 2002, Boussery ve ark. 2002). Ancak, çalışmamızda retina ile karotid ve mezenterik arterler üzerinde tama yakın düzeyde gevşetici etki elde edilmesi, retinanın retinal arter dışındaki damarlarda daha düşük düzeyde gevşeme oluşturduğunu bildiren çalışmalardan farklılık göstermektedir (Delaey ve Van de Voorde 1998, Boussery ve ark. 2002, Boussery ve ark. 2002). Retinal arterin RRF'in etkisine karşı daha duyarlı olduğunu belirten bu çalışmalara karşın, bulgularımız RRF'in periferik ve retinal arterler üzerindeki etkisinin benzer düzeyde olduğunu göstermektedir. Buna göre, çalışmamızın sonuçları RRF'in daha genel bir gevşetici faktör olabileceği görüşünü desteklemektedir (Maenhaut ve ark. 2007).

Öte yandan, sıçan retinasına benzer büyüklükteki sığır koroid dokusunun, retinadan farklı olarak, karotid, mezenterik ve retinal arterler üzerinde zayıf bir gevşeme veya kasılma yanıtına neden olması retinal gevşemenin mekanik bir etki sonucu oluşmadığını ortaya koymuştur. Bu bulgu, retina ve koroid dokusunun retinal arterdeki etkisini karşılaştıran diğer çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermektedir (Delaey ve Van de Voorde 1998; Takır ve ark. 2005).

RRF'in retinal arterleri gevşetici etkisinde, bilinen endojen vazoaktif faktörler olan, NO ve prostasiklinin rolü olmadığı öne sürülmektedir (Delaey ve Van de Voorde 1998, Boussery ve ark. 2002, Boussery ve ark. 2002). Çalışmamızda sıçan retinası ile sıçan karotid ve mezenterik arterleri üzerinde elde edilen gevşetici etkide bu mekanizmaların rolü araştırılmış ve bu amaçla, sıçan retina dokusu ile karotid ve mezenterik arterler, NO sentaz inhibitörü L-NOARG, guanilat siklaz inhibitörü ODQ ve siklooksijenaz inhibitörü indometazin ile inkübe edilmişlerdir. Karotid ve mezenterik arterde inhibitörler varlığında elde edilen retinal gevşeme yanıtlarının, inhibitör öncesinde elde edilen kontrol yanıtlardan farklı bulunmaması, retina kaynaklı gevşetici etkinin NO ve prostasiklinden farklı bir mekanizma aracılığı ile gerçekleştiğini

göstermektedir. Bu bulgular, gerek retinal arter gerekse farklı dedektör arterlerin (sıçan karotid arteri, fare aortası) kullanıldığı diğer çalışmalarda benzer inhibitörlerin kullanılması ya da endotel hasarı oluşturulması sonrasında elde edilen retinal gevşeme yanıtları ile uyumluluk göstermektedir (Delaey ve Van de Voorde 1998, Boussery ve ark. 2002, Boussery ve ark. 2002; Takır ve ark. 2005).

Retina dokusu ile izole sıçan karotid ve mezenterik arterinde, retinal arterde elde edilene benzer düzeyde ve özellikle, gevşeme yanıtının oluştuğunun belirlenmesinin ardından hedefimiz doğrultusunda, diyabetin retina kaynaklı gevşetici etkiyi ne yönde etkileyeceği araştırılmıştır. Diyabet, Wistar albino erkek sıçanlarda streptozotosin (STZ, 65 mg/kg, i.p.) injeksiyonu ile oluşturulmuş ve hayvanlar 8 hafta boyunca ağırlık ve kan glukoz düzeyleri açısından takip edilmiştir. Bu süre içerisinde diyabetik olan sıçanlarda, kontrol grubu (serum fizyolojik %0,9, i.p.) sıçanlara oranla belirgin kilo kaybı ve yüksek kan glukoz düzeyleri gözlenmiştir. Oluşturulan diyabetin diğer göstergelerinden olan serum insülin düzeyleri ise 8 haftanın sonunda deneye alınan hayvanlardan toplanan kan örneklerinde ölçülmüş ve diyabetik grupta serum insülin düzeylerinin kontrole göre oldukça düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir. Diyabetik sıçanlarda elde edilen bu veriler, STZ'nin kullanıldığı diğer çalışmalarda bildirilen diyabetik hayvan özellikleri ile paralellik göstermektedir (Miao ve ark. 2002).

Diyabetik hayvanlarda gözlenen retinal lezyonların insanlarda oluşan diyabetik retinopatiye benzerlik gösterdiği (Engerman ve Kern 1995) ve 6-8 haftalık diyabet süresi sonunda retinada oluşan yapısal değişikliklerin diyabetik retinopati ile uyumlu olduğu bildirilmektedir (Kaneko ve ark. 2007). 8 haftayı geçen sürelerde ise gözde diyabete bağlı hasarın ilerlediği ve katarakt oluştuğu belirtilmektedir (Kaneko ve ark. 2007). Öte yandan, diyabetin vasküler sistemdeki etkilerinin de diyabet süresi ile ilişkili olarak değiştiği ve artan diyabet süresinin endotel hasarını artırdığı rapor edilmektedir (De Vriese ve ark. 2000, Schalkwijk ve Stehouwer 2005). Deneysel olarak oluşturulan diyabette damar endotel fonksiyonun 6-8 hastalık diyabet süreci sonunda azaldığı (Soriano ve ark. 2001, Tawfik ve ark. 2006). 2-4 haftalık bekleme süreçlerinde ise endotel bağımlı yanıtlarda belirgin değişiklik oluşmadığı bildirilmektedir (De Vriese ve ark. 2000). Buna göre, çalışmamızda uygulanan 8 haftalık diyabet sürecinin vasküler

sistem üzerinde diyabetin oluşturduğu değişikliklerin görülmesi ve diyabetik retinopatinin gelişmesi açısından uygun olduğu görülmektedir.

Sekiz haftanın sonunda anestezi edilen kontrol ve diyabetik sıçanların karotid ve mezenterik arterleri ile retina dokuları izole edilmiştir. İzole edilen arterlerin miyograf sistemine yerleştirilmesi ve standardizasyonunun ardından, endotel bağımlı ve düz kas aracılıklı gevşeme kapasiteleri incelenmiş ve prostaglandin $F_{2\alpha}$ 'ya karşı reaktiviteleri belirlenmiştir.

Diyabetik sıçanlardan izole edilen karotid ve mezenterik arterlerde asetilkolin ile elde edilen endotel bağımlı gevşeme yanıtlarının kontrol grubun arterlerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı belirlenmiştir. Buna karşın, kontrol ve diyabetik sıçanların karotid ve mezenterik arterlerinde sodyum nitroprusiyat ile elde edilen düz kas gevşeme yanıtlarının istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği gözlenmiştir. Elde ettiğimiz bu bulgular, sıçanlarda oluşturulan 8 haftalık deneysel diyabette endotel disfonksiyonun oluştuğunu ancak endotelden bağımsız düz kas gevşeme yanıtlarının değişmediğini göstermekte ve benzer sonuçları rapor eden deneysel çalışmalar ile paralellik göstermektedir (Makino ve ark. 2000, Miranda ve ark. 2000, Vallejo ve ark. 2000, Ishikawa ve ark. 2004, Ajay ve ark. 2006, Elmi ve ark. 2008). Ayrıca, diyabetik sıçan karotid ve mezenterik arterlerinin endotel fonksiyonunda gözlediğimiz bu azalma, diyabetin insanlarda endotel disfonksiyonuna neden olduğunu bildiren çalışmalar ile de uyumludur (Rizzoni ve ark. 2001). Buna karşın, literatürdeki bazı deneysel çalışmalarda ise, diyabetin endotel aracılı yanıtları değiştirmedeği rapor edilmektedir (Huvers ve ark. 1999, Ghasemi ve ark. 2007, Hirabara ve ark. 2007). Deneysel çalışmalarda görülen bu farklılığın nedeninin diyabet oluşturulma yöntemi, diyabet oluşturulan hayvanlardaki bekleme süresi ve incelenen damar yatağının farklı olması ile ilişki olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda kontrol ve diyabetik grubun karotid ve mezenterik arterlerinde prostaglandin $F_{2\alpha}$ 'nın oluşturduğu konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtları da değerlendirilmiştir. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ 'nın maksimum kastırıcı etkisi, karotid arterde

kontrol ve diyabetik gruplar arasında farklılık göstermemiş ancak pD_2 değeri açısından diyabetik karotid arterde kontrole göre anlamlı düzeyde bir azalma gözlenmiştir. Mezenterik arterde ise, hem maksimum kasılma düzeyi hem de pD_2 değerlerinin diyabetik grupta kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı belirlenmiştir. Çalışmamızda diyabetik hayvanların karotid ve mezenterik arterlerinin kastırıcı ajana karşı duyarlılığında ve/veya maksimum cevaplılığında belirlenen bu azalma, diyabette vasküler reaktivitenin azaldığını gösteren diğer çalışmalar ile paralellik göstermektedir (Bucci ve ark. 2004, Ma ve ark. 2008). Bazı deneysel çalışmalarda ise, diyabetik arterlerde kastırıcı ajanlara karşı vasküler reaktivitenin değişmediği veya arttığı bildirilmektedir (Ajay ve ark. 2006, Ajay ve Mustafa 2006). Bu farklılığın sebebinin, incelenen damar yatağı, diyabet süresi ve etkisi incelenen kastırıcı ajan ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Endotel ve düz kas gevşeme kapasiteleri ile prostaglandin $F_{2\alpha}$ 'ya karşı reaktivitesi belirlenen diyabetik ve kontrol sıçanların karotid ve mezenterik arterlerinde, retinanın gevşetici etkisi incelenmiştir. Retinanın etkisi prostaglandin $F_{2\alpha}$ ile kastırılan izole karotid ve mezenterik arterleri üzerine bir parça sıçan retina dokusunun yerleştirilmesi ile araştırılmıştır. Kontrol retinanın gevşetici etkisi kontrol karotid ve mezenterik arterlerinde, diyabetik retina dokusunun gevşetici etkisi ise diyabetik karotid ve mezenterik arterler üzerinde incelenmiştir. Bunun yanısıra, diyabetik retinanın kontrol arterlerde, kontrol retinanın ise diyabetik arterlerdeki etkisi de araştırılmıştır. Diyabetik retina ile elde edilen gevşeme yanıtları, kontrol retinada olduğu gibi, hızla başlamış ve mezenterik arterde daha fazla olmak üzere, bifazik bir karakter göstermiştir. Diyabetik sıçan retinası ile diyabetik karotid ve mezenterik arterlerinde alınan gevşeme yanıtları, kontrol retinanın kontrol arterlerdeki gevşeme yanıtları ile istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Paralel olarak, diyabetik retinanın kontrol arterler üzerindeki etkisi kontrol retinadan, kontrol retinanın diyabetik arterler üzerindeki etkisi de diyabetik retinadan farklı bulunmamıştır.

Ayrıca, kontrol ve diyabetik sıçan retinasının izole sığır retinal arteri üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilen sığır retinal arterinde diyabetik ve kontrol retinanın etkisi paralel olarak incelenmiş ve elde edilen retinal

gevşeme yanıtları karşılaştırılmıştır. İzole sıgır retinal arterinde, kontrol ve diyabetik sıçanlardan izole edilen retinaların gevşetici etkisinde herhangi bir farklılık olmadığı gözlenmiştir.

Elde edilen bu bulgular, retina kaynaklı gevşetici etkinin diyabet varlığında herhangi bir değişiklik göstermediğini ortaya koymakta ve azalan endotel fonksiyonuna karşın RRF'in kompensatuvar bir mekanizma ile arter tonusunun düzenlenmesinde rolünün olabileceğini düşündürmektedir. Endotel disfonksiyonunun geliştiği ve vasküler reaktivitenin bozulduğu belirlenen diyabetik koşulda RRF'in etkinliğinin değişmemiş olması, RRF'in salıverildiği retinal hücrelerin diyabetten etkilenmediğini ya da RRF'in vasküler düz kası gevşetici etki mekanizmasının diyabetle indüklenen patofizyolojik olaylardan etkilenmediğini düşündürmektedir.

Retina kaynaklı gevşetici etkinin mekanizması henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. RRF'in, retinal arter tonüsünü regüle ettiği bilinen retinal ve endotel kaynaklı vazoaaktif maddelerden farklı olduğu ve gevşetici etkisinde hücre içi kalsiyum düzeyini regüle eden mekanizmaların rolü olduğu düşünülmektedir. Bugüne kadar elde edilen bulgular retinanın gevşetici etkisinde, hücre içinden hücre dışına kalsiyum çıkışından sorumlu plazmalemmal Ca^{++} ATP az pompasının aktivasyonunun (Boussery ve ark. 2002) ve damar düz kasının kalsiyuma karşı duyarlılığının azaltılmasının (Takır ve ark. 2006a) rol oynadığını ileri sürmektedir. Ayrıca, laboratuvarımızda yürütülen bir çalışmada, rho kinaz yolağının spesifik inhibitörü Y27632 ile retinal arterde RRF'e benzer maksimumda ve özellikle gevşeme yanıtı alınmış ve retina kaynaklı gevşetici etkinin mekanizmasının rho-kinaz yolağının inhibisyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür (Yayınlanmamış bulgular). Düz kasın kalsiyuma karşı duyarlılaştırılmasında etkin rol oynayan rho kinaz yolağının aktivitesinin bazı damar yataklarında (ör: serebral sirkülasyon) diyabet varlığında arttığı gösterilmiş (Didion ve ark. 2005) ve bu yolağın diyabette endotel disfonksiyonuna aracılık eden mekanizmalarda (serbest radikal oluşumu, NO aracılı yanıtların azalması) rol oynadığı öne sürülmüştür (Budzyn ve ark. 2006). Bu bulgulara paralel olarak, Rho kinaz inhibitörlerinin diyabetik damarlarda daha belirgin bir gevşeme oluşturduğu (Didion ve ark. 2005) ve ayrıca diyabetik damarlardaki endotel disfonksiyonunu geriye

döndürdüğü rapor edilmiştir (Shah ve Singh 2006). Buna karşın, diyabetik farelerin korpus kavernosumunda yapılan bir çalışmada ise, Rho kinaz inhibitörü Y27632 nin etkisinin diyabete bağlı olarak değişmediği gösterilmiştir (Buyukafsar ve Un 2003). Retinal sirkülasyonda ise Rho kinaz yolağının aktivitesinin ve Rho kinaz inhibitörlerinin retinal arterleri gevşetici etkisinin diyabette ne yönde değiştiği henüz bilinmemektedir. Bazı çalışmalarda, spesifik Rho kinaz inhibitörü olan fasudilin ve kolesterol sentezini engellemek suretiyle Rho kinaz yolağını inhibe eden fluvastatinin diyabetin erken döneminde ekspresyonu artan VEGF oluşumunu engellemek suretiyle diyabetik retinopatinin tedavisinde etkili olabileceği ileri sürülmüş ve bu verilere göre Rho kinaz yolağının diyabetik retinopatide rol oynadığı öngörülmüştür (Yokota ve ark. 2007, Hata ve ark. 2008). Buna göre, çalışmanın bundan sonraki aşamasında diyabetik retinada rho kinaz ekspresyonunun ve diyabetik arterlerde rho kinaz inhibitörü Y27632' nin gevşetici etkisinin karşılaştırılması planlanmakta ve elde edilecek bulguların RRF'in diyabette korunan gevşetici etkisini açıklayıcı olacağı düşünülmektedir.

Diyabetin patofizyolojisinde önemli rol oynayan endotel disfonksiyonunun varlığı çalışmamızda diyabetik sıçan karotid ve mezenterik arterlerde yürütülen fonksiyonel çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu çalışmaları tamamlayıcı nitelikte, izole edilen karotid ve mezenterik arterleri ile retina dokusunda ışık ve elektron mikroskopunda histopatolojik incelemeler yapılmış ve diyabete ilişkin yapısal değişiklikler belirlenmiştir. Ayrıca, diyabette görülen patofizyolojik değişikliklerin mekanizması ile ilgili olarak immünohistokimyasal yöntem ile kontrol ve diyabetik arterler ile retina dokusunun eNOS ve iNOS dağılımları incelenerek karşılaştırılmıştır.

Karotid arterde ışık mikroskobu ile yapılan incelemelerde diyabetik grupta düz kasın tunika intima ve tunika media tabakalarının genişliğinde kontrol grubuna göre bir azalma olduğu ve endotel bütünlüğünde bir bozulma olduğu tespit edilmiştir. Elektron mikroskobu incelemelerinde ise diyabetik karotid arterinde endotel tabakasının hücresel yapısının bozulduğu endotelde lökosit adhezyonu ve akümüasyonu olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, tunika media tabakasında yer alan düz kas hücrelerinin yapılarının bozulduğu ve atrofiye oldukları, hücreler arası bağlantılarda hasarın olduğu gözlenmiştir.

Mezenterik arterde ışık mikroskobu ile yapılan incelemelerde ise, diyabetik grupta kontrole göre yağ dokusunun belirgin şekilde azaldığı, endotel tabakasının düzeninin bozulduğu, endotelde lökosit adhezyonunun olduğu ve damar duvarının incelendiği görülmüştür. Elektron mikroskobu incelemelerinde de yine diyabetik grupta genel hücresel yapının düzeninin bozulduğu ve lökosit infiltrasyonu sonucu özellikle düz kas tabakasına infiltre olmuş olan lökositlerin varlığı gözlenmiştir.

Elde edilen bu histopatolojik bulgular, karotid ve mezenterik arterde diyabete bağlı olarak gelişen endotel hasarını ve düz kasta gelişen yapısal değişiklikleri ortaya koymaktadır. Bu bulgular, diyabetik arterlerde endotel tabakasının düzeninin bozulduğunu, lökosit infiltrasyonunun olduğunu ve düz kas yapısının değiştiğini ortaya koyan diğer çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermektedir (Matsuoka ve ark. 2005, Sotnikova ve ark. 2006, Wang ve ark. 2006, Akgun-Dar ve ark. 2007). Elde edilen bu histopatolojik sonuçlar, diyabetik karotid ve mezenterik arterde endotel kaynaklı gevşeme yanıtlarının ve kastırıcı ajana karşı duyarlılığın azaldığını gösteren fonksiyonel bulgularımız ile örtüşmektedir.

Retina dokusunun ışık mikroskobunda yapılan incelenmeleri sonucunda, diyabetik grupta özellikle gangliyonik hücrelerde yapısal değişikliklerin olduğu, iç pleksiform tabakasının görünüşünün bozulduğu, dentritik alanların genişlediği ve dış nükleer tabakadaki rod ve kon hücreleri arasında yer yer hücre kayıpları ve yapısal hasarın olduğu gözlenmiştir. Elektron mikroskobu incelemelerinde ise diyabetik retinada kontrole göre, iç pleksiform tabakasının kalınlığının azaldığı, dış nükleer tabakada kromatin yoğunluğunun ve hücre şeklinin korunmasına rağmen hücrelerarası bağlantıların bozulduğu ve iç nükleer tabakadaki bipolar ve horizontal hücrelerin genel düzenlerinin ve yapılarının da bozulduğu tespit edilmiştir. Retinanın histopatolojik olarak incelenmesi sonucu elde edilen bu bulgular, deneysel diyabetin retinadaki etkilerini inceleyen benzeri çalışmaların verileri ile paralellik göstermektedir (Mizutani ve ark. 1996, Qin ve ark. 2006, Gardiner ve ark. 2007, Yulek ve ark. 2007). Retina dokusunda belirlenen bu yapısal değişiklikler, sıçanlarda STZ ile oluşturduğumuz diyabet modelinde, diyabetik retinopatinin gelişimini destekleyici özelliktedir. Buna göre,

fonksiyonel bulgularda diyabetik retinanın periferal (karotid ve mezenterik) ve retinal damarları gevşetici etkisinin değişmemesi, RRF'in salıverildiği hücrelerin diyabette belirgin düzeyde hasar görmemesi ile ilişkili olabilir. RRF'in retinada hangi hücrelerden salıverildiği ise henüz bilinmemektedir.

Diyabette görülen patofizyolojik değişikliklerin mekanizması ile ilgili olarak immünohistokimyasal yöntem ile kontrol ve diyabetik arterler ile retina dokusunda eNOS ve iNOS dağılımları incelenmiştir. Diyabetik karotid arterde endotel ve altındaki kas tabakasında eNOS dağılımının kontrol ile benzer düzeyde olduğu gözlenmiştir. Mezenterik arterde ise, eNOS dağılımının diyabetik grupta özellikle endotelde arttığı tespit edilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda da diyabetik arterlerde eNOS düzeylerinde bir değişiklik olmadığı veya eNOS dağılımının ve ekspresyonunun arttığı bildirilmektedir (Hink ve ark. 2001, Bucci ve ark. 2004, Kobayashi ve ark. 2004, Zanetti ve ark. 2005). Buna karşın, diyabette eNOS ekspresyonunun azaldığını ve azalan NO düzeylerinin endotel disfonksiyonu ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalarda bulunmaktadır (İbrahim ve ark. 2005, Nagareddy ve ark. 2005). Bu durumda, çalışmamızda diyabetik karotid arterde gözlenen değişmemiş eNOS dağılımı ve diyabetik mezenterik arterde gözlenen artmış eNOS dağılımı, fonksiyonel olarak bu arterlerde gözlediğimiz endotel kaynaklı gevşeme yanıtlarındaki azalma ile çelişkili görünmektedir. Ancak, asetilkolin ile alınan endotel kaynaklı gevşeme yanıtlarında azalma oluşurken eNOS ekspresyonunun yüksek bulunduğu bildirilen başka çalışmalarda bulunmaktadır (Hink ve ark. 2001). Diyabette artan oksidatif stresin serbest radikallerin oluşumu artırdığı ve NO'nun serbest radikaller ile birleşerek peroksinitrit (ONOO⁻) oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. ONOO⁻ ve diğer serbest radikallerin ise NO'nun inaktivasyonuna neden olarak biyoyararlanımını azalttığı bildirilmektedir (Kossenjans ve ark. 2000, Hink ve ark. 2001). Ayrıca, diyabette artan serbest radikallerin NO sentezinde kofaktör olarak rol oynayan tetrahidrobiopterinin (BH₄) oksidasyonuna neden olarak inaktif hale getirdiği ve bu durumun eNOS kenetsizleşmesine (uncoupling) neden olduğu bildirilmektedir. Kenetsizleşen eNOS'un disfonksiyonel olduğu ve NO üretmek yerine süperoksit oluşuma neden olduğu belirtilmektedir (Milstien ve Katusic 1999, Hink ve ark. 2001). Buna göre çalışmamızda, diyabetik karotid ve mezenterik arterde kontrole göre değişmemiş veya artmış bulunan eNOS dağılımına karşın endotel aracılı gevşeme

yanıtların azalmış olmasının diyabette artmış oksidatif stresin sonucu azalan NO biyoyararlanımı ve disfonksiyonel eNOS oluşumu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Kontrol ve diyabetik retina dokularının eNOS dağılımı açısından incelenmeleri ise kontrol retinada genel doku düzeyinde yüksek olan eNOS dağılımının diyabette korunduğu ayrıca, diyabette özellikle gangliyonik ve iç nükleer tabaka hücrelerinde belirgin olduğu gösterilmiştir. Diyabetik retinada değişmemiş eNOS dağılımı veya ekspresyonu yapılan diğer bazı çalışmalarda da rapor edilmekte ve bulgularımızı desteklemektedir (Cukiernik ve ark. 2004). Bunun yanısıra bazı çalışmalarda retinal eNOS ekspresyonunun diyabette VEGF aracılıklı bir mekanizma ile arttığı ve bu artışın diyabetik retinopati oluşumunda rol oynayabileceği bildirilmektedir (Joussen ve ark. 2002b, Caldwell ve ark. 2005).

Arterlerinin iNOS dağılımı yönünden incelenmesi ise diyabetik karotid arterde kontrole göre iNOS dağılımının yoğun olarak tunika intimada ve az miktarda tunika adventisyada artmış olduğunu göstermiştir. Mezenterik arterde yapılan iNOS dağılımı incelenmesi sonucunda ise diyabetle birlikte iNOS dağılımının genel doku düzeyinde belirgin düzeyde arttığı gözlenmiştir. Bu bulgular, deneysel diyabette vasküler düz kaslarda iNOS ekspresyonunun ve aktivitesinin arttığını gösteren diğer çalışmalar ile desteklenmektedir (Bardell ve MacLeod 2001, Cignarella ve ark. 2006, Takahashi ve ark. 2008). iNOS, konstitütif NOS'lara (eNOS ve nNOS) oranla daha yüksek miktarlarda NO oluşumuna aracılık eden bir enzimdir. Ancak, diyabetik koşullarda serbest radikaller oluşumunun artması sebebiyle iNOS etkisiyle oluşan aşırı miktardaki NO'nun biyoyararlanımının azaldığı ileri sürülmektedir. Ayrıca, serbest radikallerin NO ile etkileşimi sonucu oluşan ONOO⁻'in damar reaktivitesi üzerinde direkt inhibitör etkilerinin olduğu ve diyabette azalan vasküler reaktivitede rol oynadığı bildirilmektedir (Villa ve ark. 1994, Benkusky ve ark. 1999). Bununla birlikte, bazı çalışmalarda da iNOS etkisi ile oluşan aşırı NO'nun diyabette damar reaktivitesinde gözlenen inhibisyonda etkili olabileceği öne sürülmektedir (Nagareddy ve ark. 2005, Kitayama ve ark. 2006). Bu bilgiler doğrultusunda, çalışmamızda diyabetik karotid ve mezenterik arterinde gözlenen endotel disfonksiyonu ve azalan vasküler reaktivitenin iNOS dağılımındaki artış ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Kontrol ve diyabetik retinalarda incelenen iNOS dağılımlarında ise kontrol retinada sadece gangliyonik hücre katmanında gözlenen zayıf iNOS dağılımının diyabetik grupta belirgin düzeyde arttığı tespit edilmiştir. Diyabetik retinopati üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarda diyabetik retina dokusunda iNOS dağılımının ve ekspresyonunun arttığı gösterilmiş ve bu artışın diyabetik retinopatinin patojenezinde rol oynayan hücresel mekanizmalar etkisinde gerçekleştiği bildirilmiştir (Du ve ark. 2004, Kern 2007, Zheng ve ark. 2007). Buna göre çalışmamızda diyabetik retina dokusunda kontrole göre iNOS dağılımının artmış olması, diyabetik retinopatinin oluşumunun bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir.

Diyabetik retinopatinin varlığının histopatolojik ve immunohistokimyasal sonuçlar ile desteklenirken fonksiyonel bulgularımızda diyabetik retina ile elde ettiğimiz retina kaynaklı gevşeme yanıtlarının hem retinal hem de periferik (karotid ve mezenterik) arterlerde kontrol retina yanıtları ile benzer oluşu dikkat çekicidir. Bu bulgular, RRF'in, etkisinin diyabetik retinopatide değişmediğini düşündürmektedir. Diyabette retinal kan akımının azaldığı gözlenmektedir. Bu azalmanın retinal mikrosirkülasyonda artan damar direnci ve endotel bağımlı yanıtlardaki bozulma ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Clermont ve Bursell, 2007). Diyabetik sıçanların retinal damarlarında NO'ya karşı cevaplılığın azaldığı gözlenmiş ve bu azalmanın endotelin-1, angiotensin II gibi vazokonstriktör maddelerin oluşumlarındaki artış ve oksidatif strese bağlı olarak eNOS aktivitesindeki azalma ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Clermont ve Bursell, 2007). Buna göre, çalışmamızda RRF'in gevşetici etkisinin diyabette değişmediğinin gözlenmesi, NO'dan farklı olduğu öne sürülen bu gevşetici faktörün diyabette bozulan retinal sirkülasyonun idamesinde kompensatuvar bir rolünün olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, retina kaynaklı gevşetici faktörün etkisinin incelendiği bu çalışmada elde ettiğimiz bulgular, sıçan retinasının sığır retinal arteri ile sıçan karotid ve mezenterik arterleri üzerinde benzer düzeyde gevşeme yanıtı oluşturduğunu göstermiş ve RRF'in daha genel bir gevşetici faktör olabileceği görüşünü desteklemiştir. Sıçan retinası ile karotid ve mezenterik arterde elde edilen retinal gevşeme yanıtının NO ve prostasiklinden bağımsız olduğu belirlenmiş ve bu sonucun retinanın retinal arterdeki

gevşetici etki mekanizması ile paralellik gösterdiği belirlenmiştir. Diyabette RRF'in etkinliği araştırılmış ve STZ ile diyabet oluşturulan sıçanların retinalarının hem periferal (karotid ve mezenterik) hem de retinal damarlar üzerindeki etkisi incelenmiştir. Diyabetik sıçanlardan izole edilen karotid ve mezenterik arterlerde fonksiyonel olarak belirlediğimiz endotel disfonksiyonu, bu arterlerde diyabet oluşumuna ilişkin yapısal değişiklikleri gösteren histopatolojik bulgular ile desteklenmiştir. Ayrıca, diyabetik arterlerde kontrole göre genellikle artmış bulunan eNOS ve iNOS dağılımları, diyabetin incelenen bu dokular üzerinde oluşturduğu hücresel hasarı ve azalmış bulunan vasküler reaktivite bulgularını destekleyici özelliktedir. Öte yandan, diyabetik retina dokusunda belirlenen yapısal değişiklikler ve iNOS dağılımında gözlenen artış, sıçanlarda oluşturulan 8 haftalık diyabette, diyabetik retinopatinin gelişimini desteklemektedir. Bununla birlikte, diyabetik retinanın diyabetik karotid ve mezenterik arterlerindeki gevşetici etkisinin, kontrol (normal) retinanın kontrol arterler üzerindeki gevşetici etkisi ile benzer olduğu bulunmuştur. Ayrıca, sıgır retinal arteri üzerinde diyabetik ve kontrol retinalarının gevşetici etkileri de farklı bulunmamıştır. Bu bulgular, diyabetik retinadan salıverilen RRF'in gevşetici etkisinin gerek endotel disfonksiyonun geliştiği belirlenen diyabetik periferal arterlerde gerekse retinal arterde değişmediğini göstermektedir. RRF'in retinada hangi hücrelerden salıverildiği ve damar düz kasını hangi mekanizmalar aracılığı ile gevşettiği henüz aydınlatılmamıştır. Ancak, diyabette RRF'in gevşetici etkinliğinin değişmemiş olmasının, bu faktörün retinadan salıverildiği hücrelerin diyabet oluşumuna bağlı yapısal değişiklik göstermemesi ve/veya hücresel etki mekanizmasının diyabetten etkilenmemiş olması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, retinal sirkülasyonu olumsuz yönde etkileyen bir patolojik durum olan diyabette RRF'in gevşetici etkisinin korunmuş olması, RRF'in retinal arterin tonüsünün ve retinal kan akımının regülasyonunda kompensatuvar bir rolünün olabileceğini düşündürmektedir. Sonuçlarımızın RRF'in sentezi, salgılanması, tanımlanması ve etki mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik olarak yapılacak gelecek çalışmalara yön vereceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aiello, L. M., (2003). Perspectives on diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*, **136**, 122-35.
- Ajay, M., Achike, F. I., Mustafa, A. M., Mustafa, M. R., (2006). Effect of quercetin on altered vascular reactivity in aortas isolated from streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract*, **73**, 1-7.
- Ajay, M., Mustafa, M. R., (2006). Effects of ascorbic acid on impaired vascular reactivity in aortas isolated from age-matched hypertensive and diabetic rats. *Vascul Pharmacol*, **45**, 127-33.
- Akgun-Dar, K., Bolkent, S., Yanardag, R., Tunali, S., (2007). Vanadyl sulfate protects against streptozotocin-induced morphological and biochemical changes in rat aorta. *Cell Biochem Funct*, **25**, 603-9.
- Bardell, A. L., MacLeod, K. M., (2001). Evidence for inducible nitric-oxide synthase expression and activity in vascular smooth muscle of streptozotocin-diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther*, **296**, 252-9.
- Baynes, J. W., Thorpe, S. R., (1999). Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, **48**, 1-9.
- Benedito, S., Prieto, D., Nielsen, P. J., Nyborg, N. C., (1991a). Role of the endothelium in acetylcholine-induced relaxation and spontaneous tone of bovine isolated retinal small arteries. *Exp Eye Res*, **52**, 575-9.
- Benedito, S., Prieto, D., Nielsen, P. J., Nyborg, N. C., (1991b). Histamine induces endothelium-dependent relaxation of bovine retinal arteries. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **32**, 32-8.
- Benkusky, N. A., Lewis, S. J., Kooy, N. W., (1999). Peroxynitrite-mediated attenuation of alpha- and beta-adrenoceptor agonist-induced vascular responses in vivo. *Eur J Pharmacol*, **364**, 151-8.
- Bill, A., Sperber, G. O., (1990). Aspects of oxygen and glucose consumption in the retina: effects of high intraocular pressure and light. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, **228**, 124-7.
- Boussery, K., Delaey, C., Van de Voorde, J., (2002). Rat retinal tissue releases a vasorelaxing factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **43**, 3279-86.
- Boussery, K., Delaey, C., Van de Voorde, J., (2004). Influence of adrenomedullin on tone of isolated bovine retinal arteries. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **45**, 552-9.
- Boussery, K., Delaey, C., Van de Voorde, J., (2005). The vasorelaxing effect of CGRP and natriuretic peptides in isolated bovine retinal arteries. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **46**, 1420-7.
- Boussery, K., Franki, A. S., Delaey, C., Van de Voorde, J., (2002). A vasorelaxing factor is released from mouse retinal tissue. *Ophthalmic Res*, **34**, 172-7.
- Brown, S. M., Jampol, L. M., (1996). New concepts of regulation of retinal vessel tone. *Arch Ophthalmol*, **114**, 199-204.
- Brownlee, M., (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, **414**, 813-20.

Bucci, M., Roviezzo, F., Brancaleone, V., Lin, M. I., Di Lorenzo, A., Cicala, C., Pinto, A., Sessa, W. C., Farneti, S., Fiorucci, S., Cirino, G., (2004). Diabetic mouse angiopathy is linked to progressive sympathetic receptor deletion coupled to an enhanced caveolin-1 expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **24**, 721-6.

Budzyn, K., Marley, P. D., Sobey, C. G., (2006). Targeting Rho and Rho-kinase in the treatment of cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci*, **27**, 97-104.

Buyukafsar, K., Un, I., (2003). Effects of the Rho-kinase inhibitors, Y-27632 and fasudil, on the corpus cavernosum from diabetic mice. *Eur J Pharmacol*, **472**, 235-8.

Caldwell, R. B., Bartoli, M., Behzadian, M. A., El-Remessy, A. E., Al-Shabrawey, M., Platt, D. H., Liou, G. I., Caldwell, R. W., (2005). Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: role of oxidative stress. *Curr Drug Targets*, **6**, 511-24.

Cignarella, A., Minici, C., Bolego, C., Pinna, C., Sanvito, P., Gaion, R. M., Puglisi, L., (2006). Potential pro-inflammatory action of resveratrol in vascular smooth muscle cells from normal and diabetic rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, **16**, 322-9.

Clark, S. A., Borland, K. M., Sherman, S. D., Rusack, T. C., Chick, W. L., (1994). Staining and in vitro toxicity of dithizone with canine, porcine, and bovine islets. *Cell Transplant*, **3**, 299-306.

Clementi, G., Floriddia, M. L., Prato, A., Marino, A., Drago, F., (2000). Adrenomedullin and ocular inflammation in the rabbit. *Eur J Pharmacol*, **400**, 321-6.

Clermont, B., Bursell, S.E., (2007). Retinal blood flow in diabetes. *Microcirculation*, **14**: 49-61.

Cukiernik, M., Hileeto, D., Evans, T., Mukherjee, S., Downey, D., Chakrabarti, S., (2004). Vascular endothelial growth factor in diabetes induced early retinal abnormalities. *Diabetes Res Clin Pract*, **65**, 197-208.

Daneman, D. (2006). Type 1 diabetes. *Lancet*, **367** (9513):847-58.

Dallinger, S., Dorner, G. T., Wenzel, R., Graselli, U., Findl, O., Eichler, H. G., Wolzt, M., Schmetterer, L., (2000). Endothelin-1 contributes to hyperoxia-induced vasoconstriction in the human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **41**, 864-9.

Davi, G., Chiarelli, F., Santilli, F., Pomilio, M., Vigneri, S., Falco, A., Basili, S., Ciabattoni, G., Patrono, C., (2003). Enhanced lipid peroxidation and platelet activation in the early phase of type 1 diabetes mellitus: role of interleukin-6 and disease duration. *Circulation*, **107**, 3199-203.

Davi, G., Ciabattoni, G., Consoli, A., Mezzetti, A., Falco, A., Santarone, S., Pennese, E., Vitacolonna, E., Bucciarelli, T., Costantini, F., Capani, F., Patrono, C., (1999). In vivo formation of 8-iso-prostaglandin f₂α and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation*, **99**, 224-9.

De Vriese, A. S., Verbeuren, T. J., Van de Voorde, J., Lameire, N., Vanhoutte, P. M., (2000). Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol*, **130**, 963-74.

Delaey, C., Boussery, K., Van de Voorde, J., (2000). A retinal-derived relaxing factor mediates the hypoxic vasodilation of retinal arteries. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **41**, 3555-60.

- Delaey, C., Van de Voorde, J., (1998). Retinal arterial tone is controlled by a retinal-derived relaxing factor. *Circ Res*, **83**, 714-20.
- Delaey, C., Van De Voorde, J., (2000). Regulatory mechanisms in the retinal and choroidal circulation. *Ophthalmic Res*, **32**, 249-56.
- Delaey, C., Van de Voorde, J., (1998). The effect of NO donors on bovine retinal small arteries and posterior ciliary arteries. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **39**, 1642-6.
- Didion, S. P., Lynch, C. M., Baumbach, G. L., Faraci, F. M., (2005). Impaired endothelium-dependent responses and enhanced influence of Rho-kinase in cerebral arterioles in type II diabetes. *Stroke*, **36**, 342-7.
- Dincer, U. D., Bidasee, K. R., Guner, S., Tay, A., Ozcelikay, A. T., Altan, V. M., (2001). The effect of diabetes on expression of beta1-, beta2-, and beta3-adrenoreceptors in rat hearts. *Diabetes*, **50**, 455-61.
- Dodson, P. M., (2007). Diabetic retinopathy: treatment and prevention. *Diab Vasc Dis Res*, **4 Suppl 3**, S9-S11.
- Dorner, G. T., Garhofer, G., Kiss, B., Polska, E., Polak, K., Riva, C. E., Schmetterer, L., (2003). Nitric oxide regulates retinal vascular tone in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **285**, H631-6.
- Du, X., Matsumura, T., Edelstein, D., Rossetti, L., Zsengeller, Z., Szabo, C., Brownlee, M., (2003). Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J Clin Invest*, **112**, 1049-57.
- Du, X. L., Edelstein, D., Dimmeler, S., Ju, Q., Sui, C., Brownlee, M., (2001). Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest*, **108**, 1341-8.
- Du, Y., Sarthy, V. P., Kern, T. S., (2004). Interaction between NO and COX pathways in retinal cells exposed to elevated glucose and retina of diabetic rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **287**, R735-41.
- Economides, P. A., Khaodhiar, L., Caselli, A., Caballero, A. E., Keenan, H., Bursell, S. E., King, G. L., Johnstone, M. T., Horton, E. S., Veves, A., (2005). The effect of vitamin E on endothelial function of micro- and macrocirculation and left ventricular function in type 1 and type 2 diabetic patients. *Diabetes*, **54**, 204-11.
- Elmi, S., Sallam, N. A., Rahman, M. M., Teng, X., Hunter, A. L., Moien-Afshari, F., Khazaei, M., Granville, D. J., Laher, I., (2008). Sulfaphenazole treatment restores endothelium-dependent vasodilation in diabetic mice. *Vascul Pharmacol*, **48**, 1-8.
- Engerman, R. L., Kern, T. S., (1995). Retinopathy in animal models of diabetes. *Diabetes Metab Rev*, **11**, 109-20.
- Federiuk, I. F., Casey, H. M., Quinn, M. J., Wood, M. D., Ward, W. K., (2004). Induction of type-1 diabetes mellitus in laboratory rats by use of alloxan: route of administration, pitfalls, and insulin treatment. *Comp Med*, **54**, 252-7.
- Ferrari-Dileo, G., Davis, E. B., Anderson, D. R., (1991). Angiotensin II binding receptors in retinal and optic nerve head blood vessels. An autoradiographic approach. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **32**, 21-6.
- Frank, R. N., (2004). Diabetic retinopathy. *N Engl J Med*, **350**, 48-58.
- Friedman, E., (1970). Choroidal blood flow. Pressure-flow relationships. *Arch Ophthalmol*, **83**, 95-9.

Frode, T. S., Medeiros, Y. S., (2008). Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *J Ethnopharmacol*, **115**, 173-83.

Gadea, A., Lopez, E., Hernandez-Cruz, A., Lopez-Colome, A. M., (2002). Role of Ca²⁺ and calmodulin-dependent enzymes in the regulation of glycine transport in Muller glia. *J Neurochem*, **80**, 634-45.

Gardiner, T. A., Archer, D. B., Curtis, T. M., Stitt, A. W., (2007). Arteriolar involvement in the microvascular lesions of diabetic retinopathy: implications for pathogenesis. *Microcirculation*, **14**, 25-38.

Gardner D.G., Shoback D., (2007) *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology*, 8th edition, International Edition.

Gazis, A., White, D. J., Page, S. R., Cockcroft, J. R., (1999). Effect of oral vitamin E (alpha-tocopherol) supplementation on vascular endothelial function in Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med*, **16**, 304-11.

Ghasemi, M., Sadeghipour, H., Asadi, S., Dehpour, A. R., (2007). Time-dependent alteration in cromakalim-induced relaxation of corpus cavernosum from streptozocin-induced diabetic rats. *Life Sci*, **81**, 960-9.

Goto, R., Doi, M., Ma, N., Semba, R., Uji, Y., (2005). Contribution of nitric oxide-producing cells in normal and diabetic rat retina. *Jpn J Ophthalmol*, **49**, 363-70.

Guyton, A., Coleman, T., (1967) *Long-term Regulation Of The Circulation*. (Ed.) Physical Basis of The Circulatory Transport: Regulation And Exchange, Saunders.

Guyton A.C., Hall J.E., (1996) *Medical Physiology* 9th edition, Philadelphia, PA., W.B. Saunders Company.

Guzik, T. J., Mussa, S., Gastaldi, D., Sadowski, J., Ratnatunga, C., Pillai, R., Channon, K. M., (2002). Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, **105**, 1656-62.

Haefliger, I. O., Flammer, J., Beny, J. L., Luscher, T. F., (2001). Endothelium-dependent vasoactive modulation in the ophthalmic circulation. *Prog Retin Eye Res*, **20**, 209-25.

Hata, Y., Miura, M., Nakao, S., Kawahara, S., Kita, T., Ishibashi, T., (2008). Antiangiogenic properties of fasudil, a potent Rho-Kinase inhibitor. *Jpn J Ophthalmol*, **52**, 16-23.

Hickam, J. B., Frayser, R., Ross, J. C., (1963). A study of retinal venous blood oxygen saturation in human subjects by photographic means. *Circulation*, **27**, 375-85.

Hink, U., Li, H., Mollnau, H., Oelze, M., Matheis, E., Hartmann, M., Skatchkov, M., Thaiss, F., Stahl, R. A., Warnholtz, A., Meinertz, T., Griendling, K., Harrison, D. G., Forstermann, U., Munzel, T., (2001). Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res*, **88**, E14-22.

Hirabara, Y., Araki, M., Fukuda, M., Katafuchi, S., Honda, K., Saito, R., Takano, Y., (2007). A high-sodium diet in streptozotocin-induced diabetic rats impairs endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated vasodilation. *J Pharmacol Sci*, **104**, 402-5.

Huvers, F. C., De Leeuw, P. W., Houben, A. J., De Haan, C. H., Hamulyak, K., Schouten, H., Wolffenbuttel, B. H., Schaper, N. C., (1999). Endothelium-dependent

vasodilatation, plasma markers of endothelial function, and adrenergic vasoconstrictor responses in type 1 diabetes under near-normoglycemic conditions. *Diabetes*, **48**, 1300-7.

Ibrahim, M. A., Kanzaki, T., Yamagata, S., Satoh, N., Ueda, S., (2005). Effect of diabetes on aortic nitric oxide synthesis in spontaneously hypertensive rats; does captopril modulate this effect? *Life Sci*, **77**, 1003-14.

Ichikawa, M., Okada, Y., Asai, Y., Hara, H., Ishii, K., Araie, M., (2004). Effects of topically instilled bunazosin, an alpha1-adrenoceptor antagonist, on constrictions induced by phenylephrine and ET-1 in rabbit retinal arteries. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **45**, 4041-8.

Ishikawa, T., Kohno, F., Kawase, R., Yamamoto, Y., Nakayama, K., (2004). Contribution of nitric oxide produced by inducible nitric oxide synthase to vascular responses of mesenteric arterioles in streptozotocin-diabetic rats. *Br J Pharmacol*, **141**, 269-76.

Jin, N., Siddiqui, R. A., English, D., Rhoades, R. A., (1996). Communication between tyrosine kinase pathway and myosin light chain kinase pathway in smooth muscle. *Am J Physiol*, **271**, H1348-55.

Jin, S. M., Noh, C. I., Yang, S. W., Bae, E. J., Shin, C. H., Chung, H. R., Kim, Y. Y., Yun, Y. S., (2008). Endothelial dysfunction and microvascular complications in type 1 diabetes mellitus. *J Korean Med Sci*, **23**, 77-82.

Joussen, A. M., Poulaki, V., Mitsiades, N., Kirchhof, B., Koizumi, K., Dohmen, S., Adamis, A. P., (2002a). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs prevent early diabetic retinopathy via TNF-alpha suppression. *Faseb J*, **16**, 438-40.

Joussen, A. M., Poulaki, V., Qin, W., Kirchhof, B., Mitsiades, N., Wiegand, S. J., Rudge, J., Yancopoulos, G. D., Adamis, A. P., (2002b). Retinal vascular endothelial growth factor induces intercellular adhesion molecule-1 and endothelial nitric oxide synthase expression and initiates early diabetic retinal leukocyte adhesion in vivo. *Am J Pathol*, **160**, 501-9.

Kaji, Y., Usui, T., Ishida, S., Yamashiro, K., Moore, T. C., Moore, J., Yamamoto, Y., Yamamoto, H., Adamis, A. P., (2007). Inhibition of diabetic leukostasis and blood-retinal barrier breakdown with a soluble form of a receptor for advanced glycation end products. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **48**, 858-65.

Kaneko, Y., Saito, M., Mori, A., Sakamoto, K., Kametaka, S., Nakahara, T., Ishii, K., (2007). Vasodilation of retinal arteriole mediated by corticotropin-releasing factor receptor is impaired in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol Pharm Bull*, **30**, 985-9.

Kayaalp O, (2005) *Tıbbi Farmakoloji*, 11. baskı, Ankara, Türkiye, Hacettepe Taş Kitapçılık Ltd. Şti.

Kern, T. S., (2007). Contributions of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res*, **2007**, 95103.

Kitayama, J., Faraci, F. M., Gunneth, C. A., Heistad, D. D., (2006). Impairment of dilator responses of cerebral arterioles during diabetes mellitus: role of inducible NO synthase. *Stroke*, **37**, 2129-33.

Kobayashi, T., Matsumoto, T., Ooishi, K., Kamata, K., (2004). Differential expression of alpha2D-adrenoceptor and eNOS in aortas from early and later stages of diabetes in Goto-Kakizaki rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **287**, H135-43.

Kossenjans, W., Eis, A., Sahay, R., Brockman, D., Myatt, L., (2000). Role of peroxynitrite in altered fetal-placental vascular reactivity in diabetes or preeclampsia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **278**, H1311-9.

Lang G.K. (2001) Türkçe çeviri, *Göz Hastalıkları El Kitabı*. Atlas. Ankara: Palme Yayıncılık.

Lei, Y. C., Hwang, J. S., Chan, C. C., Lee, C. T., Cheng, T. J., (2005). Enhanced oxidative stress and endothelial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats exposed to fine particles. *Environ Res*, **99**, 335-43.

Li, J. M., Shah, A. M., (2004). Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **287**, R1014-30.

Ma, L., Zhu, B., Chen, X., Liu, J., Guan, Y., Ren, J., (2008). Abnormalities of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ mobilization in aortic smooth muscle cells from streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **35**, 568-73.

Madamanchi, N. R., Vendrov, A., Runge, M. S., (2005). Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**, 29-38.

Maenhaut, N., Boussery, K., Delaey, C., Van de Voorde, J., (2007). Control of retinal arterial tone by a paracrine retinal relaxing factor. *Microcirculation*, **14**, 39-48.

Makino, A., Ohuchi, K., Kamata, K., (2000). Mechanisms underlying the attenuation of endothelium-dependent vasodilatation in the mesenteric arterial bed of the streptozotocin-induced diabetic rat. *Br J Pharmacol*, **130**, 549-56.

Matsuoka, T., Wada, J., Hashimoto, I., Zhang, Y., Eguchi, J., Ogawa, N., Shikata, K., Kanwar, Y. S., Makino, H., (2005). Gene delivery of Tim44 reduces mitochondrial superoxide production and ameliorates neointimal proliferation of injured carotid artery in diabetic rats. *Diabetes*, **54**, 2882-90.

Matteucci, E., Giampietro, O., (2008). Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research. *J Ethnopharmacol*, **115**, 163-72.

Meyer, P., Flammer, J., Luscher, T. F., (1995). Local action of the renin angiotensin system in the porcine ophthalmic circulation: effects of ACE-inhibitors and angiotensin receptor antagonists. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **36**, 555-62.

Miao, L., Calvert, J. W., Tang, J., Zhang, J. H., (2002). Upregulation of small GTPase RhoA in the basilar artery from diabetic (mellitus) rats. *Life Sci*, **71**, 1175-85.

Milstien, S., Katusic, Z., (1999). Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun*, **263**, 681-4.

Minkowski, O., (1989). Historical development of the theory of pancreatic diabetes by Oscar Minkowski, 1929: introduction and translation by Rachmiel Levine. *Diabetes*, **38**, 1-6.

Miranda, F. J., Alabadi, J. A., Llorens, S., Ruiz de Apodaca, R. F., Centeno, J. M., Alborch, E., (2000). Influence of experimental diabetes on regulatory mechanisms of vascular response of rabbit carotid artery to acetylcholine. *Life Sci*, **66**, 2071-80.

Miranda, M., Muriach, M., Roma, J., Bosch-Morell, F., Genoves, J. M., Barcia, J., Araiz, J., Diaz-Llospis, M., Romero, F. J., (2006). [Oxidative stress in a model of experimental diabetic retinopathy: the utility of peroxynitrite scavengers]. *Arch Soc Esp Ophthalmol*, **81**, 27-32.

Mizutani, M., Kern, T. S., Lorenzi, M., (1996). Accelerated death of retinal microvascular cells in human and experimental diabetic retinopathy. *J Clin Invest*, **97**, 2883-90.

Moore, T. C., Moore, J. E., Kaji, Y., Frizzell, N., Usui, T., Poulaki, V., Campbell, I. L., Stitt, A. W., Gardiner, T. A., Archer, D. B., Adamis, A. P., (2003). The role of advanced glycation end products in retinal microvascular leukostasis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **44**, 4457-64.

Mulvany, M. J., Halpern, W., (1977). Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res*, **41**, 19-26.

Nagareddy, P. R., Xia, Z., McNeill, J. H., MacLeod, K. M., (2005). Increased expression of iNOS is associated with endothelial dysfunction and impaired pressor responsiveness in streptozotocin-induced diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **289**, H2144-52.

Neufeld, A. H., Hernandez, M. R., Gonzalez, M., Geller, A., (1997). Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the human optic nerve head. *Exp Eye Res*, **65**, 739-45.

Nielsen, P. J., Nyborg, N. C., (1990). Contractile and relaxing effects of arachidonic acid derivatives on isolated bovine retinal resistance arteries. *Exp Eye Res*, **50**, 305-11.

Nitenberg, A., (2007). Macrovascular disease in type 2 diabetes: We do need animal models for in vivo studies. *Cardiovasc Res*, **73**, 450-2.

Nyborg, N. C., Nielsen, P. J., (1990). Thrombin contracts isolated bovine retinal small arteries in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **31**, 2307-13.

Nyborg, N. C., Nielsen, P. J., (1990). Angiotensin-II contracts isolated human posterior ciliary arteries. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **31**, 2471-3.

Nyborg, N. C., Nielsen, P. J., (1995). Beta-adrenergic receptors regulating vascular smooth muscle tone are only localized to the intraocular segment of the long posterior ciliary artery in bovine eye. *Surv Ophthalmol*, **39 Suppl 1**, S66-75.

Nyborg, N. C., Nielsen, P. J., Prieto, D., Bedito, S., (1990). Angiotensin II does not contract bovine retinal resistance arteries in vitro. *Exp Eye Res*, **50**, 469-74.

Pascoe, W. S., Storlien, L. H., (1990). Inducement by fat feeding of basal hyperglycemia in rats with abnormal beta-cell function. Model for study of etiology and pathogenesis of NIDDM. *Diabetes*, **39**, 226-33.

Patel, R., Shervington, A., Pariente, J. A., Martinez-Burgos, M. A., Salido, G. M., Adeghate, E., Singh, J., (2006). Mechanism of exocrine pancreatic insufficiency in streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci*, **1084**, 71-88.

Pearce, W. J., (1995). Mechanisms of hypoxic cerebral vasodilatation. *Pharmacol Ther*, **65**, 75-91.

Prieto, D., Bedito, S., Nielsen, P. J., Nyborg, N. C., (1991). Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator of bovine retinal arteries in vitro. *Exp Eye Res*, **53**, 399-405.

Putz R ve Pabst R (Ed.) (1997) *12th English ed. Sobotta Atlas of Human Anatomy*. Mönih, Almany: Williams&Wilkins.

Qin, Y., Xu, G., Wang, W., (2006). Dendritic abnormalities in retinal ganglion cells of three-month diabetic rats. *Curr Eye Res*, **31**, 967-74.

Rees, D. A., Alcolado, J. C., (2005). Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med*, **22**, 359-70.

Reynolds, E. S., (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*, **17**, 208-12.

Rizzoni, D., Porteri, E., Guelfi, D., Muiesan, M. L., Piccoli, A., Valentini, U., Cimino, A., Girelli, A., Salvetti, M., De Ciuceis, C., Tiberio, G. A., Giulini, S. M., Sleiman, I., Monteduro, C., Rosei, E. A., (2001). Endothelial dysfunction in small resistance arteries of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Hypertens*, **19**, 913-9.

Rockwood, E. J., Fantes, F., Davis, E. B., Anderson, D. R., (1987). The response of retinal vasculature to angiotensin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **28**, 676-82.

Rollin, R., Mediero, A., Roldan-Pallares, M., Fernandez-Cruz, A., Fernandez-Durango, R., (2004). Natriuretic peptide system in the human retina. *Mol Vis*, **10**, 15-22.

Sacco, M., Pellegrini, F., Roncaglioni, M. C., Avanzini, F., Tognoni, G., Nicolucci, A., (2003). Primary prevention of cardiovascular events with low-dose aspirin and vitamin E in type 2 diabetic patients: results of the Primary Prevention Project (PPP) trial. *Diabetes Care*, **26**, 3264-72.

Schalkwijk, C. G., Stehouwer, C. D., (2005). Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin Sci (Lond)*, **109**, 143-59.

Shah, D. I., Singh, M., (2006). Involvement of Rho-kinase in experimental vascular endothelial dysfunction. *Mol Cell Biochem*, **283**, 191-9.

Sindhu, R. K., Koo, J. R., Roberts, C. K., Vaziri, N. D., (2004). Dysregulation of hepatic superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in diabetes: response to insulin and antioxidant therapies. *Clin Exp Hypertens*, **26**, 43-53.

Soriano, F. G., Pacher, P., Mabley, J., Liaudet, L., Szabo, C., (2001). Rapid reversal of the diabetic endothelial dysfunction by pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase. *Circ Res*, **89**, 684-91.

Sotnikova, R., Skalska, S., Okruhlicova, L., Navarova, J., Kyselova, Z., Zurova, J., Stefek, M., Hozova, R., Nosalova, V., (2006). Changes in the function and ultrastructure of vessels in the rat model of multiple low dose streptozotocin-induced diabetes. *Gen Physiol Biophys*, **25**, 289-302.

Stitt, A. W., Bhaduri, T., McMullen, C. B., Gardiner, T. A., Archer, D. B., (2000). Advanced glycation end products induce blood-retinal barrier dysfunction in normoglycemic rats. *Mol Cell Biol Res Commun*, **3**, 380-8.

Su, E. N., Yu, D. Y., Alder, V. A., Yu, P. K., Cringle, S. J., (1995). Altered vasoactivity in the early diabetic eye: measured in the isolated perfused rat eye. *Exp Eye Res*, **61**, 699-711.

Sugiyama, K., Haque, M. S., Onda, E., Taniguchi, T., Kitazawa, Y., (1996). The effects of intravitreally injected endothelin-1 on the iris-ciliary body microvasculature in rabbits. *Curr Eye Res*, **15**, 633-7.

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

Takahashi, Y., Nakano, T., Wakabayashi, I., (2008). Increased induction of inducible nitric oxide synthase expression in aortae of type 2 diabetes rats. *J Pharmacol Sci*, **107**, 190-200.

Takır S., Uydeş-Doğan B.S., Özdemir O. (2005). Retinal Tissue produces acute and biphasic relaxations on isolated bovine retinal arteries. *J Vascular Research* Vol **42**, suppl 1, Abstract Book; p 79.

Takır S., Uydeş-Doğan B.S., Özdemir O. (2006a). Effects of L-type calcium channel blockade and removal of extracellular Ca^{++} on retina induced relaxation in bovine retinal arteries. 11th international Vascular Neuroeffector mechanisms and Cardiovascular Pharmacology and Medicine Symposia, Shangai-Suzhou, China. Abstract Book, p 16.

Takır S., Uydeş-Doğan B.S., Özdemir O. (2006b). Retina derived relaxations are not mediated by K_{ATP} and $K_{Ca^{++}}$ channels in isolated bovine retinal arteries. *Acta Pharmacologia Sinica*, July Suppl 1 p 172.

Taniguchi, T., Kawase, K., Gu, Z. B., Kimura, M., Okano, Y., Kawakami, H., Tsuji, A., Kitazawa, Y., (1999). Ocular effects of adrenomedullin. *Exp Eye Res*, **69**, 467-74.

Tawfik, H.E., El-Remessy, A.B., Matragoon, S., Ma, G., Caldwell, R.B., Caldwell, R.W., (2006). Simvastatin improves diabetes-induced coronary endothelial dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther*, **319**, 386-95.

Ting, H. H., Timimi, F. K., Boles, K. S., Creager, S. J., Ganz, P., Creager, M. A., (1996). Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*, **97**, 22-8.

Toda, N., Nakanishi-Toda, M., (2007). Nitric oxide: ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res*, **26**, 205-38.

Valentovic, M. A., Alejandro, N., Betts Carpenter, A., Brown, P. I., Ramos, K., (2006). Streptozotocin (STZ) diabetes enhances benzo(alpha)pyrene induced renal injury in Sprague Dawley rats. *Toxicol Lett*, **164**, 214-20.

Vallejo, S., Angulo, J., Peiro, C., Sanchez-Ferrer, A., Cercas, E., Llergo, J. L., Nevado, J., Sanchez-Ferrer, C. F., Rodriguez-Manas, L., (2000). Prevention of endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats by gliclazide treatment. *J Diabetes Complications*, **14**, 224-33.

Villa, L. M., Salas, E., Darley-Usmar, V. M., Radomski, M. W., Moncada, S., (1994). Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12383-7.

Wang, Y., Schmeichel, A. M., Iida, H., Schmelzer, J. D., Low, P. A., (2006). Enhanced inflammatory response via activation of NF-kappaB in acute experimental diabetic neuropathy subjected to ischemia-reperfusion injury. *J Neurol Sci*, **247**, 47-52.

Watson, M. L., (1958). Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol*, **4**, 475-8.

Yıldırım M. (2000) *İnsan Anatomisi*. İstanbul: 5. baskı Nobel Kitap Evleri Ltd Şti.

Yokota, T., Utsunomiya, K., Taniguchi, K., Gojo, A., Kurata, H., Tajima, N., (2007). Involvement of the Rho/Rho kinase signaling pathway in platelet-derived growth factor BB-induced vascular endothelial growth factor expression in diabetic rat retina. *Jpn J Ophthalmol*, **51**, 424-30.

Yu, D. Y., Su, E. N., Cringle, S. J., Schoch, C., Percicot, C. P., Lambrou, G. N., (2001). Comparison of the vasoactive effects of the docosanoid unoprostone and

selected prostanoids on isolated perfused retinal arterioles. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **42**, 1499-504.

Yu, D. Y., Su, E. N., Cringle, S. J., Yu, P. K., (2003). Isolated preparations of ocular vasculature and their applications in ophthalmic research. *Prog Retin Eye Res*, **22**, 135-69.

Yu, W. J., Juang, S. W., Chin, W. T., Chi, T. C., Chang, C. J., Cheng, J. T., (2000). Insulin restores neuronal nitric oxide synthase expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci*, **68**, 625-34.

Yulek, F., Or, M., Ozogul, C., Isik, A. C., Ari, N., Stefek, M., Bauer, V., Karasu, C., (2007). Effects of stobadine and vitamin E in diabetes-induced retinal abnormalities: involvement of oxidative stress. *Arch Med Res*, **38**, 503-11.

Zanetti, M., Barazzoni, R., Stebel, M., Roder, E., Biolo, G., Baralle, F. E., Cattin, L., Guarnieri, G., (2005). Dysregulation of the endothelial nitric oxide synthase-soluble guanylate cyclase pathway is normalized by insulin in the aorta of diabetic rat. *Atherosclerosis*, **181**, 69-73.

Zheng, L., Du, Y., Miller, C., Gubitosi-Klug, R. A., Ball, S., Berkowitz, B. A., Kern, T. S., (2007). Critical role of inducible nitric oxide synthase in degeneration of retinal capillaries in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, **50**, 1987-96.

Ziyadeh, F. N., (2004). Mediators of diabetic renal disease: the case for tgf-Beta as the major mediator. *J Am Soc Nephrol*, **15 Suppl 1**, S55-7.



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 42

03.10.2007

Sn. Doç. Dr. Sönmez Uydeş-Doğan, İ. Ü. Eczacılık Fak. Farmakoloji AB. Dalı

Karar No: 13

Başvuru Tarihi: 26.09.2007

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, Ecz. Merve Ağuş'a ait "Normal ve diyabetik sıçanlardan izole edilen retinanın retinal ve periferal damarlar üzerindeki etkisinin incelenmesi" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul İlkelerine uygun bulunmuştur.

M. Kaya

Prof. Dr. Mehmet KAYA
İ. Ü. HADYEK Başkanı

M. Uysal

Prof. Dr. Müjdat UYSAL
Üye

N. Akev

Prof. Dr. Nuriye AKEV
Üye

G. Şahin

Prof. Dr. Gülderen ŞAHİN
Üye

Prof. Dr. Cüneyt K. ORAL
Üye

A. Yılmaz

Doç. Dr. Alper YILMAZ
Üye

F. Tekeli

Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ
Üye

S. Altun

Avukat Safiye ALTUN
Üye

S. Avcı

Mak. Müh. Seyfettin AVCI
Üye

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Merve	Soyadı	AGUŞ
Doğ.Yeri	Fatih/İstanbul	Doğ.Tar.	07/04/1984
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	25624444764
Email	eczmerve7@yahoo.com	Tel	0 532 7888890

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2006
Lise	Beyoğlu Anadolu Lisesi	2002

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜD S Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	53	57	55
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Office	Çok iyi

TEBLİĞLER

Poster Sunumları:

Uluslar arası:

- Retinal Tissue Produces Comparable Relaxations On Retinal, Carotid and Mesenteric Arteries. **Agus M**, Takir S, Uydeş-Doğan BS, Özdemir O. 11th Meeting of the European Council for Cardiovascular Research 12th-14th October 2007, Nice, France. Hypertension Vol **50**, No 4 October 2007;p812.
- Retina Derived Relaxation Is Preserved In Carotid and Mesenteric Arteries of Diabetic Rats. **Agus M**, Takir S, Uydeş-Doğan BS, Karaca C, Altuğ T, Özdemir O. European Pharmacological Societies Congress 13 – 17 July 2008, Manchester, England. Fundamental&Clinical Pharmacology Vol **22** supp.2;p81.

Ulusal:

- Sıçan Retinasının Retinal ve Periferel Damarlar Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi. **Agus M**, Takir S, Uydes-Dogan BS, Ozdemir O. Türk Farmakoloji Derneği 19. Ulusal Farmakoloji Kongresi 24-27 Ekim 2007, Trabzon, Türkiye. Özet Kitabı; p371.

SERTİFİKALAR

- Deney hayvanı kullanımı ve etik yaklaşım İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Birimi, Kasım 2006.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):