

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİABETİK VE NON-DİABETİK FARELERİN MİDESİNİN FUNDUS
BÖLGESİNDE HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ (HGF)'NÜN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL LOKALİZASYONU

Serap İLHAN
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Turgay DEPREM

2015-KARS

TC
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Biyolog Serap İLHAN tarafından hazırlanmış olan '*Diabetik ve Non-Diabetik Farelerin Midelerinin Fundus Bölgesinde Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF)'nün İmmunohistokimyasal Lokalizasyonu*' adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonucunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmenliği uyarınca değerlendirilerek oy ..*karar!*... ile ..*karar!*... edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 11/06/2015

Adı Soyadı:

Başkan: Prof. Dr. Hatice ERDOST

Üye: Prof. Dr. Şahin ASLAN

Üye: Yrd. Doç. Dr. Turgay DEPREM

İmza:


Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun gün ve Sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ali Rıza AKSOY

Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No:
Simgeler ve Kısaltmalar	III
Tablolar Dizini	V
Şekiller Dizini	VI
Önsöz	VII
Özet	VIII
Summary	IX
1. GİRİŞ	1
1.1. Diabetes Mellitus	1
1.1.2. Diabetes Mellitus'un Tipleri	2
1.2. Büyüme Faktörleri	3
1.2.1. Hepatosit Büyüme Faktörü	4
1.3. Sindirim Sistemi	8
1.3.1. Mide Histolojisi	8
1.4. Streptozotosin	11
1.5. Diabetes Mellitus ve HGF	11
2. MATERYAL VE METOT	15
2.1. Materyal	15
2.1.1. Deney Hayvanı Materyali	15
2.2. Metot	16
2.2.1. Streptozotosin ile Diabet Oluşturulması	16
2.2.2. Canlı Ağırlık Ölçümü	16
2.2.3. Kan-Glikoz Değerlerinin Ölçümü	16
2.2.4. Dokuların Alınması	16
2.2.5. Histolojik İnceleme	17
2.2.6. İmmunohistokimyasal İnceleme	17

3. BULGULAR	19
3.1. Canlı Ağırlık Bulguları	19
3.2. Kan-Glikoz Değerleri	20
3.3. Histolojik Bulgular	21
3.4. İmmunohistokimyasal Bulgular	25
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	32
5. KAYNAKLAR	37
6. ÖZGEÇMİŞ	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat Derece
DAB	: Diaminobenzidin
dk	: Dakika
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
GSH	: Glutatyon
H&E	: Hematoksilen&Eozin
HGF	: Hepatosit Büyüme Faktörü
HGFA	: Hepatosit Büyüme Faktörü Aktivatörü
IP	: İntraperitonal
IV	: İntravenöz
Kd	: Kilo dalton
kg	: Kilogram
M	: Molarite
MAPK	: Mitojenler ile Aktive edilen Protein Kinaz
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
m-RNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
NAD ⁺	: Yükseltgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotid
PBS	: Fosfat Buffer Salin
SF	: Saçılım (Dağılım) Faktörü

SOD	: Süperoksit Dismutaz
STZ	: Streptozotosin
TGF- β	: Transforme Edici Büyüme Faktörü- β
t-RNA	: Taşıyıcı Ribonükleik Asit
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No:
1. Bazı Büyüme faktörleri, kaynakları ve görevleri	4
2. Gruplara göre deneysel uygulamalar	15
3. Kontrol grubu canlı ağırlıklarının kendi içinde günlere göre karşılaştırılması	19
4. Sham grubu canlı ağırlıklarının kendi içinde günlere göre karşılaştırılması	19
5. Deneme grubu içinde günlere göre canlı ağırlık bulgularının karşılaştırılması	20
6. Kan-glikoz düzeyinin günler arası karşılaştırılması	20
7. HGF immunoreaktivitesi derecelendirme sonuçları	31

ŞEKİL VE RESİMLER DİZİNİ**Sayfa No:****ŞEKİL DİZİNİ**

1. HGF ve reseptörü c-met'in sinyal iletim yolu 6

RESİM DİZİNİ

1. 30. gün Kontrol grubunda fundusun histolojik görünümü 21
2. 30. Gün sham grubunda fundusun histolojik görünümü 22
3. 30. Gün deneme grubunda fundusun histolojik görünümü 22
4. 30. Gün Deneme grubunda fundusun histolojik görünümü 23
5. Kontrol grubu histolojik yapısı genel görünümü 24
6. Deneme grubu fundus bölgesinde genel görünümü 24
7. Kontrol grubunda HGF immunoreaktivitesi 25
8. Sham grubunda HGF immunoreaktivitesi 26
9. Deneme grubunda fundus bölgesi HGF immunoreaktivitesi 26
10. Fundusun lamina propriyasında yoğun HGF immunoreaktivitesi 27
11. Kontrol grubunda pariyetal ve prensipal hücrelerde HGF immunoreaktivitesi 28
12. Deneme grubunun fundus bölgesi bezlerindeki HGF immunoreaktivitesi 29
13. Kan damarı endotelinde HGF immunoreaktivitesi 30
14. Kriptler arası bölgedeki HGF immunoreaktivitesi 30
15. Negatif kontrol 31

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, Diabetik ve non-diabetik farelerin midesinin fundus bölgesinde Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF)'nün immünohistokimyasal lokalizasyonu incelenmiştir.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle her zaman yanımda olan değerli danışmanım Yrd. Doç. Dr. Turgay DEPREM'e, araştırmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Şahin ASLAN'a, eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Ebru KARADAĞ SARI ve Yrd. Doç. Dr. Serap KORAL TAŞÇI'ya ve ayrıca emeği geçen herkese teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan kıymetli aileme de şükranlarımı sunarım.

ÖZET

Çalışmamız, diabetik ve non-diabetik farelerin midelerinin fundus bölgesinde meydana gelen yapısal değişiklikleri histolojik olarak incelemek ve hepatosit büyüme faktörü (HGF)'nin midedeki immunohistokimyasal dağılımını belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Çalışmada, 45 swiss albino fare, (n=15) kontrol, (n=15) sham ve (n=15) deneme olarak üç gruba ayrıldı. Diabet oluşturmak için 100 mg/kg dozunda Streptozotosin (STZ) intraperitoneal (IP) yolla uygulandı. 200 mg/dl'nin üzerinde kan glikoz düzeyi olan fareler diabetli olarak kabul edildi. Deneklerin mide dokuları 3, 15 ve 30. günlerde alındı. Midenin fundus bölgesinin histolojik yapısını incelemek için alınan kesitlere H&E ve Crossman'ın üçlü boyaması yapıldı. HGF'nin immunoreaktivitesini belirlemek amacıyla Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleks (ABC) metodu uygulandı.

Çalışmada diabetik grupta diğer gruplara göre canlı ağırlıkta azalma olduğu belirlendi. Diabetik, kontrol ve sham gruplarında HGF'nin benzer alanlarda immunolokalizasyon gösterdiği gözlemlendi. HGF immunoreaktivitesinin kriptlerin bulunduğu propria katmanında ve özellikle de kriptleri çevreleyen taban bölgedeki bağ dokuda yoğun olduğu gözlemlendi. Ayrıca bu alandaki kan damarı endotelinde de immunoreaktivite tespit edildi. Bunlara ilaveten kriptleri oluşturan hücreler arasında yer yer HGF pozitif hücreler tespit edildi. Fundusta pariyetal ve prensipal hücrelerde sitoplazmik ve nükleer tarzda HGF immunoreaktivitesi gözlemlendi. HGF immunoreaktivitesinin diabetik grupta kontrol ve sham gruplarına göre daha zayıf bir reaksiyon verdiği tespit edildi.

HGF, diabet ve midenin fundus bölgesinin ilişkisini açıklayan immunohistokimyasal bir araştırmaya rastlanılmadığı için yaptığımız çalışmanın bu ilişkiyi açıklamasına yardımcı olacağını ve bu alanda yapılacak yeni çalışmalara yol göstereceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Diabet, HGF, Fundus, İmmunohistokimya

SUMMARY

Our study has been conducted in order to histologically analyze the morphologic changes that occur in the fundus area of the stomachs of diabetic and non-diabetic mice, and designate the immunohistochemical distribution of the hepatocyte growth factor (HGF) in the stomach.

Forty-five Swiss albino mice have been divided into three groups as (n=15) control, (n=15) sham and (n=15) experimental for the study. Streptozotocin at the dose of 100mg/kg has been administered intraaperitoneally (IP) to the end of inducing diabetes. Mice with blood-glucose levels higher than 200mg/dl have been deemed diabetic. Stomach tissues of the specimens have been collected at the 5th, 15th and 30th days. Crossman's triple stain and H&E stain has been performed to the sections in order to examine the histological structure of the fundus area of stomach. The Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) method has been performed in order to determine the immunoreactivity of HGF.

In the study, it has been found that compared to other groups, live weight had been decreased in the diabetic group. HGF has been observed to demonstrate immunolocalization on similar areas in the diabetic, control and sham groups. HGF immunoreactivity has been found to be intensive in the propria layer where crypts are found and particularly in the connective tissue in the base area surrounding the crypts. Also, immunoreactivity has been observed in the endothelium of the blood vessel in this area. Additionally, HGF positive cells have sporadically been found among the cells forming the crypts. Cytoplasmic and nuclear HGF immunoreactivity has been found in the fundus and in parietal and principal cells. HGF immunoreactivity has been found to react in a milder way in the diabetic group compared to other groups.

We think that the study we have conducted will usher in future studies in this field and help explain the relationship between diabetes and the fundus area of the stomach since no immunohistochemical study explaining this relationship have been found in the literature.

Keywords: Diabetes, HGF, Fundus, Immunohistochemistry

1. GİRİŞ

1.1. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM), Amerikan Diabet Birliği (2004) tarafından insülin hormonunun sekresyonundaki veya etkisindeki azalmaya bağlı olarak ortaya çıkan karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozuklukla karakterize bir grup metabolizma hastalığı olarak tanımlanmıştır.

Tarihçesi çok eskilere dayanan Diabetes Mellitus, Milattan 1500 yıl önce Mısır Papiruslarında fazla idrarın yapıldığı ve şekerin kaybedildiği bir hastalık olarak tanımlanmıştır. 1860 yılında pankreas adacıklarının Langerhans tarafından tanımlanması, 1875 yılında diabetin nöro-hormonal mekanizmasını Claud Bernard'ın tanımlaması ve 1889 yılında V.Mering ve Minkowski tarafından pankreotektomi yöntemiyle oluşan diabeti ortaya çıkarmaları sonucu şeker hastalığının merkez organı olarak pankreasın tanımlamasıyla birlikte Best ve Banting'in 1922'de pankreas ekstresi, insülin ve hastalığının tedavisine yeni boyutlar getirilmiştir (Bağrıaçık 1997).

Vücutta düzenlenen kan şekeri birçok hormon ve kimyasal maddenin değişik etkileşimi ile sağlanır. İnsülin hormonu şeker metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayan hormonlardan en önemlisidir. Diabet, salgılanan insülin yetersizliği yada bu hormonun etkisindeki bozukluk sonucu ortaya çıkan kan şekeri yükselmesinin yol açtığı bir hastalıktır. (<http://tr.wikipedia.org/wiki/Diyabet> Erişim tarihi: 11 Temmuz 2014).

Metabolizma bozukluğunun şiddetine bağlı olarak asemptomatik veya polidipsi, poliüri, polifaji, kilo kaybı ve güçsüzlük gibi klinik semptomlarla karakterize olan Diabetes Mellitus birçok organ ve sistemi etkilemektedir (Kuzuya ve ark. 2002, Aktürk ve ark. 2002, Catchpole ve ark. 2005).

Diabet oluşumunda, hipergliseminin ve ortaya çıkan bozukluklar sonucunda karbonhidrat metabolizmasının büyük rolü olduğunu gösterir. Diabetes Mellitus (DM)'ta, protein ve kan yağlarının katabolik gelişimi ve bunun sonucunda yağların yıkınımından elde edilen, metabolize edilemeyen keton cisimleri ile ketoasidoz oluşumu, yağ ve protein metabolizmasının da etkilendiğini gösterir. Sonuç olarak diabet birçok sistemi ilgilendiren metabolik bir hastalık olarak tanımlanabilir (Yenigun 2001).

1.1.2.Diabetes Mellitusun Tipleri

1985'te Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından Diabetes Mellitus'un geniş bir sınıflaması yapılmıştır. WHO tarafından yapılan sınıflama kliniksel olup, diabeti terminolojik olarak insüline bağımlı ve insüline bağımlı olmayan şeklinde ayırmıştır.

1.1.2.1.Tip I Diabetes Mellitus (İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus)

İnsüline bağımlı olan diabetes mellitus, yaş grubu olarak çocuklarda sık görülen, t-hücrelerinin ile insülin üretiminde görev alan pankreasın β hücrelerinin süregelen otoimmün veya otoimmün olmayan nedenlerle bozulması sonucu gelişen insülojeni ve hiperglisemi ile karakterize kronik metabolik bir hastalıktır (Alemzadeh ve ark. 2004, Fiallo-Scharer ve ark. 2004).

1.1.2.2. Tip II Diabetes Mellitus (İnsüline Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus)

Tip II diabet genel olarak fiziksel inaktiviteye ve obezite bağı olarak görülmektedir. Bu tip diabetin temelinde, insülin direnci ve zamanla azalan insülin sekresyonun genetik olarak yatkın kişilerde yaşam tarzı ile tetiklenmesi söz konusudur (International Diabetes Federation 2003). Tip II diabette insülin salınımında hem noksanlık hemde artış olabilmektedir (Rand ve ark. 2004)

1.2. Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri, ağırlıkları 4.000-60.000 dalton arasındadır ve hücrel aktiviteyi az miktarları bile etkileyebilen proteinlerdir (Steenfos 1994). Büyüme faktörü terimi ilk olarak T lenfositler ve makrofajlarca üretilmiş olan bir madde için kullanılmıştır. Bu faktörler, hücrel fonksiyonlarını parakrin, endokrin, intrakrin veya otokrin mekanizmalarla sağlar (Rice ve ark. 1998). Parakrin mekanizmalarla etki eden faktörler salgılandıkları bölgede etkilidirler. Endokrin yolla etkileyen faktörler hedef hücreye kan yoluyla gider ve uzaktaki hücreleri de etkiler. Otokrin faktörler, tarafından salgılandıkları hücrenin fonksiyonlarını etkiler (Steenfos 1994). İntrakrin mekanizmalar ile birkaç transforme fibroblastlar ise hiç salgılanmamış faktörlere hücrenin kendi içinde yanıt verirler (Brown ve ark. 1991). Büyüme faktörlerinin herhangi bir hücreyi etkileyebilmesi, etkilediği hücrede o faktöre özgü reseptöre sahip olup olmamasına bağlıdır. Hücrelerin farklı sayıda ve farklı büyüme faktörleri için reseptörü bulunur. Büyüme faktörlerinin reseptöre bağlanan miktarı ve o bölgedeki konsantrasyonu, elde edilecek sonucu belirler (Steenfos 1994).

Büyüme faktörü ligandları, spesifik hedef hücre reseptörlerine bağlanır; reseptörün bağlanması, gen transkripsiyonunu başlatmak ve hücre siklusuna girmeyi desteklemek için hücre içi sinyalleri iletir. Reseptör-ligand etkileşimi tipik olarak daha sonra plazma membranının sitoplazmik kenarındaki sinyal iletecek olan reseptörün dimerizasyonunu ve trimerizasyonunu uyarır. Sinyallerin nükleusa aktarılması bir seri ardışık protein kinaz zinciri oluşturarak DNA transkripsiyonunu başlatan nükleer düzenleyici faktörlerin indüksiyonunu ve aktivasyonunu sağlar ve böylece hücreler hücre siklusuna girer. Çoğu büyüme faktörü reseptörünün ligand bağlanmasını takiben aktive olan tirozin kinaz aktivitesi vardır (Kumar ve ark. 2009).

Büyüme Faktörü	Kaynağı	Görevleri
Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)	makrofajlar, Trombositler, düz kas hücreleri, Endotel hücreleri	Fibroblast ve düz kas hücrelerinde proliferasyon, Kemotaksis
Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)	Plazma, Makrofajlar, monositler Anne sütü	Fibroblast ve Epitel hücre proliferasyonu
Fibroblast Büyüme Faktörleri (FGF)	Monositler, makrofajlar, endotel hücreleri	Matriks depolamasını uyarır, anjiyogenez
Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF)	Kupffer hücreleri, endotel hücreleri, ito hücreleri	Hücre büyümesi, göç, anjiyogenezis, morfogenezis
İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 (IGF-1)	Plazma, fibroblastlar Karaciğer	Fibroblast proliferasyonunu ve Kollejen sentezini uyarır.
İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 2 (IGF-2)	Çeşitli dokular	Fötal gelişme sırasında büyüme
İnsan Büyüme Hormonu (HGH)	Hipofiz bezi, plazma	Anabolizma , IGF-1 uyarımı
Transforme edici büyüme faktörü alfa (TGF- α)	Keratinositler, Trombosit, bazı dokular	Granülasyon dokusu oluşumunun uyarılması
Transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β)	Makrofaj, Trombosit, lenfosit, nötrofil, birçok doku ve hücre	Diğer büyüme faktörlerinin etkilerine yardım, Fibroblast proliferasyonu, kemotaksis
Tümör nekroz faktör (TNF)	Mast hücreleri, Makrofaj, T lenfositler	Fibroblast proliferasyonu

Tablo 1. Bazı Büyüme faktörleri, kaynakları ve görevleri (Özkorkmaz ve Özay 2009).

1.2.1.Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF)

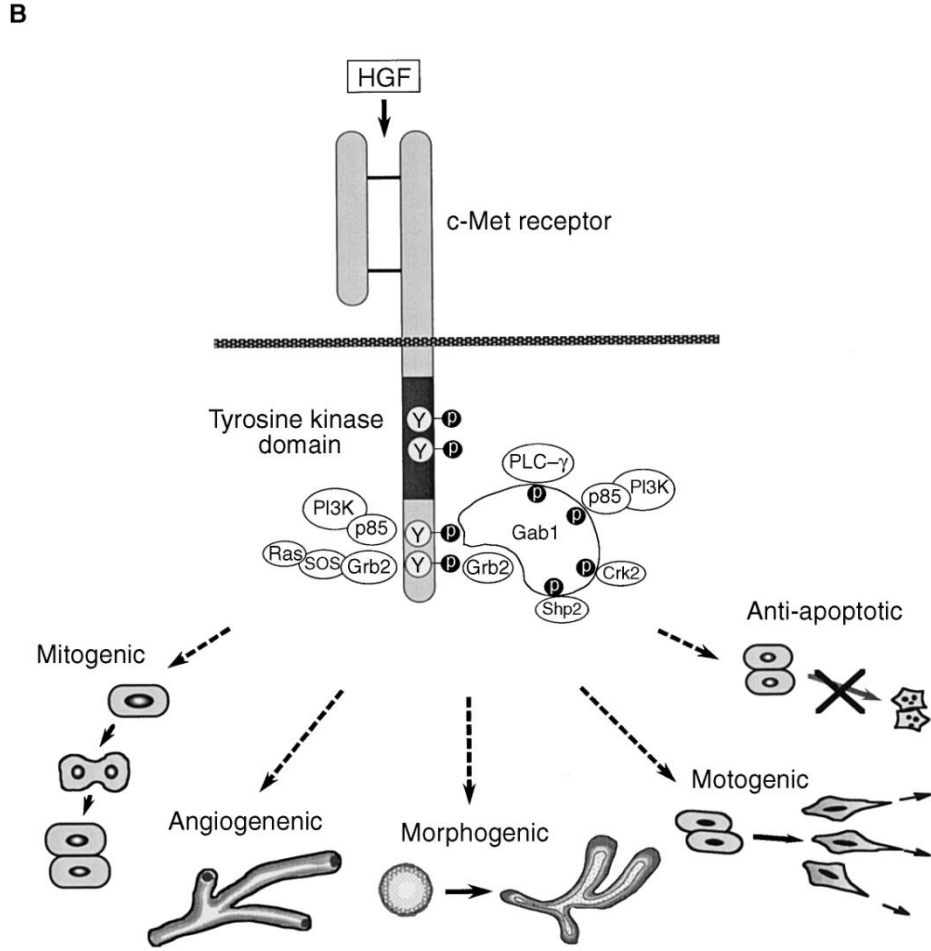
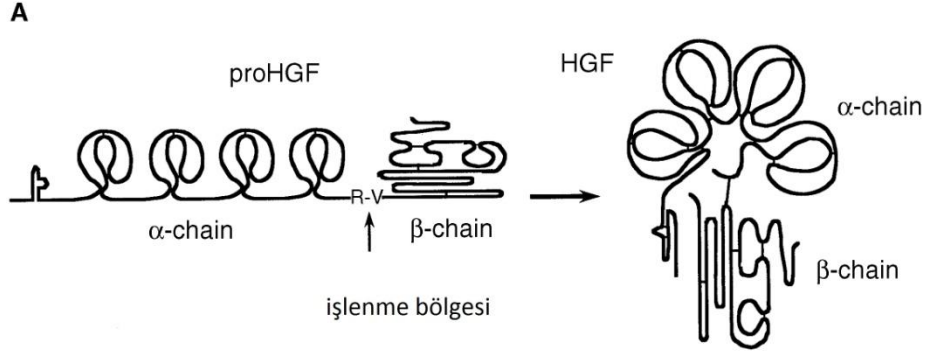
Hepatosit büyüme faktörü (HGF) ilk kez (1980'li yıllarda) hepatositlerin büyümesini sağlayan bir faktör olarak tespit edilmiştir. Daha sonra yapılan araştırmalarda HGF'nin pankreas β hücreleri, akciğer ve böbrek gibi çeşitli organların epitel hücrelerinde, fibroblast, makrofaj, düz kas hücreleri gibi mezengial hücrelerde üretilen pleiotropik bir sitokin olduğu anlaşılmıştır (Börset ve ark. 1996). HGF kornea, lens, retina gibi oküler yapıların yanı sıra

akciğer, deri, dalak, beyin gibi dokularda belirlenmesine rağmen esas olarak karaciğer tarafından üretilir (Canton ve ark. 2000).

Hepatosit büyüme faktörü (HGF); endotel hücresi, Kupffer hücresi ve İto hücresi gibi karaciğerin nonparankimal hücrelerinden salgınır (Noji ve ark. 1990). HGF'nin proteolitik aktivasyonu ve temizlenmesinde özellikle karaciğer rol oynar (Zioncheck ve ark. 1994).

Hepatosit büyüme faktörü (HGF), çeşitli hücre tiplerinde migrasyon, proliferasyon ve morfolojik değişiklikleri uyaran bir salgı proteinidir. Bu hedef hücreler arasında hepatositler, melanositler, endotel ve hematopoietik hücreler ile diğer epitel hücreleri sayılabilir (Birchmeier ve ark. 2003). Bu hücre tiplerinin çoğu HGF'ye yanıt olarak proliferer olurken, endotel ve epitel hücre kültürü kolonileri proliferer olmadan dağılır ve bu özellik HGF'nin bir 'saçılım faktörü (SF)' olarak tanımlanmasına neden olmuştur (Zhang ve ark. 2003).

Hepatosit büyüme faktörü ile reseptörü olarak bilinen c-met arasındaki ilişki 1991 yılında tanımlanmıştır (Bottaro ve ark. 1991). c-met reseptörü 190 kD ağırlığında, disülfid bağlarıyla bağlı heterodimerik formdan oluşur. Hepatosit büyüme faktörü reseptörü c-met tirozin kinaz ailesindedir ve bu reseptör teka granüloza ve ovaryumun stroma hücrelerinde tespit edilmiştir (Ito ve ark. 2001). c-met protoonkogeni ile kodlanan bu protein α (145kD) ve β (50kD) subünitlerinden oluşur (Michalopoulos ve Zarnegar 1992). Bütün aktiviteleri β subünitin intrasellüler kısmı gösterir ve tirozin kinaz etkisine sahiptir (Jucker ve ark. 1994).



Şekil 1. HGF ve reseptörü c-met'in sinyal iletim yolu A) pro-HGF'den HGF oluşumu. B) HGF'nin c-met reseptör, intraselüler sinyal yolları aracılığı ile yürütülen biyolojik aktivitelerinin şematik gösterimi (Nakamura 2010)

HGF'nin aminoasit sırası 1989 yılında tanımlanmış ve yapısının plazminojene benzediği ortaya konmuştur. cDNA'sı 728 aminoasitten oluşan İnsan kökenli HGF, α ve β zincirlerini içeren tek zincir prekürsör olarak sentezlenir. İnsan kökenli HGF ön prekürsörünün moleküler ağırlığı 83,126 kD ve matür formun moleküler ağırlığı 76,879 kD'dir (Nakamura ve ark. 1989). Prekürsör molekülün N terminal aminoasiti proglutamattır (Yoshiyama ve ark. 1991). HGF iki heterodimer zincir (α ve β zinciri) ve tek zincir prekürsörün karışımından elde edilir (Hernandez ve ark. 1992, Rubin ve ark. 1991).

HGF reseptörü c-met'in fibroblast, hepatosit, melanosit ve keratinositin yüzeyinde gösterildiği ve karaciğer, uterus, böbrek, dalakta saptandığı bildirilmiştir (Jucker ve ark. 1994). c-met reseptörü başlıca vasküler endotel hücreler, lenfatik endotel hücreler, nöral hücreler, hepatositler, hematopoetik hücreler ve perisitleri içine alan çeşitli epitel hücrelerinde bulunur (You ve McDonald 2008). Başlangıçta HGF hepatositler için potansiyel bir mitojen olarak tanımlanmıştır. Ancak daha sonraki çalışmalar HGF-c-met reseptörleri tarafından başlatılan intraselüler sinyal yollarının birçok hücrede; mitojenik, hücre motilitesinin artması, morfojenik, akson uzaması, anjiyogenez ve antiapoptotik aktivite gibi birçok biyolojik aktiviteye neden olduğu gösterilmiştir (Nohuchi ve ark. 1996). Ayrıca hepatosit büyüme faktörünün c-met reseptörü üzerinden kendi proliferasyonunu uyardığında gösterilmiştir (Naldini ve ark. 1991).

HGF genel olarak stromal veya mezenşimal hücreler tarafından ekspre edilir. Hepatosit Büyüme Faktörü Aktivatörü (HGFA), insan serumunda HGF'nin dominant aktivatörüdür (Miyazawa ve ark. 1996). Matriptase, biyolojik açıdan pro-HGF'nin dönüşümünü teşvik eden tripsin benzeri aktivitesi olan bir matriks bozucu serin proteazdır (Lin ve ark. 1999). Humoral tip faktör, heparin, kan pıhtılaşması faktörü XIIa, doku plazminojen aktivatörü ve ürokinaz plazminojen aktivatörü gibi diğer faktörler de pro-HGF nin HGF'ye dönüşümünü HGFA 'dan daha az bir şekilde sağlayan faktörlerdir (Naldini ve ark. 1992). HGFA trombin tarafından aktive edilir ve bu yolla HGF pıhtılaşma ve doku hasarı onarımı gibi önemli mekanizmalara bağlanır. Buna ek olarak, yaralı dokularda üretilen HGF'nin kısmen lokal kontroller yaparak kendi kendini düzenlediği düşünülmektedir (Miyazawa ve ark. 1994).

Hepatosit büyüme faktörünün etkisi epinefrinle artarken, TGF- β ile inhibe edilir, heparinle kısmen inhibe edilir (Lindroos ve ark. 1991, Zarnegar ve Michalopoulos 1989).

1.3. Sindirim sistemi

Sindirim sistemi, ağız ile başlayıp anüs ile son bulan ve yer yer genişlemeler gösteren kanal şeklindeki organlar (ağız boşluğu, yutak, yemek borusu, mide, barsaklar, anüs) ile bu kanalın dışında yerleşmiş olan ve salgılarını organlara akıtarak sindirim mekanizması üzerinde rol oynayan bezlerden oluşur (Gülmez ve Yörük 2008).

1.3.1.Mide Histolojisi

Mide, hormon salgılayan ve yiyecekleri sindiren hem endokrin hem de ekzokrin bir organ olarak tanımlanır. Histoloji açısından kardias, fundus, korpus ve pilor olmak üzere dört kısımda incelenir (Junquiera ve ark. 1993). Mide histolojik olarak dıştan içe doğru tunika seroza, tunika muskularis, tunika submukoza ve tunika mukoza olmak üzere 4 tabakadan meydana gelmektedir (Gülmez ve Yörük 2008).

1.3.1.1.Tunika Mukoza

Midenin mukoza ve submukozasında çok sayıda plika gastrika (ruğa) denilen kalın plikalar vardır. Bu kıvrımlar mide yiyeceklerle dolu olduğunda yassılaşıır (Junquiera ve ark. 1993). Foveola gastrikalar fundusda lamina muskularise kadar uzanırlar. Tunika mukoza; lamina epitelyalis, lamina propria ve lamina muskularis mukoza olmak üzere üç bölümde incelenir (Gülmez ve Yörük 2008).

Lamina epitelyalis

Mide epiteli tek katlı prizmatik epiteldir (Junquiera ve ark. 1993). Yüzey ile birlikte foveola gastrikaların üzerini örten bu epitel hücreleri glikozaminaglikan türünde mukus salgırlar (Gülmez ve Yörük 2008).

Lamina propria

Kan ve lenf damarları ile düz kas hücrelerinden zengin, gevşek bir bağ dokudan meydana gelir. Kutan mukozalarda bu bölgede bez bulunmazken, glandüler mukozaya sahip organlarda bezler bulunur. Ayrıca bağ doku unsurlarıyla beraber lenfoid doku unsurları, sinir hücreleri ve sinir telleri de görülür (Gülmez ve Yörük 2008).

Fundus bölgesi lamina propriyası tubuler gastrik bezler (fundus bezleri) ile doludur. Bunlar gastrik çukurcuğun dibine açılır. Bu gastrik bezler 5 hücre tipi içerir: kök hücreleri, müköz boyun hücreleri, pariyetal hücreler, prensipal hücreler ve endokrin hücrelerdir (Junquiera ve ark. 1993).

Bu bezlerde kök, pariyetal ve müköz boyun hücreler, tabanında ise prensipal ve pariyetal hücreler ile endokrin hücreler bulunur (Junquiera ve ark. 1993, Gülmez ve Yörük 2008).

Kök Hücreleri (Farklılaşmamış Hücreler): Bölgede az sayıda bulunur ve alçak boylu prizmatik hücrelerdir. Daha sonra müköz boyun hücreleri ile pariyetal, prensipal ve enteroendokrin hücrelere farklılaşırlar (Junquiera ve ark. 1993).

Müköz Boyun Hücreleri: Hücreler gastrik bezlerin boyun bölgelerindeki pariyetal hücreler arasında tek olarak ya da kümeler halinde bulunur. (Junquiera ve ark. 1993).

Pariyetal Hücreler: Pariyetal hücreler genel olarak bezlerin üst yarısında bulunurlar, taban bölgesinde çok seyrekler (Bevelander 1974). Pariyetal hücrelerden 0.07 mol/l potasyum klorür, 0.16 mol/l hidroklorik asit, gastrik intrinsik faktör ve eser miktarda diğer elektrolitler salgılanır. Bu hücrelerin yüksek miktarda mitokondri bulundurması pariyetal hücrelerin metabolik durumlarda enerji gereksiniminin oldukça yüksek olduğuna işaret eder (Junquiera ve ark. 1993, Cormack 1998).

Prensipal (zimojen) Hücreler: Bu hücreler bezlerin alt bölümünde daha fazladır (Junquiera ve ark. 1993). Sitoplazmalarının içerisinde granüllerde

inaktif pepsinojen enzimi bulunur. İnaktif pepsinojen pepsine dönüşür. İnsanda prensipal hücreler aynı zamanda lipaz enzimini de üretirler. Bez hücrelerinin çoğunu oluşturduklarından esas hücre olarakta bilinir (Junquiera ve ark. 1993, Gülmez ve Yörük 2008).

Enteroendokrin Hücreler: Bu hücreler sayıca azdır ve bazal membran ile prensipal hücreler arasına yerleşmişlerdir. Sindirimin lokal olarak kontrolünde rol oynayan serotonin, gastrin, somatostatin ve enteroglukagon gibi gastrointestinal hormonları salgırlar (Gülmez ve Yörük 2008, Bevelander 1974).

Lamina Muskularis

Düz kas tellerinin oluşturduğu ince kas tabakasıdır (Gülmez ve Yörük 2008).

1.3.1.2. Submukoza

Lamina propriyada olduğu gibi submukoza içerisinde de bağ doku unsurlarıyla beraber kan ve lenf damarları, sinir hücreleri (Meissner korpüskülleri) ve sinir telleri bulunur (Junquiera ve ark. 1993, Gülmez ve Yörük 2008).

1.3.1.3. Tunika Muskularis

Besin maddelerinin ileriye doğru itilmesinden sorumlu olan kas tabakasıdır. Genellikle iki kat halindedir. İçteki kas tabakası sirküler, dıştaki ise longitudinal bir yerleşim gösterir. İçteki ve dıştaki kas tabakaları arasında bağ doku unsurlarıyla beraber, kan ve lenf damarı ile sinir telleri bulunur (Gülmez ve Yörük 2008).

1.3.1.4. Tunika Seroza/Tunika Adventisya

Tunika muskularisi dıştan saran bağ doku tabakasıdır (Gülmez ve Yörük 2008).

1.4. STREPTOZOTOSİN (STZ)

Kimyasal bir toksin olan STZ, *Streptomyces griseus* adlı mantarın küfünden elde edilir. STZ antioksidan enzim sisteminin bulunmadığı pankreas B hücrelerini oksidan etkisi ile tahrip ederek insülin salınımını azaltır (Like ve Rossini 1976). STZ'nin diabet oluşturma etkisi ilk defa Rakieten tarafından gösterilmiştir (Rakieten ve ark. 1963).

Streptozotosinin diabet oluşturma etki mekanizması için farklı görüşler bulunmaktadır. Bazı araştırmacılara göre STZ, sitotoksik etkilerinin serbest radikal temizleyici enzimlerin inhibisyonu aracılığı ile olmakta ve böylece süperoksit radikallerinin üretimini artırmaktadır (Heller ve ark. 1994). Bazı araştırmacılara göre ise STZ, pankreas dokusunda bulunan serbest radikal temizleyicisi olarak bilinen süperoksit dismutazı inhibe eder ve böylece serbest radikallerin birikmesi sonucu β hücreleri yıkıma uğrar (Takeshita ve ark. 1998).

1.5. Diabetes Mellitus ve HGF

Diabetes mellitus sistemik bir hastalıktır ve vücuttaki diğer organ ve sistemleri etkilediği gibi mide ve bağırsak sisteminde etkileyerek sindirim sisteminde çeşitli rahatsızlıkları tetiklediği düşünülmektedir. Diabetes Mellitus, insülini antagonize eden glukagon, kateşolaminler, glukokortikoidler ve büyüme hormonunun artışı ve insülin aktivitesindeki değişimlerle şekillenmeye başlar (Rand ve ark. 2004, Reusch ve ark. 2006).

HGF, mezenşimal hücrelerden sentez edilen ve etkisini epitel hücrelerinde bulunan spesifik reseptörü c-met üzerinden gösteren (Gherardi ve Stoker 1991), vücudun birçok organı tarafından üretilen ve çeşitli biyolojik etkilere sahip bir büyüme faktörüdür (Nakamura T 1991). Aynı zamanda saçılım faktörü ve hepapoietin A olarakta bilinen HGF (Matsumoto ve Nakamura 1993), hepatositler, epitel, endotel, hematopietik hücreler ve nöral hücreler gibi geniş bir hücre grubuna etki etmektedir. HGF, hücrenin hareket yeteneğini artıran, doku farklılaşması ve gelişiminde etkili rolü olan ve diğer büyüme faktörlerinden yapısal olarak farklı olan bir büyüme faktörüdür (Tsubouchi 1999).

HGF, endotele özgü büyüme faktörleri ailesinin yeni bir üyesidir. HGF, endotel hücreler ve vasküler düz kas hücrelerinde in vitro ve in vivo ortamda gösterilmiştir. Aynı zamanda HGF, anjiyogenik bir büyüme faktörüdür ve vasküler endotel hücrelerin hasarlarının onarımı sürecinde ve proliferasyonunda etkin bir rol oynamaktadır (Bussolino ve ark. 1992, Nakamura T ve ark. 1984, Nakamura Y ve ark. 1995).

HGF, başlangıçta hepatosit-spesifik mitojen olarak tanımlanmıştır. Daha sonra çeşitli hücre tiplerinde DNA sentezinin potent bir uyarıcı olduğu gösterilmiş ve doku yenilenmesi, yara iyileşmesi, normal doku büyümesi, tümör progresyonu, embriyogenez ve tümör invazyonunda (Nohuchi ve ark. 1996) fonksiyonu olduğu bilinen bir sitokin olduğu bulunmuştur (Stracke ve ark. 1998, Vargas ve ark. 2000). Karaciğerde HGF üreten hücrelerin Kupffer hücreleri, Ito hücreleri ve sinüzoidal endotel hücreler olduğu düşünülmektedir. HGF'nin karaciğer dışında birçok organda da bulunduğu gösterilmiş ve karaciğer hasarı sonrasında akciğer, böbrek ve dalakta HGF mRNA'sının arttığı gözlemlenmiştir. Bu bulgular HGF'nin hepatositler ve diğer organlar üzerine etkisi olan endokrin veya parakrin bir faktör olarak tanımlanmasına neden olmuştur (Shiota ve ark. 1995). Tek zincir yapısındaki pro-HGF dalak, karaciğer, akciğer, adrenal bezde ve böbrekte de bulunmuştur (Zioncheck ve ark. 1994).

HGF proteini hem karaciğer için hem de plasenta, böbrek, akciğer, beyin, hematopoetik dokular ve pankreas için de büyüme faktörüdür. HGF mRNA'sı ve HGF proteininin yüksek konsantrasyonu ince beyin, barsak, tiroid, plasentada ve timusta da saptandığı bildirilmiştir (Sakaguchi ve ark. 1994).

Lokal HGF c-met sistemleri sadece doku tamirlerinde değil metabolik homeostazide de etkili olduğu ve HGF pankreas beta hücrelerinde insülin üretimini ve mitogenezisi uyardığı bildirilmiştir (Dai ve ark. 2003). HGF alfa hücrelerinde üretilir ve hipergliseminin önlenmesini, beta hücrelerinde insülin üretimini düzenler (Dai ve ark. 2003). Lokal HGF c-met sisteminin kan-glikoz seviyesini düzenlediği gösterilmiştir (Nakamura ve Mizuno 2010).

HGF'nin dokular üzerine rejenerasyonu üzerine yapılan araştırmalarda (Nakamura 1991, Matsumoto ve Nakamura 1992, Mizuno ve Nakamura 2007, Mizuno ve ark. 2008), in vitro çalışmaların çoğu HGF'nin böbrek, akciğer ve diğer dokuların epitel hücreleri üzerinde yenileme etkisi olduğunu saptamışlardır. Sirozda serum HGF düzeyinin arttığı ancak siroz oluşturulan rat modellerinde matur HGF düzeyinin azalmış olduğu belirtilmiştir (Nishio ve ark. 2002). Sirotik ratlara ekzogen HGF verilmesinin, HGFA sentezini artırarak HGF oluşumunu sağladığı ve MAPK (mitojenler ile aktive edilen protein kinaz) yolağı üzerinden sirotik karaciğerde proliferasyonu uyardığı gösterilmiştir (Xue ve ark. 2003).

Hipertansif hastalarda serum HGF konsantrasyonlarının normal bireylere göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Morishita ve ark. 1999). Aynı şekilde Sugimura ve arkadaşları (1995), kronik böbrek yetmezliği bulunan hastalarda serum HGF seviyelerinin arttığını saptamışlardır.

Hepatosit büyüme faktörü ve c-met reseptörü folliküler gelişim sırasında küçük, orta ve büyük boy folliküllerden eksprese edilmektedir. Teka hücrelerindeki HGF mRNA düzeyleri ve granüloza hücrelerindeki c-met düzeylerinin büyük boy folliküllerde, küçük ve orta boy folliküllere göre daha yüksek olduğu izlenmiştir. Bu sonuçlar HGF'nin ve c-met reseptör ekspresyonunun folliküler gelişim basamaklarına bağlı olarak düzenlendiğini göstermektedir (Parrott ve Skinner 1998).

HGF'nin onarıcı özelliği nedeniyle diabetes mellitus ile arasındaki ilişki son zamanlarda merak edilen konulardan biridir. Yapılan araştırmalarda Diabetes Mellituslu hastalarda serum HGF düzeylerinin hastalığın şiddetine komplikasyonların varlığına bağlı olarak etkilendiği gösterilmiştir (Nishimura ve ark. 1999, Nakamura S ve ark. 1998, Morishita ve ark. 1997, Kulseng ve ark. 1998, Nishimura ve ark. 1998). Funakoshi ve Nakamura (2003) yaptıkları çalışmada Diabetes Mellitus, lseratif kolit ve Crohn hastalığı bulunan hastalarda serum HGF seviyesinin arttığını bildirmişlerdir.

Yapılan bazı araştırmalarda hücre kültürlerinde yüksek glikoz değerlerinin endotel hücrelerinde lme yol açarak endotel ve vasküler düz

kas hücrelerinde lokal HGF üretimini baskıladığını belirlemişlerdir (Morishita ve ark. 1997, Morishita ve ark. 2002, Nakagami ve ark. 2005). Rekombinan HGF uygulamasının yüksek glikoza bağlı endotel hücre ölümünü önleyici etkisinin olduğu gözlemlenmiştir (Morishita ve ark. 1997).

HGF geninin diabetik nefropatideki ilerlemeyi yavaşlattığı (Dai ve ark. 2004), hipertansiyon gibi nedenlere bağlı gelişen kronik böbrek hastalıklarında böbrek dokusunun endotel ve epitelini onararak böbrek fonksiyonlarını iyileştirdiği de gözlenmiştir (Komamura ve ark. 2008).

Günümüzde hepatosit büyüme faktörü ile diabetes mellitus arasındaki ilişki sıkça araştırılan konulardan biridir. Dai ve ark. (2004), HGF'nin uzun süreli ekspresyonunun normal böbrek yapı ve fonksiyonunda ters yan etkiler yapmadığı ve diabetik nefropatideki etkilerinin tartışmalı olmasına rağmen, HGF takviyesinin renal yetmezlikli farelerin iyileştirilmesinde yararlı olabileceğini belirtmişlerdir.

Takahashi ve arkadaşları (1995), yaptıkları çalışmada HGF'nin gastrik fibroblastlarda üretildiğini ve gastrik epitelyum hücreleri için parakrin büyüme faktörü olarak önemli bir rol oynadığını bildirmişlerdir.

Diabetes mellitus'un midedeki etkileri, HGF'nin ise hücreler üzerindeki onarıcı, doku farklılaşmasını sağlayıcı yetenekleri düşünülerek; Diabet oluşturulmuş farelerin mide dokusunda Hepatosit Büyüme Faktörünün immunoreaktivitesi araştırmamızda incelendi.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. MATERYAL

2.1.1. Deney Hayvanı Materyali

Deney hayvanları Erzurum Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Enstitüsünden temin edilmiştir. Deneyde farelerde yapılan uygulamalar için Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi KAÜ-HADYEK/2014-008 kodlu Etik Kurulu onayı alındı. 45 adet yeni nesil swiss albino fare (ortalama 8-12 haftalık) 1 hafta boyunca standart fare yemi (Erzurum Bayramoğlu Yem Fabrikası A.Ş'den temin edilen) ile beslendi ve su alımı serbest bırakıldı. Ardından kontrol, sham ve deneme olmak üzere 15'erli hayvan şeklinde 3 gruba ayrıldı. Deney hayvanları standart fare kafeslerinde, $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ısı ve % 50 ± 5 nem oranı olan ve 12 saat ışık ile 12 saat karanlık olan standart bir ortamda tutuldu.

Gruplara göre deneysel uygulamalar Tablo 2'de verilmiştir.

	Gruptaki Denek Sayısı	Deneysel Uygulamalar
Grup I (Kontrol)	15	Herhangi bir uygulama yapılmadı.
Grup II (Sham)	15	pH 4,5 deki 0.1 M sitrat tamponunun intraperitoneal tek enjeksiyonu.
Grup III (Deneme)	15	pH 4,5 deki 0.1 M sitrat tamponu içerisinde STZ'nin (100 mg/kg) intraperitoneal tek enjeksiyonu.

Tablo 2. Deney grupları ve yapılan uygulamalar

2.2. METOT

2.2.1. Streptozotosin ile Diabet Oluşturulması

Deneme grubu farelerde deneysel olarak diabet yapmak için kullanılan streptozotosin (STZ) (Sigma S0130-100 MG) soğuk zincir şartlarına dikkat edilerek temin edildi. Kullanıldığı güne kadar -20 °C' de muhafaza edildi.

Deneme grubuna 8 saat açlık sonrası sitrat tamponu (pH 4,5 de 0.1M) içerisinde eritilen streptozotosinden (STZ), her hayvana 100 mg/kg olacak şekilde tek doz 0.2 ml intraperitoneal (i.p) uygulandı. Denekler enjeksiyon uygulamasından 4 saat sonra standart fare yemi ve içme suyu ile beslendi. Deneme grubuna STZ uygulamasından 72 saat sonra 8 saatlik açlık sonrası farelerden alınan kanda glukometre ile 200 mg/dl'nin üzerinde kan glikoz düzeyi olanlar diabetli olarak kabul edildi (Kanitkar ve Bhonde 2004). Sham grubuna 8 saat açlık sonrası her hayvana 0.1M sitrat tamponu intraperitoneal (i.p) uygulandı ve diğer grup olan kontrol grubuna hiçbir uygulama yapılmadı.

2.2.2. Canlı Ağırlık Ölçümü

Farelerin canlı ağırlıkları, deneye ilk başlangıç zamanı 0 kabul edilerek, 0, 3, 15. ve 30. günlerde 8 saatlik açlık sonrası hassas dijital terazi (Precisa-XB220A) ile tartıldı.

2.2.3. Kan-Glikoz Değerlerinin Ölçümü

Farelerin kan-glikoz değerleri 8 saatlik açlık sonrası 0., 3, 15 ve 30. günlerde ölçüldü. Diabet oluşturulması için kullanılan STZ uygulamasından 72 saat sonra 8 saat aç bırakılan farelerin orbital sinüslerinden hematokrit tüpü ile alınan kanda el glukometresi (Accu- Chek- Go, Roche) kullanılarak kan- glikoz değerleri ölçüldü. Kan glikoz değeri 200 mg/dl ve üzerinde olanlar diabet kabul edildi (Kanitkar ve Bhonde 2004).

2.2.4. Dokuların Alınması

Farelerden doku alımına 3. günden itibaren başlandı. Doku örnekleri eter anestezisi altında servikal dislokasyonla öldürülen farelerden 3, 15 ve 30. günlerde alındı.

2.2.5. Histolojik İnceleme

Çalışmada kullanılacak olan dokular alındıktan sonra bekletilmeden Bouin ve %10'luk formaldehit solüsyonlarında tespit edildi ve daha sonra dokular sırasıyla alkollerden, metil benzoat ve benzollerden geçirildikten sonra parafinlere blokları yapıldı. Hazırlanan parafin bloklarından krom-alum-jelatin ile kaplanmış lamlara 5 mikrometre (μm) kalınlığında seri kesitler alındı. Histolojik incelemeler için alınan kesitlere Crossman üçlü boyaması (triple boyama) ve Hematoksilen&Eosin (H&E) boyamaları uygulandı (Luna 1968). Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobunda (Olympus Bx51, Japan) değerlendirilerek gerekli görülen olgular fotoğraflandırıldı.

2.2.6. İmmunohistokimyasal İnceleme

HGF'nin midenin fundus bölgesindeki immunolokalizasyonunu incelemek için Avidin-Biotin-Peroksidaz kompleks (ABC) tekniği (Hsu 1981) uygulandı. Alınan doku örneklerinden hazırlanan parafin bloklardan 5 mikrometre (μm) kalınlığında mide dokusuna ait seri kesitler alındı. HGF varlığını belirlemek amacı ile kesitler deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden geçirilerek fosfat buffer solüsyonunda (Fosfat buffer salin (PBS)) çalkalandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesinin inhibe edilmesi için %3'lük H_2O_2 'de (0.1 M'lik PBS'de hazırlanmış) 10 dakika inkübe edildi. PBS ile yıkandıktan sonra (3x5 dk) antijenleri açığa çıkarmak için 10 dk mikrodalga fırında ısı uygulandı. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra (3x5 dk) spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için kesitler, sekonder antikorun üretildiği türe uygun serumda (%10) inkübe edildi. Primer ve sekonder antikorlar ile streptavidin horse radish peroksidazı dilüe etmek amacıyla PBS solüsyonunda hazırlanan ve %2.5 sığır serum albumin, %0.25 sodyum asid ve %2 Triton X-100 içeren solüsyon kullanıldı. Daha sonra kesitler oda sıcaklığında anti-HGF (abcam: sc7949) (1:400) ile 1 saat inkübasyona bırakıldı. Primer antikor uygulaması sonrası PBS ile yıkamanın ardından kesitler üzerine primer antikorun üretildiği türe karşı olan biotinlenmiş sekonder antikor (Biotinylated Goat Anti-Rabbit (Lab. Vision, 510.991.2800)) ilave edilerek 30dk oda ısısında bekletildi. Fosfat buffer salinde yıkanan (3x5 dk) kesitlere streptavidin horse radish peroksidaz ilave

edilerek oda 15 dk tutuldu. Tekrar PBS ile yıkanan (3x5 dk) kesitlere bu defa kromojen uygulaması için Diaminobenzidin-hidrojen peroksidaz (DAB- H₂O₂) tekniği (Shu, S. 1988) kullanıldı. Kesitlere kromojen solüsyonu eklendikten sonra ışık mikroskobunda kontrol edilerek immunreaktivitenin olma durumuna göre reaksiyon distile su ile durduruldu. Zıt boyama için hematoksilen kullanıldı. Ardından rutin işlemlerden (dehidrasyon, saydamlaştırma) geçirilen kesitler üzerine entellan damlatılarak lamelle kapatıldı. Işık mikroskobunda (Olympus Bx51, Japan) preparatlar incelendikten sonra fotoğrafları çekildi.

Hücrelerdeki HGF immunreaktivitesi, reaksiyon yoğunluğunun derecesine göre, birbiri ile karşılaştırılarak belirlendi.

Hazırlanan preparatlara HGF immunreaktivitesinin spesifik olduğunu belirlemek amacıyla, primer antikor ilave etmeden boyama prosedürü uygulanarak negatif kontrol preparatları değerlendirildi.

3. BULGULAR

Çalışmada farelerin canlı ağırlık, kan-glikoz değerleri, histolojik ve immunohistokimyasal bulgular değerlendirilmiştir.

3.1. Canlı Ağırlık Bulguları

Grupların kendi içerisinde değerlendirilen canlı ağırlık bulguları aşağıdaki tablolarda belirtilmiştir (**Tablo 4,5,6**). Canlı ağırlık değerlendirmeleri 0, 3,15 ve 30. günlerde yapılmıştır.

Gün	n	Canlı Ağırlık (gr)	P
0. gün	15	38,02 ± 1,78	0.315
3. gün	15	38,19 ± 1,88	
15. gün	10	37,93 ± 2,02	
30. gün	5	36,09 ± 1,69	

Tablo 3. Kontrol grubu canlı ağırlıklarının kendi içinde günlere göre karşılaştırılması (P<0.05).

Kontrol grubu canlı ağırlıklarının ortalaması kendi içinde istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark bulunmadı (P<0.05).

Gün	n	Canlı Ağırlık (gr)	P
0. gün	15	38,62 ± 2,79	0.601
3. gün	15	37,18 ± 2,38	
15. gün	10	37,77 ± 1,87	
30. gün	5	37,20 ± 2,34	

Tablo 4. Sham grubu canlı ağırlıklarının kendi içinde günlere göre karşılaştırılması (P<0.05).

Sham grubunun kendi içinde ortalama canlı ağırlıkları arasında günlere göre anlamlı bir fark tespit edilmedi (P<0.05).

Gün	n	Canlı Ağırlık (gr)	P
0. gün	15	40,54 ± 1,67	0.038
3. gün	15	38,50 ± 1,15	
15. gün	10	29,32 ± 2,08	
30. gün	5	27,60 ± 1,76	

Tablo 5. Deneme grubu içinde günlere göre canlı ağırlık bulgularının karşılaştırılması. (P<0.05)

Deneme grubunun canlı ağırlık ortalamasının değerlendirilmesinde günlere göre istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark bulundu (P<0.05). Tablo 5’de görüldüğü üzere diabetli grupta ortalama canlı ağırlıkta zamana bağlı olarak azalma olduğu belirlendi.

3.2. Kan-Glikoz Değerleri

Tüm gruptaki deneklerin deneysel uygulamanın başlangıcından itibaren kan-glikoz değerleri 0, 3, 15 ve 30. günlerde ölçüldü.

Kontrol ve sham grupları arasında, ortalama kan-glikoz değeri açısından istatistiksel düzeyde (P<0.05) anlamlı bir fark bulunmadığı, Deneme grubunda ise kontrol ve sham grubuna göre kan-glikoz düzeyi açısından istatistiksel olarak (P<0.05) anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi (**Tablo 6**).

	KONTROL	SHAM	DENEME	
0. gün	115,67±4,87	107,27±7,65	110,27±4,25	P=0.585
3. gün	121,93±6,03 ^b	120,07±4,68 ^b	301,93±17,20 ^a	P=0.000
15. gün	120,20±5,87 ^b	118,10±5,03 ^b	332,50±13,69 ^a	P=0.000
30. gün	122,60±7,30 ^b	120,80±8,11 ^b	394,60±26,06 ^a	P=0.000

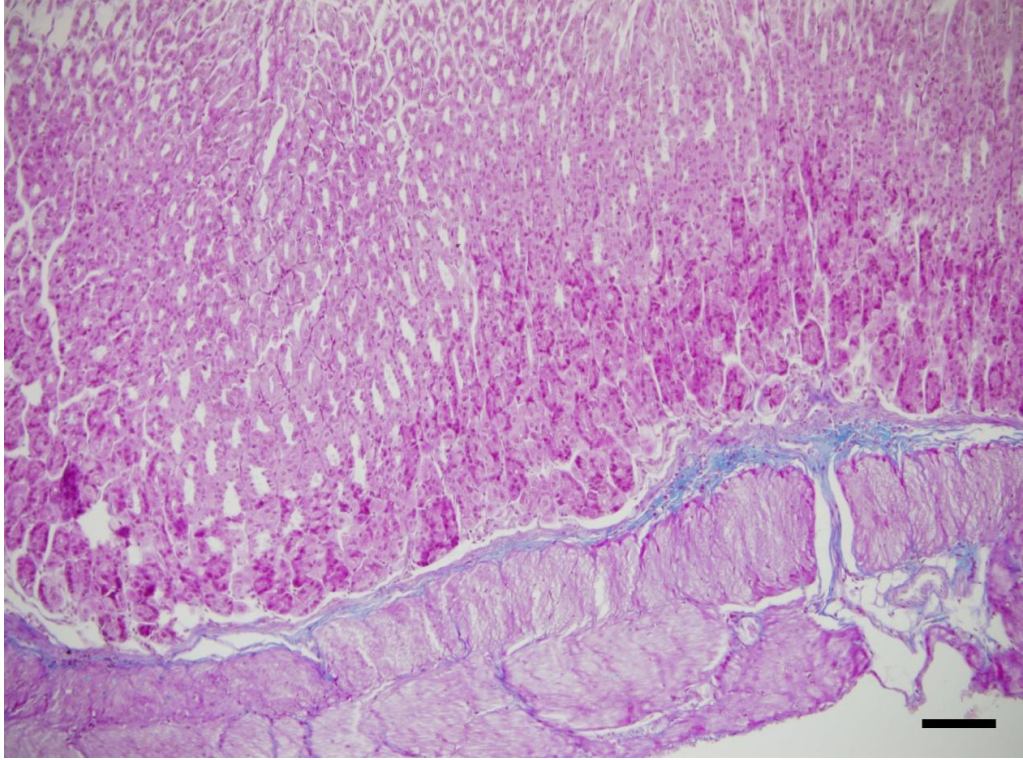
Tablo 6. Kan-glikoz düzeyinin karşılaştırılması (P<0.05).

a,b: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasında fark istatistiki olarak önemlidir (P<0.05).

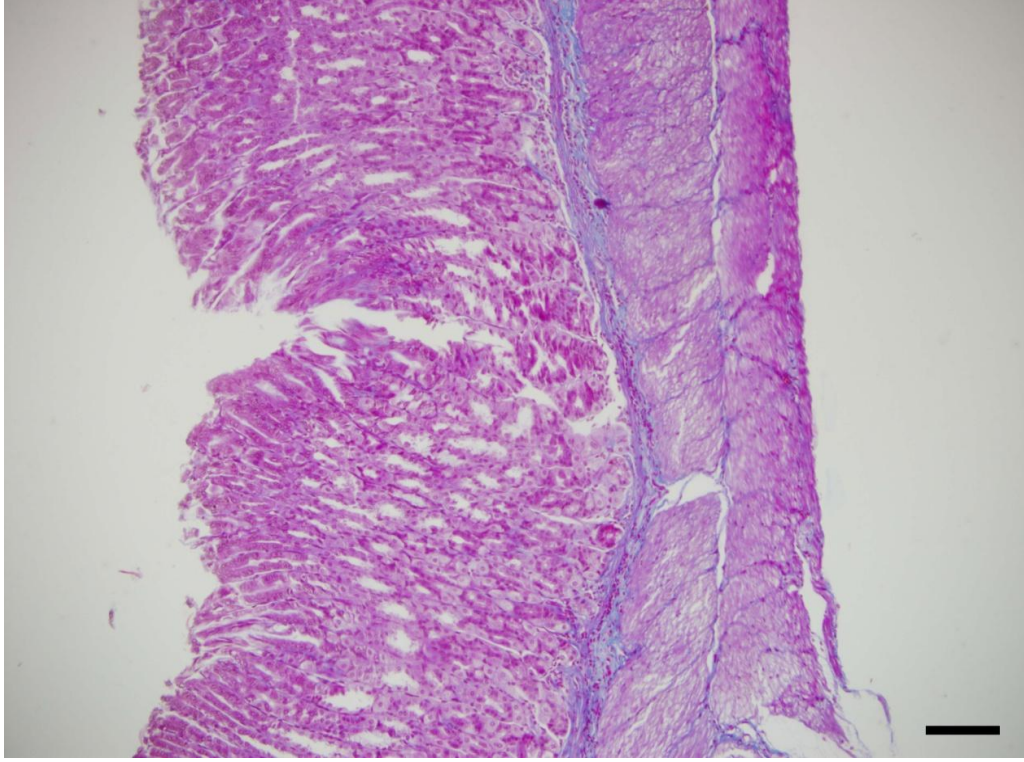
Deneme grubunun kendi içerisinde ortalama kan-glikoz düzeyi yönünden deneme grubunun kendi içinde günlere göre istatistiksel düzeyde ($P<0.05$) anlamlı bir fark vardır (**Tablo 6**). Deneyin başlangıcı olan 0. gündeki ortalama kan-glikoz değeri ile 3, 15 ve 30. günlerdeki ortalama kan-glikoz değerleri arasında istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark bulundu. Bu verilere göre, STZ uygulamasını takip eden 72 saatte deneme grubu deneklerinde diabet oluştuğu ve bir aylık çalışma sürecinin sonuna kadar kan-glikoz düzeylerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı görüldü.

3.3. Histolojik Değerlendirme

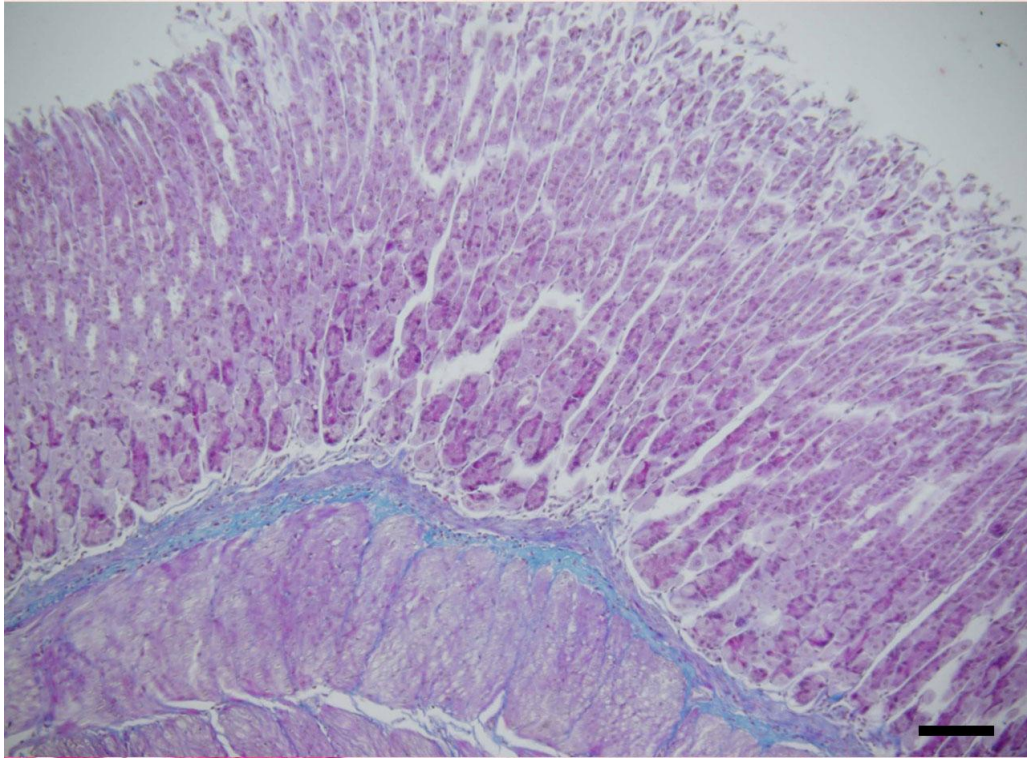
Yapılan mikroskopik incelemeler sonucunda, fundusun histolojik yapısının kontrol (**Resim 1**), sham (**Resim 2**) ve deneme (**Resim 3**) gruplarında benzer yapıda olduğu ve farklılık bulunmadığı görüldü. Ayrıca grupların kendi içerisinde 3, 15 ve 30. Günler incelendiğinde histolojik olarak herhangi bir farklılık gözlenmedi.



Resim 1. Kontrol grubu fare midesinin histolojik görünümü (30. Gün). Triple boyama
Bar:200 μ m

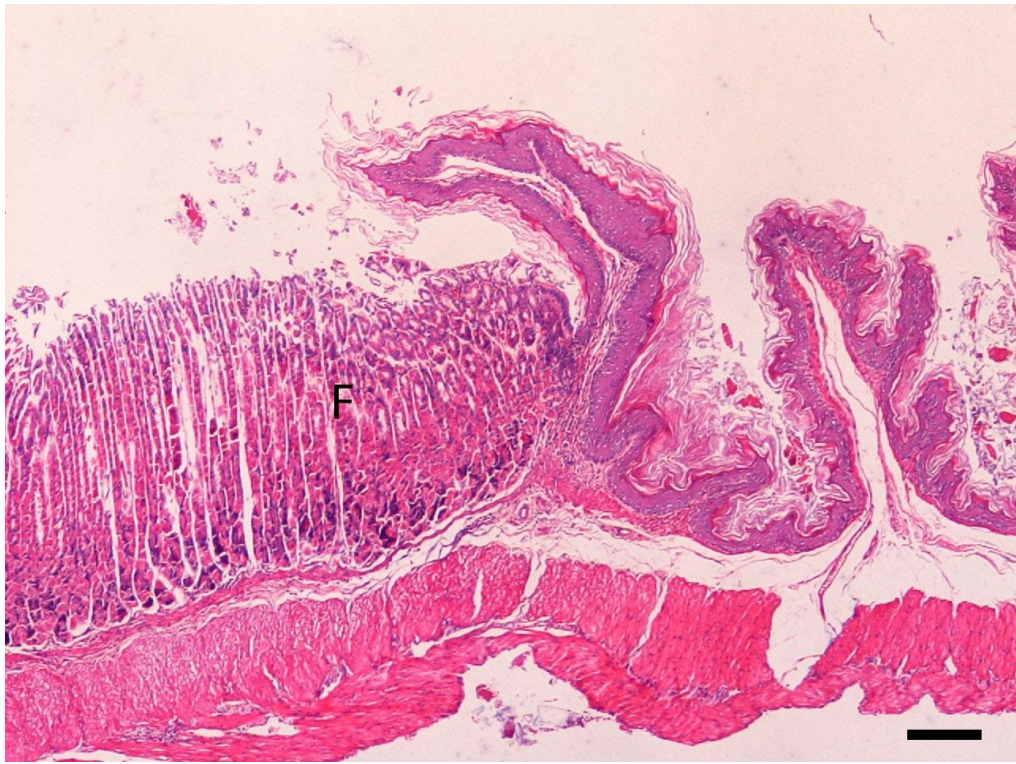


Resim 2. Sham grubu fare midesinin histolojik görünümü (30. Gün). Triple boyama. Bar:200 μ m

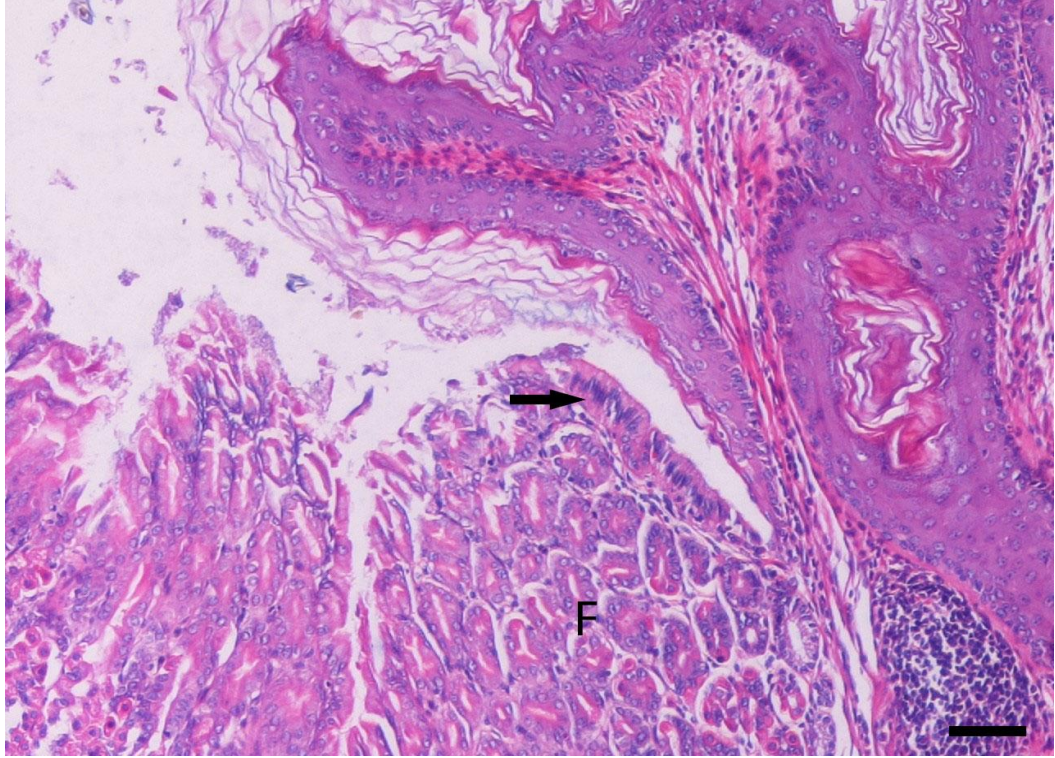


Resim 3. Deneme grubu fare midesinin histolojik görünümü (30. Gün). Triple boyama Bar: 200 μ m

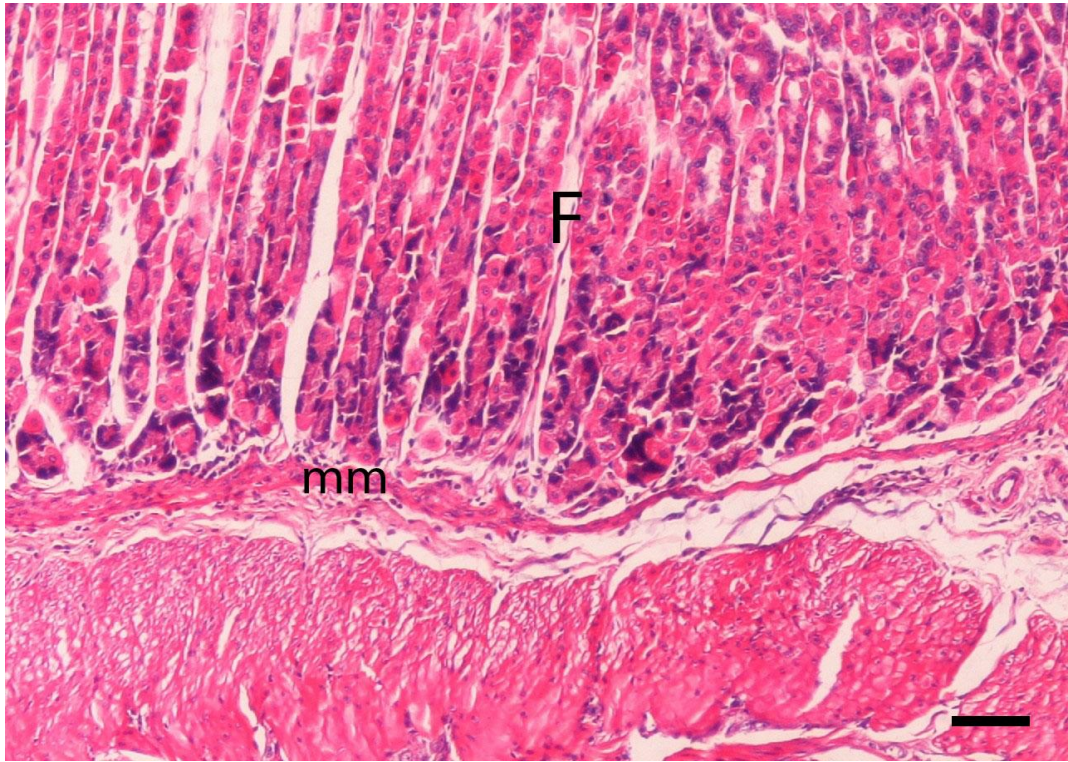
Grupların hepsinde tunika mukoza, submukoza, tunika muskularis ve tunika seroza katmanlarında histolojik olarak bir farklılık olmadığı gözlemlendi (**Resim 4**). Bütün gruplarda tunika mukozanın katmanları olan lamina epitelyaliste tek katlı prizmatik epitelde (**Resim 5**), lamina propriyadaki bez yapılarında ve lamina muskularis katmanlarında histolojik açıdan herhangi bir değişiklik tespit edilmedi (**Resim 6**).



Resim 4. Deneme gurubu genel görünüm (30. Gün). **F:** Fundus H&E Bar: 500µm



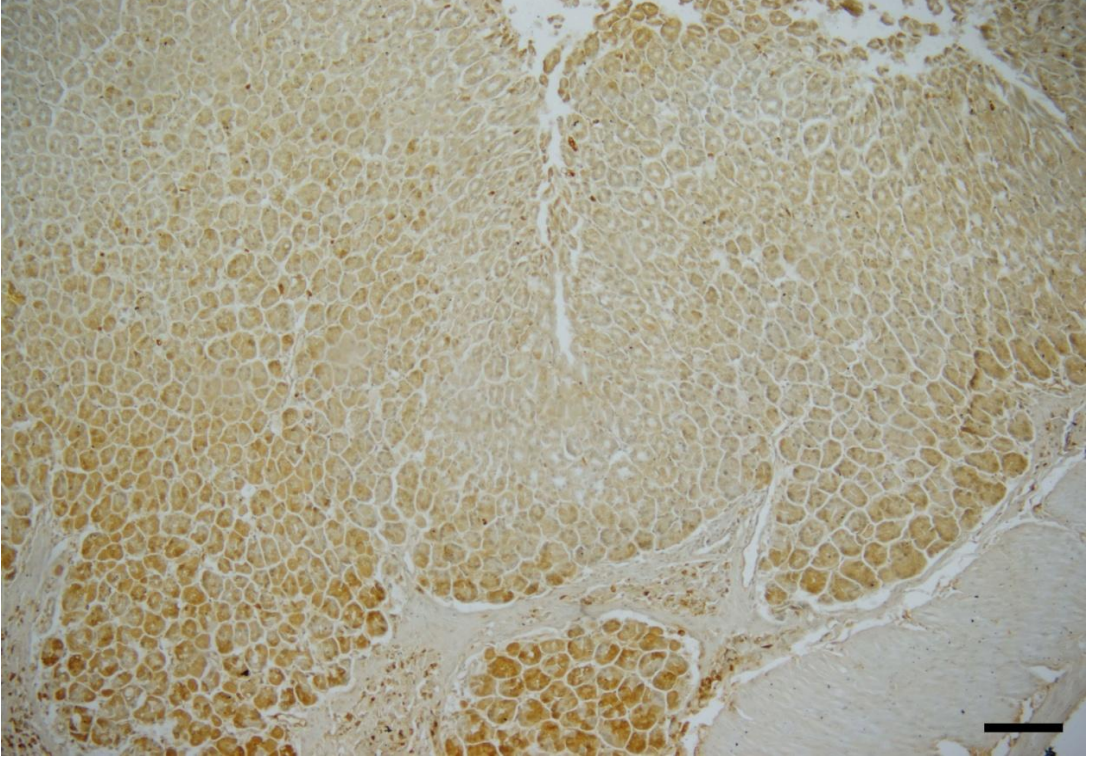
Resim 5. Kontrol gurubu genel görünüm (3. Gün). **Ok:** Tek katlı prizmatik epitelyum yapısı **F:** Fundus H&E. Bar:200µm



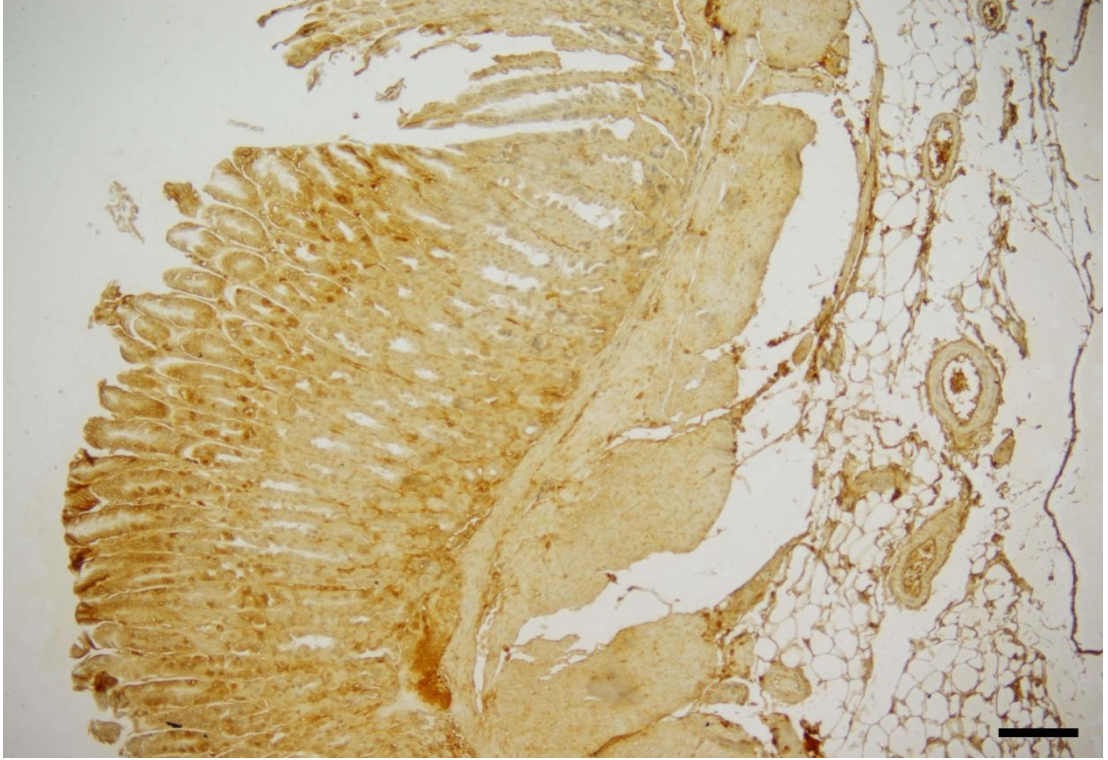
Resim 6. Deneme gurubu, fundus bölgesi (30. Gün). **mm:** muskuler mukoza **F:** Fundus H&E. Bar: 200µm

3.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

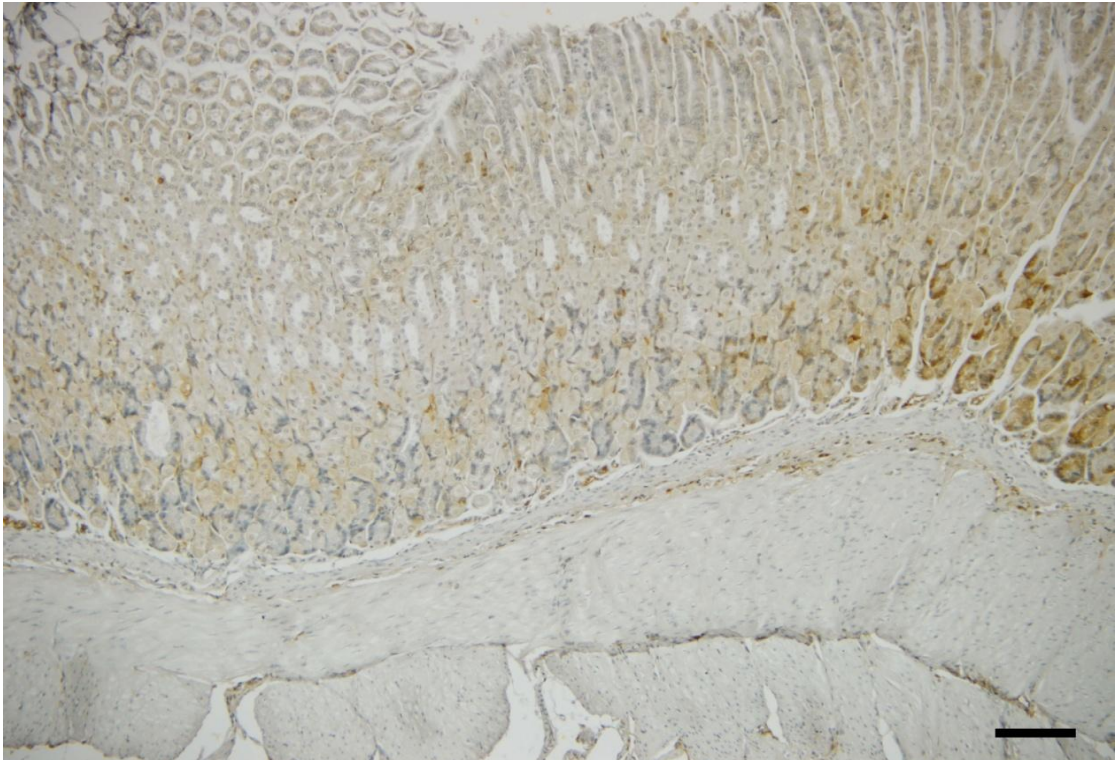
Grumlardan 3, 15 ve 30. günlerde alınan mide dokusunun kesitleri fundus bölgesi HGF immunoreaktivitesi yönünden incelendi. HGF immunoreaktivitesinin ışık mikroskopuyla yapılan incelemede kontrol (**Resim 7**), sham (**Resim 8**) ve deneme (**Resim 9**) gruplarında spesifik olduğu belirlendi.



Resim 7. Kontrol grubu farelerde HGF immunoreaktivitesinin fundus bölgesindeki dağılımı (30. Gün). Bar:200µm

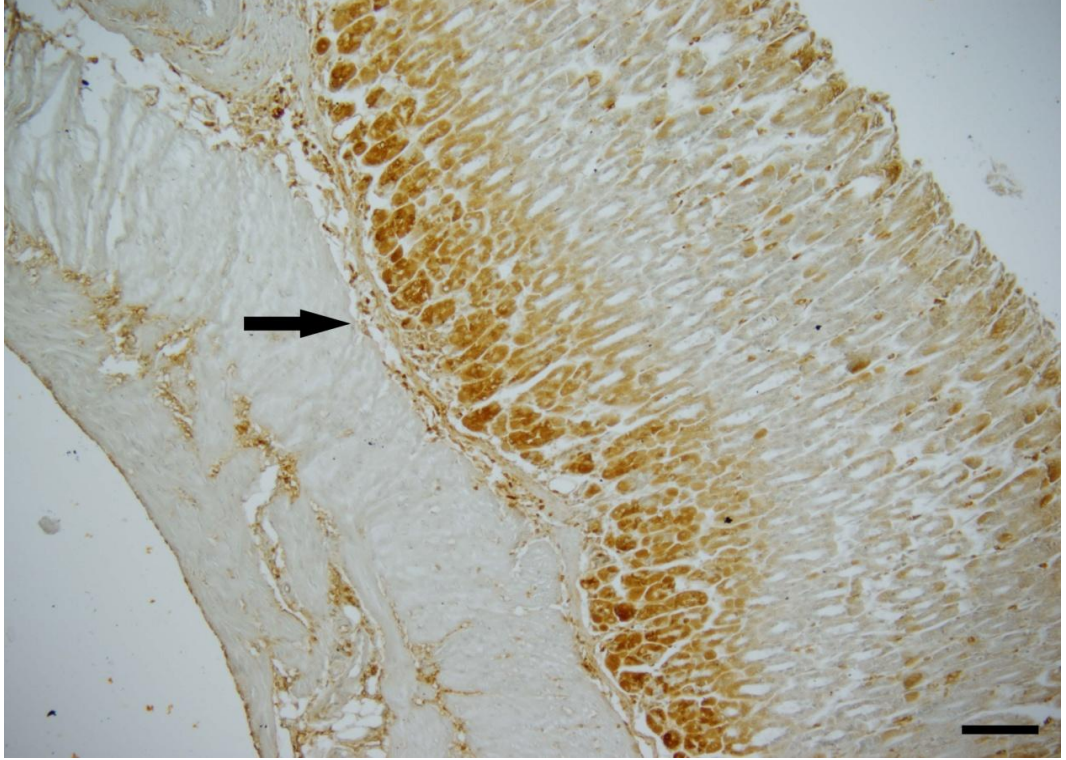


Resim 8. Sham grubu farelerde HGF immunoreaktivitesinin fundus bölgesindeki dağılımı (3. Gün). Bar: 200 μ m



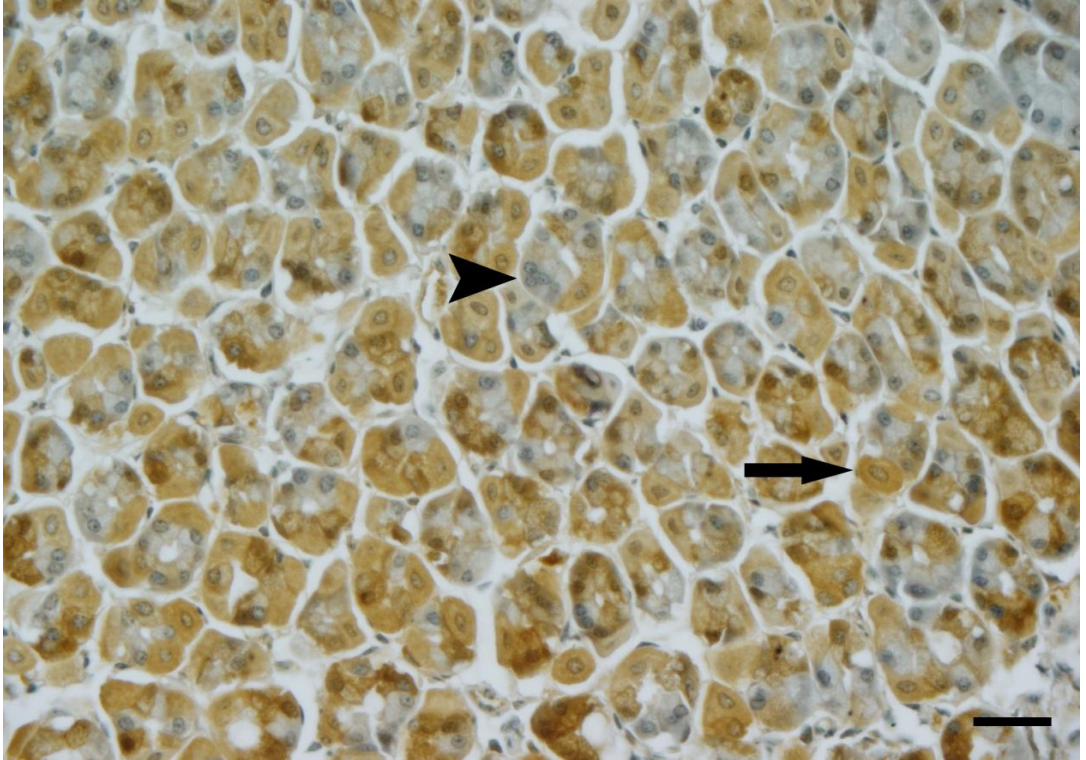
Resim 9. Deneme grubu farelerde HGF immunoreaktivitesinin fundus bölgesindeki dağılımı (30. Gün). Bar: 200 μ m

İmmunohistokimyasal incelemelerde deneme, kontrol ve sham gruplarında HGF'nin benzer alanlarda immunlokalizasyon gösterdiği belirlendi. HGF immunoreaktivitesinin, kriptlerin bulunduğu propria katmanında ve özellikle de kriptlerin çevrelediği taban bölgedeki bağ dokuda yoğun olduğu gözlemlendi. Gevşek bağ dokudan oluşan submukoza katmanındaki bağ doku hücrelerinin genelinde, sirküler ve longitudinal seyirli kas tabakalarının ara bölgesindeki bağ dokuda yer yer HGF immunoreaktivitesi olduğu belirlendi (**Resim 10**). Endotel hücrelerde ve bağ doku alanlarındaki HGF immunoreaktivitesi benzer düzeyde görüldü (**Tablo 7**). HGF immunoreaktivitesinin gruplar içerisinde günlere göre benzer olduğu tespit edildi.

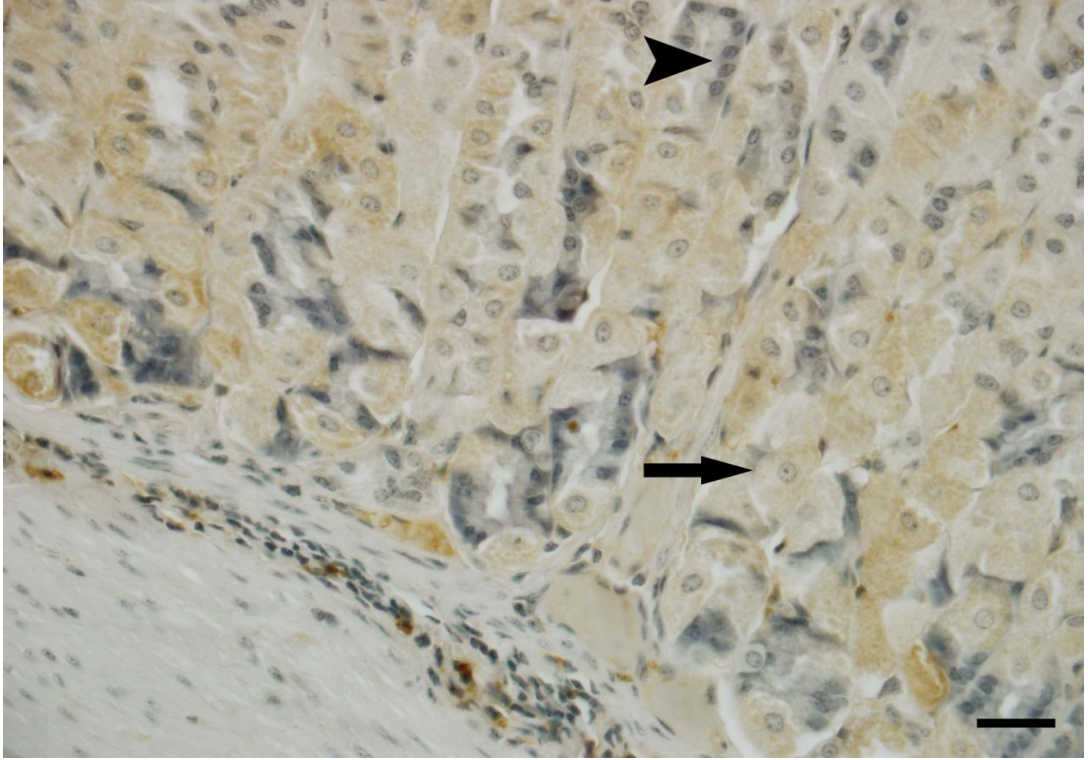


Resim 10. Kontrol grubu, Lamina propriyada yoğun HGF immunoreaktivitesi (30. Gün).
Ok: Lamina propriya katmanı Bar:200µm

Prensipal hücrelerde bölgesel olarak az sayıda HGF immunoreaktivitesi gözlenirken pariyetal hücrelerde ise HGF immunoreaktivitesi değişik düzeylerde ancak bütün hücrelerde olduğu belirlendi. Fundus bölgesinde pariyetal ve prensipal hücrelerde sitoplazmik ve nükleer tarzda HGF immunoreaktivitesi gözlemlendi. Fundusta bulunan pariyetal hücrelerde prensipal hücrelere göre daha yoğun immunoreaktivite görüldü. HGF immunoreaktivitesinin pariyetal ve prensipal hücrelerinde kontrol ve sham gruplarında benzer (**Resim 11**), deneme grubunda ise az yoğun olduğu gözlemlendi (**Resim 12**). Bu immunoreaktivitelerin günler içerisinde bir fark olmadığı bulundu.

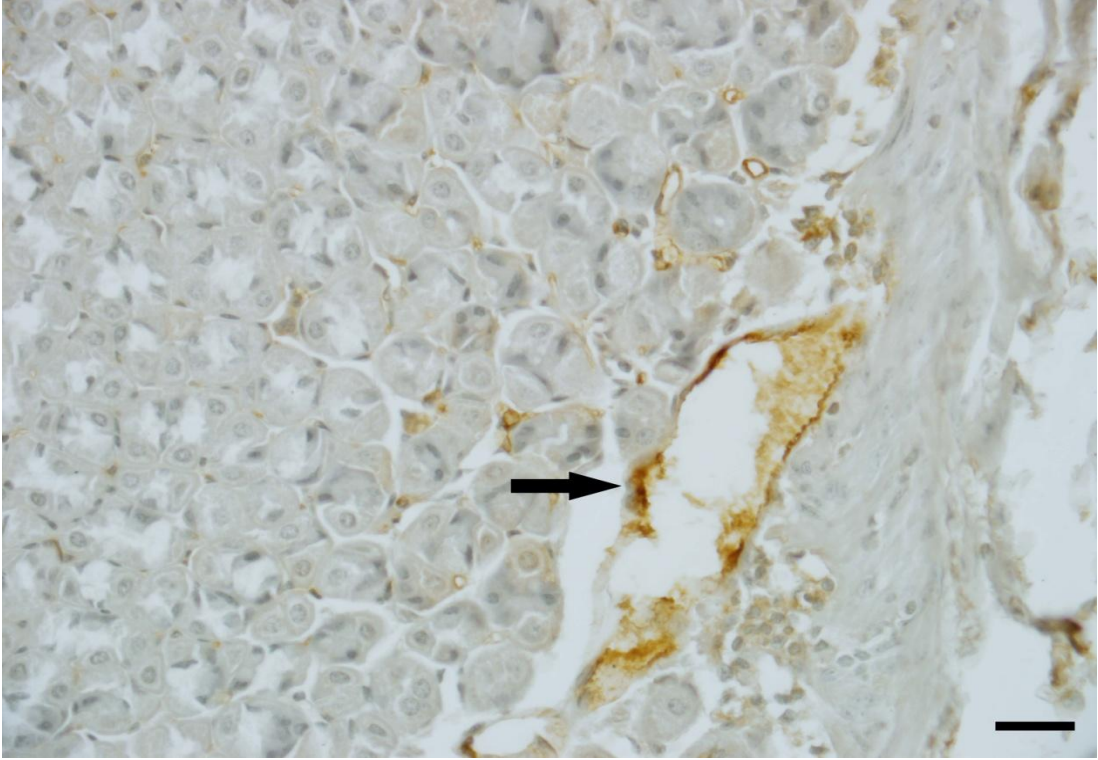


Resim 11. Kontrol grubu fundus bölgesi immunoreaktivitesi (30. Gün). **Ok:** Pariyetal hücre **Okbaşı:** Prensipal hücreler Bar:50µm

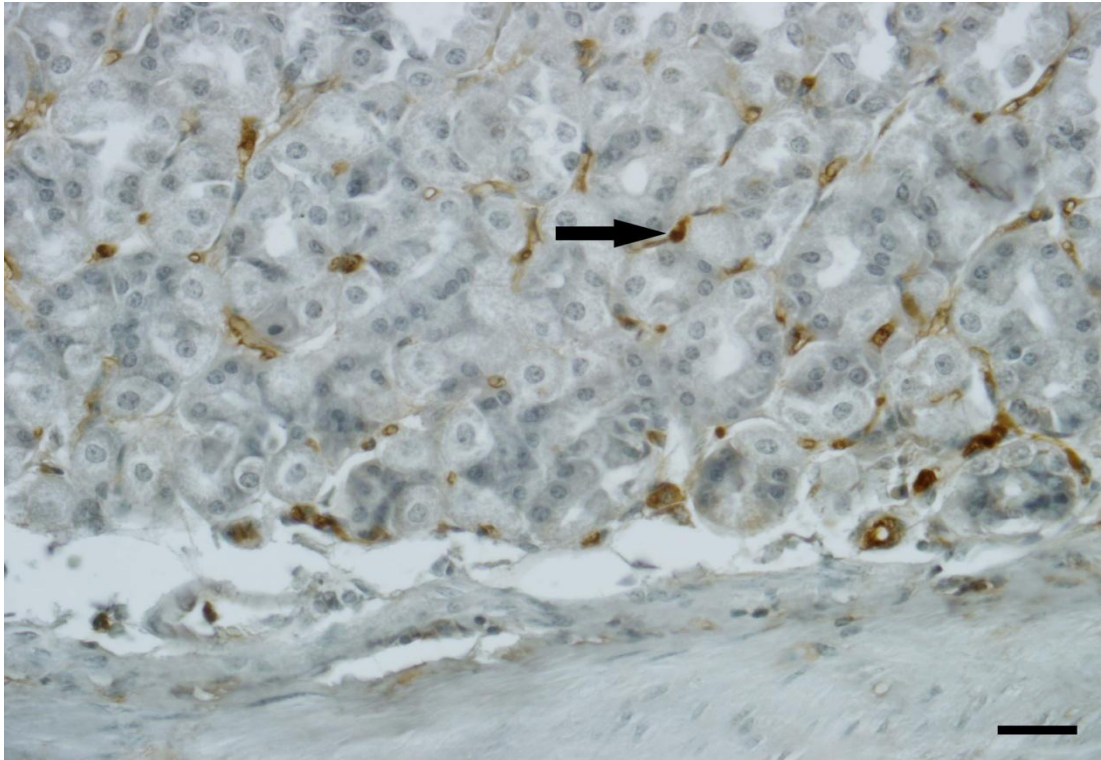


Resim 12. Deneme grubu HGF immunoreaktivitesi (30. Gün). **Ok:** Pariyetal hücre
Okbaşı: Prensipal hücreler Bar:50 μ m

Ayrıca bu alandaki kan damarı endotelinde de immunoreaktivite tespit edildi (**Resim 13**). Bunlara ilaveten kripleri oluşturan hücreler arasında fibroblast olduğu düşünülen yer yer HGF pozitif hücreler tespit edildi (**Resim 14**).

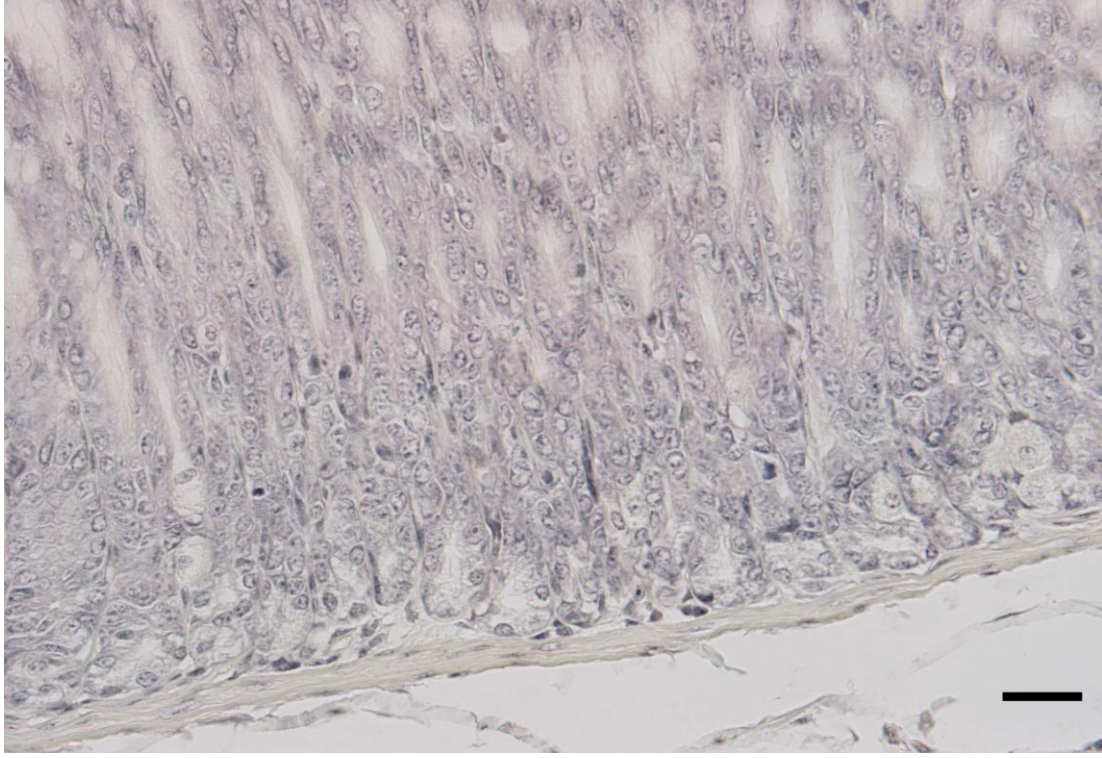


Resim 13. Deneme grubu, Kan damarı endotelinde HGF immunoreaktivitesi(3. Gün).
Ok: Endotel hücresi Bar:50µm



Resim 14.Deneme gurubu, Kriptler arası bölgede HGF pozitif hücreler (3. Gün).
Ok: Bağ doku hücresi Bar:50µm

Diabetik ve diğer gruplardaki farelerde HGF immunoreaktivitesinin spesifik olup olmadığını belirlemek için negatif boyama yapıldı (**Resim 15**).



Resim 15. Negatif boyama. Bar:50µm

İmmunoreaktivite Alanları	Kontrol 3, 15, 30. gün	Sham 3, 15, 30. gün	Deneme 3, 15, 30. gün
Bağdoku Alanları	+++	+++	+++
Pariyetal Hücreler	+++	+++	+
Prensipal Hücreler	+	+	-
Endotel Hücreleri	++	+++	+++

Tablo 7. Gruplar içerisinde HGF immunoreaktivitesinin derecelendirme sonuçları
 -= İmmunoreaktivite yok += Az yoğun, += Orta derecede yoğun, +++= Çok yoğun,

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda STZ ile diabet oluşturduğumuz farelerin; canlı ağırlık, fundustaki histolojik değişiklikler ve mide dokusunun fundus bölgesindeki Hepatosit büyüme faktörü (HGF)'nin immunohistokimyasal lokalizasyonu incelendi.

Çalışmamızda swiss albino farelere, birçok çalışmaya (Kanitkar ve Bhonde 2004, Yang ve Wright 2002) paralel olarak 100 mg/kg (ip) STZ uygulaması ile farelerde diabet oluşturuldu ve 200 mg/dl'nin üzerinde kan glikoz düzeyi olanlar diabetli olarak kabul edildi.

Imaeda ve ark. (2002), farelerde yaptıkları çalışmada diabetin canlı ağırlıkta kayıplara neden olduğunu ve canlı ağırlık kaybını deneyin 7. Gününde belirlediklerini bildirmişlerdir. Öte yandan STZ'yi 5 gün boyunca intraperitoneal yolla 55 mg/kg uygulayan Shih ve arkadaşları (2014), yaptıkları çalışmada başlangıçta benzer ağırlıklara sahip farelerde diabet oluşturulduktan sonra farelerin vücut ağırlıklarında önemli bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. Grover ve ark. (2001), streptozotosin ile diabet oluşturdukları farelerin vücut ağırlıklarında kontrol grubuna göre önemli bir fark tespit etmediklerini belirtmişlerdir. Ancak diabet çalışan Han ve arkadaşlarının (2014) yaptıkları çalışmada, normal grup ile diabetik grup arasında vücut ağırlığı bakımından önemli bir fark tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Yaptığımız 4 haftalık deney sonucunda streptozotosin ile diabet oluşturduğumuz farelerde vücut ağırlığı bakımından birçok çalışmaya paralel olarak diabet oluşturulan farelerin canlı ağırlıklarının azaldığı tespit edilmiştir.

Diabetes mellitusun çok çeşitli patolojik durumlar gösterdiği ve uzun süreli diabetin gastrointestinal sisteme zarar verdiği belirtilmiştir (O'Reilly ve Long 1987, Takehara ve ark. 1997). Ayrıca kronik diabetli hastalarda, özellikle gastrik salınımın ve motilitenin azalması gastrointestinal fonksiyonlarda sık görülen önemli değişiklikler olarak bildirilmiştir (Lin ve ark. 1991, Baydoun ve Dunbar 1997). Gastrointestinal semptomların Diabetes Mellitusta oldukça yaygın olduğu ve genellikle otonomik nöropatiye

dayandırıldığı belirtilmiştir (Feldman ve Schiller 1983, Weber ve Ryan 1998). Diabet komplikasyonlarının patofizyolojisinin hala tam olarak anlaşılamadığını bildiren Bastaki ve arkadaşları (2010), STZ ile oluşturulan ratların pariyetal hücrelerinde meydana gelen morfolojik değişimlerin olup olmadığını çok az çalışmada gösterildiğini belirtmişlerdir. Bastaki ve arkadaşlarının (2010) streptozotosin ile oluşturulan uzun süreli (6 ay) diabetik ratların mide dokularındaki ve pariyetal hücrelerindeki morfolojik değişimlerini inceledikleri çalışmalarında, normal ratlara göre diabetik ratlardaki pariyetal hücrelerin düzensiz dağılım gösterdiğini ve ayrıca diabetik ratların normal ratlara göre pariyetal hücrelerindeki asit salgısının azaldığını belirtmişlerdir. Aynı çalışmada gastrointestinal sistemde oluşan zararlı etkilerin uzun süreli diabet oluşumuna bağlı olabileceğide belirtilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada ise farelerin fundusunda gruplar arasında histolojik açıdan herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir.

Sindirim sistemi dokularında HGF esas olarak submukozada stromal hücrelerden salgılanır (Nakamura ve Mizuno 2010). Kermorgant ve arkadaşları (1997), 7-24 haftalık fütüslerin sindirim sistemi dokularında yaptıkları çalışmada immunoblot analiz yöntemi kullanarak HGF ve c-met'in m-RNA'larının ve proteinlerin karaciğer, pankreas, özofagus, mide ve büyük ve küçük barsaklarda tespit ettiklerini bildirmişlerdir ve diğer sindirim sistemi dokularının yanı sıra midenin morfolojik gelişimini kontrol altında tuttuğunu belirtmişlerdir. Aynı şekilde Matsubara ve arkadaşları (1998)'nin fetal dönemdeki ratların sindirim sistemini inceledikleri çalışmada bölgesel HGF sentezinin sindirim sistemi organları boyunca morfojen olarak hareket ettiğini bildirmişlerdir.

Sindirim sistemindeki organlarda mukozal membran daima yiyeceklerin emilimi ve sindirimi sırasında kimyasal ve mekaniksel strese maruz kalır. Bu yüzden etkilenen mukoza epitel hücrelerinin hareket yolu ile hızlıca onarılması gerekmektedir. Yapılan araştırmalarda eksojen HGF'nin gastrik yaraların iyileştirilmesini hızlandırdığı belirtilmiştir (Schmassmann ve ark. 1997, Nakahira ve ark. 2006). Buna göre, gastrik mukozadaki IgG anti-HGF aracılığı ile c-met aktivasyonunu engelleyerek mukozal epitel

hücrelerinin katları boyunca hareketini ve proliferasyonunu baskıladığı bildirilmiştir (Nakahira ve ark. 2006). Başka bir çalışmada ise ülseratif kolit oluşturulmuş deneysel rat modellerinde ekzogen rekombinant HGF'nin kolon mukozasının iyileşmesini hızlandırdığı belirtilmiştir (Tahara ve ark. 2003).

Diabetes Mellitus'un, mide dokusu ve gastrointestinal sistemde çeşitli nöromusküler anormalliklere neden olabildiği bildirilmiştir (Shen ve Soffer 2000). Koch (1999) yaptığı çalışmada Diabetes Mellitus'lu hastalarda gastrik disritmiler, antral dilatasyon ve antral hipomotilite gibi çeşitli motilite bozukluklarının meydana gelebileceğini belirtmiştir. Bu motilite değişimleri midenin boşalımında gecikmeye neden olabilir ve diabette görülen bu mide boşalımının gecikmesi 'Diabetik gastroparezi' olarak bilinmektedir (Hasler 1998). Çalışmamızda ise diabetik gastroparezi olgusu gözlemlenmemiştir. Bunun sebebinin ise deney sürecinin kısalığı, hayvan modeli veya yöntemden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Özefagiyal, gastrik ve kolorektal kanserli hastalarda plazma HGF düzeyinin arttığı, HGF düzeyi ile hastalığın ilerlemesi arasında korelasyon bulunduğu bildirilmiştir (Tahara ve ark. 1993). Takahashi ve arkadaşlarının (1995) gastrik ülserli tavşanlarda yaptıkları immunohistokimyasal çalışmada epitel hücrelerinin altına yerleşmiş iğ biçimli hücrelerin güçlü anti-HGF immunoreaktivitesi verdiğini ve bu hücrelerde HGF proteini varlığını gösterdiklerini, HGF immunoreaktivitesinin normal dokularda güçlü olmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca HGF m-RNA'sının gastrik epitel hücrelerinde değil gastrik fibroblastlarda ekspre edildiğini ve HGF'nin mezenşimal dokularda lokalize olduğunu özellikle fibroblastlarda bulunduğunu açıklamışlardır. Bu bulguların gastrik ülser tedavisinde HGF'nin parakrin faktör olarak rol oynadığını desteklediğini ve HGF'nin epitel hücrelerinin iyileşmesi sürecinde önemli rol oynayabileceğini belirtmişlerdir (Takahashi ve ark. 1995). Yapılan literatür taramaları sonucunda Takahashi ve arkadaşlarının (1995) yaptıkları çalışmada midede bulunan fibroblastlarda belirlediği immunoreaktivite dışında, HGF'nin fundus bölgesinin diğer hücre ve yapılarında immunoreaktivitesi bulunduğunu bildiren çalışmaya

rastlanmadı. Çalışmamızda da Takahashi ve arkadaşlarının (1995) fibroblastlarda belirlediği benzer şekilde HGF immunoreaktivitesi bulundu.

Ayrıca yapılan literatür taramalarında (Grant ve ark. 1993, Ono ve ark. 1997, Mizuno ve Nakamura 2005), değişik dokularda damarı endotel hücrelerinde HGF'nin yoğun immunoreaktivitesi belirlendiği bildirilmiştir. Çalışmamızda da bu araştırmalara paralel olarak kontrol ve sham grupları ile deneme grubu karşılaştırıldığında her üç grupta da endotel hücrelerinde yoğun HGF immunoreaktivitesi belirlendi. Bu bulguların dışında bizim çalışmamızda, pariyetal hücrelerde değişik yoğunluklarda, prensipal hücrelerde ise az yoğun düzeyde yer yer HGF immunoreaktivitesinin olduğu belirlendi. Ayrıca üç grupta da fundus bölgesi bağ doku alanlarında HGF immunoreaktivitesi gösteren bağ doku hücreleri tespit edildi. Diabetik farelerde diğer gruplara kıyasla pariyetal hücrelerde az yoğun HGF immunoreaktivitesi görüldü. Prensipal hücrelerde ise kontrol ve sham grubunda yer yer immunoreaktivite belirlenirken, deneme grubunda HGF immunoreaktivitesinin olmadığı belirlendi.

Yapılan çalışmalarda diabetin fundus bölgesindeki pariyetal hücrelerde düzensiz dağılıma yol açtığı bildirilmiştir (Bastaki ve ark. 2010). Çalışmamızda ise diabetin pariyetal hücrelerde HGF immunoreaktivitesini düşürdüğü belirlendi. Pariyetal hücrelere Diabetes Mellitus'un doğrudan etkisinin olduğu da diğer çalışmaya paralel olarak belirlenmiştir. Bu bulguların sonucunda çalışmamız, diabetin mide dokusunun fundus bölgesinde HGF immunoreaktivitesini olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda immunohistokimyasal incelemeler sonucu HGF immunoreaktivitesinin diabet grubunda pariyetal hücrelerde az yoğun olduğu görüldü. Prensipal hücrelerde immunoreaktivitenin kontrol ve sham gruplarında az yoğun olduğu, diabet grubunda ise olmadığı görüldü. Prensipal ve pariyetal hücrelerde belirlediğimiz HGF immunoreaktivitesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlamadığımız için bu konunun daha ayrıntılı incelenmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Ayrıca prensipal ve pariyetal hücrelerde diabette HGF immunoreaktivitesinin düşük olması da daha ayrıntılı inceleme gerektirmektedir. Çalışmamız, HGF'nin fundusta çeşitli hücre ve

yapılarda önemli fonksiyonlarının olduğunu düşündürmektedir. HGF immunoreaktivitesinin diabetik farelerde azalmış olması, HGF'nin hücre rejenerasyonunda etkili olması düşünüldüğünde, diabetin dolaylı olarak fundusdaki hücre yenilenmesini olumsuz yönde etkileyebileceğini düşündürmektedir. HGF, diabet ve midenin fundus bölgesinin ilişkisini açıklayan immunohistokimyasal bir araştırmaya rastlanmadığı için yaptığımız çalışmanın bu ilişkiyi açıklamasına yardımcı olacağını ve bu alanda yapılacak yeni çalışmalara yardımcı olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

Aktürk M, Olcay I, Karaahmetoğlu S, Berk F. Diabetes Mellitus ve Akciğer. Toraks Dergisi. 3: 217-219. 2002

Alemzadeh R, Wyatt DT. Diabetes Mellitus. In: Behrman R.E, Kliegman R.M, Jenson H.B (eds). Nelson Textbook of Pediatrics. 17 edition. Pennsylvania: Elsevier Saunders; p.1947-72, 2004.

American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Care. 27: 5-10, 2004.

Bağrıaık N. Diabetes Mellitus: Tanımı, Tarihesi, Sınıflaması ve Sıklığı 9-18, 1997.

Baydoun R, Dunbar JC. Impaired insulin but normal pentagastrin effect on gastric acid secretion in diabetic rats: a role for nitric oxide. Diabetes Res Clin Pract, 38: 1-8, 1997.

Bevelander G. Essentials of Histology (7th ed.) the C. V Mosby Compan, Saint Louis, pp:178-184, 1974.

Birchmeier A, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 4-12: 915-25, 2003.

Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, Aaronson SA. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met protooncogene product. Science, 251:802-804, 1991.

Börset M, Hansen HH, Seidel C, Sundan A, Waage A. Hepatocyte growth factor and its receptor c-met in multiple myeloma. Blood, 88: 3998 1996.

Brown GL, Curtsinger L, Jurkewics MJ, Nahai F, Schultz G. Stimulation of Healing of Chronic Wounds by Epidermal Growth Factor. Plast Reconst Surg. 88: 189-196, 1991.

Bussolino E, Di Renzo ME, Ziche M, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffer A Comoglio PM. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. J. Cell Biol. 119: 629-641, 1992.

Canton A, Burgos R, Hernandez C, Mateo C, Segura RM, Mesa J, Simo R.: Hepatocyte growth factor in vitreous and serum from patients with proliferative diabetic retinopathy. Br J Ophthalmol. 84: 732-735, 2000.

Catchpole B, Ristic JM, Fleeman LM, Davison LJ. Canine Diabetes Mellitus: can Old Dogs Teach us New Tricks? Diabetologia. 48 (10): 1948-1956, 2005.

Cormack DH. Clinically Integrated Histology, Lippincott-Raven, New York, pp:192-196, 1998.

Dai C, Li Y, Yang J, Liu Y. Hepatocyte growth factor preserves beta cells mass and mitigates hyperglycemia in streptozotocin induced diabetic mice. J. Biol. Chem. 278, 27080-27087, 2003.

Dai C, Yang J, Bastacky S, Xia J, Li Y, Liu Y.: Intravenous administration of hepatocyte growth factor gene ameliorates diabetic nephropathy in mice. 15(10): 2637-45, 2004.

Feldman M, Schiller LR. Disorders of gastrointestinal motility associated with diabetes mellitus. Ann Intern Med, 98: 378-384, 1983.

Fiallo-Scharer R, Eisenbarth GS. Patophysiology of insulin-Dependent Diabetes. In: Pescovitz O.H, Eugster E.A (eds). Pediatric Endocrinology. 1 edition. Philadelphia (USA): Lippincott Williams and Wilkins. p.411-26, 2004.

Funakoshi H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications. Clinica Chimica Acta, 327: 1-23, 2003.

Gherardi E, Stoker M. Hepatocyte growth factor--scatter factor: mitogen, motogen and met. Cancer Cells. 3: 227-232, 1991.

Grant DS, Kleinman HK, Goldberg ID, Bhargava MM, Nickoloff BJ, Kinsella JL, Polverini P, Rosen EM. Scatter factor induces blood vessel formation in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci USA Vol. 90: 1937-1941, 1993.

Grover JK, Vats V, Rahi SS, Dawar R. Traditional Indian ant-diabetic plants attenuate progression of renal damage in streptozotocin induced diabetic mice. J Ethnopharmacol 76: 233-8, 2001.

Gülmez N, Yörük M. Sindirim Sistemi, Sindirim Kanalı. **İçinde:** Özer A: Veteriner Özel Histoloji, 1. Basım, Nobel Yayın Dağıtım, p. 151-181, 2008.

Han Z, Cao J, Song D, Tian L, Chen K, Wang Y, Gao L, Yin Z, Fan Y, Wang C. Autophagy is involved in the cardioprotection effect of remote limb ischemic postconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury in normal mice, not diabetic mice. Vol. 9. Plos one. 2014.

Hasler WL. Disorders of Gastric emptying. In: Yamada T, Editor. Textbook of Gastroenterology. Chapter 63. Disorders of gastric emptying. Third edition. New York, Lippincott William and Wilkins. 1341-1348, 1998.

Heller B, Bürkle A, Radons J, Fengler E, Jalowy A, Müller M, Burkart V, Kolb H.: Analysis of oxygen radical toxicity in pancreatic islets at the single cell level. Biol Chem Hoppe Seyler. 375: 597-602, 1994.

Hernandez J, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Characterization of the effects of human placental HGF on rat hepatocytes. J Cell Physiol. 150(1):116-121, 1992.

Hsu SM, Raine L, Fanger H.: Use of avidin- biotin- peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. Journal Histochemistry & Cytochemistry. 29: 577-580, 1981.

<http://tr.wikipedia.org/wiki/Diyabet> Erişim tarihi: 11 Temmuz 2014.

Imaeda A, Kaneko T, Aoki T, Kondo Y, Nagase H.: DNA damage and the effect of antioxidants in streptozotocin- treated mice. Food and Chemical Toxicology. 40: 979-987, 2002.

International Diabetes Federation, World Diabetes Foundation. Diabetes Atlas. 2nd Edition, Brussels, International Diabetes Federation, 2003.

Ito M, Harada T, Tanikawa M, Fujii A, Shiota G, Terakawa N. Hepatocyte growth factor and stem cell factor involvement in paracrine interplays of theca and granulosa cells in the human ovary. *Fertil Steril*. 75: 973-979, 2001.

Jucker M, Gunther A, Gradl G, Fonatsch C, Krueger G, Diehl V, Tesch H. The met/hepatocyte growth factor receptor (HGFR) gene is overexpressed in some cases of human leukemia and lymphoma. *Leuk Res*. 18: 7-16, 1994.

Junquiera LC, Corneiro J, Keley RO, Basic Histology (7th ed.) Ed. AYTEKIN Y. , Barış Kitabevi İstanbul. s: 346-356, 1993.

Kanitkar M, Bhonde R.: Existence of islet regenerating factors within the pancreas. *Rev Diabet Stud*. 1: 185-92, 2004.

Kumar V, Abbas AK, Aster J.: Chapter 3: Tissue Renewal, Repair and Regeneration, Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease 8th Edition, 88-89, 2009.

Kermorgant S, Walker F, Hormi K, Dessirier V, Lewin MJ, Lehy T. Developmental expression and functionality of hepatocyte growth factor and c-Met in human fetal digestive tissues. *Gastroenterology*, 112(5):1635-47, 1997.

Koch KL. Diabetic gastropathy: gastric neuromuscular dysfunction in diabetes mellitus: a review of symptoms, pathophysiology, and treatment. *Dig Dis Sci*. Jun; 44: 1061-75, 1999.

Komamura K, Miyazaki JD, Imai E, Matsumoto K, Nakamura T, Hori M. Hepatocyte Growth Factor Gene Therapy for Hypertension. In: Li S., editor. *Electroporation Protocols: Preclinical and Clinical Gene Medicine. From Methods in Molecular Biology*, New Jersey:Humana Pres. 423: 393- 404, 2008.

Kulseng B, Borset M, Espevik T, Sundan A. Elevated hepatocyte growth factor in sera from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Acta Diabetol*. 35: 77–80, 1998.

Kuzuya T, Nakagawa S, Satoh J, Kanazawa Y, Iwamoto Y, Kobayashi M, Nanjo K, Sasaki A, Seino Y, Ito C, Shima K, Nonaka K, Kadowaki T. Report of Committee on Clasification and Diagnostic Criteria of Diabetes Mellitus. *Diabetes Res Pract* Jan. 55 (1): 65-85, 2002.

Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: A new model of diabetes mellitus. *Science*. 193: 415-17, 1976.

Lin CY, Anders J, Johnson M, Sang QA, Dickson RB. Molecular cloning of cDNA for matriptase, a matrix-degrading serine protease with trypsin-like activity. *J. Biol. Chem* 274, 18231-18236, 1999.

Lin CY, Yeh GH, Hsu FC, Tsai SC, Lau CP, Pu HF, Yu HL, Tung YF, Wang PS. Gastric acid secretion in streptozotocin-diabetic female rats. *Clin J Physiol*, 34: 179-186, 1991.

Lindroos PM, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Hepatic growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. *Hepatology*. 13: 743-750, 1991.

Luna LG.: *Manual of histologic staining methods of armed forces institute of pathology*. Third Ed. Mc Graw-Hill Book Comp. London. 1968.

Matsubara Y, Ichinose M, Yahagi N, Tsukada S, Oka M, Miki K, Kimura S, Omata M, Shiokawa K, Kitamura N, Kaneko Y, Fukamachi H. Hepatocyte Growth Factor Activator: A Possible Regulator of Morphogenesis during Fetal Development of the Rat Gastrointestinal Tract. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 253: 477-484, 1998.

Matsumata K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: molecular structure, roles in liver regeneration, and other biological functions. *Crit. Rev. Oncog.* 3, 27-54, 1992.

Matsumoto K, Nakamura T. In: Goldberg ID, Rosen EM. *Hepatocyte growth factor - scatter factor and c-Met receptor*. Birkhauser: Basel, Switzerland, 225–249, 1993.

Miyazawa K, Shimomura T, Kitamura N. Activation of hepatocyte growth factor in the injured tissues is mediated by hepatocyte growth factor activator. *J. Biol. Chem.* 271, 3615-3618, 1996.

Miyazawa K, Shimomura T, Naka D, Kitamura N. Proteolytic activation of hepatocyte growth factor in response to tissue injury. *J. Biol. Chem.* 269, 8966-8970, 1994.

Mizuno S, Nakamura T. Prevention of Neutrophil Extravasation by Hepatocyte Growth Factor Leads to Attenuations of Tubular Apoptosis and Renal Dysfunction in Mouse Ischemic Kidneys. *Vas Bio Ath and End. Bio.* Vol.166: 1895-1905, 2005.

Mizuno S, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: a regenerative drug for acute hepatitis and liver cirrhosis. *Regen. Med.* 2, 161-170, 2007.

Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T. HGF as a renotrophic and anti-fibrotic regulator in chronic renal disease. *Front. Biosci.* 13, 7072-7086, 2008.

Morishita R, Moriguchi A, Higaki J, Ogihara T. Hepatocyte growth factor (HGF) as a potential index of severity of hypertension. *Hypertens Res.*, 22:161–7, 1999.

Morishita R, Aoki M, Yo Y, Ogihara T. Hepatocyte growth factor as a cardiovascular hormone: role of HGF in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Endocr J.* 49: 273-284, 2002.

Morishita R, Nakamura S, Nakamura Y, Aoki M, Atsushi M, Kida I, Yo Y, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogihara T. Potential role of an endothelium-specific growth factor, hepatocyte growth factor, on endothelial damage in diabetes. *Diabetes.* 46: 138-142, 1997.

Nakagami H, Kaneda Y, Ogihara T, Morishita R. Endothelial dysfunction in hyperglycemia as a trigger of atherosclerosis. *Current Diabetes Reviews.* 1: 59-63, 2005.

Nakahira R, Mizuno S, Yoshimine T, Nakamura T. The loss of local HGF, an endogenous gastrotrophic factor, leads to mucosal injuries in the stomach of mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341, 897-903, 2006.

Nakamura S, Morishita R, Moriguchi A, Yo Y, Nakamura Y, Hayashi S-i, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogihara T. Hepatocyte growth factor as a potential index of complication in diabetes mellitus. *Hypertens.* 16: 2019-2026, 1998.

Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 122: 1450-1459, 1984.

Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature.* 342:440-443, 1989.

Nakamura T. Structure and function of hepatocyte growth factor. *Prog. Growth Factor Res.* 3, 67-85, 1991.

Nakamura T, Mizuno S. The discovery of Hepatocyte Growth Factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 86: 588-609, 2010.

Nakamura Y, Morishita R, Higaki J, Kida I, Aoki M, Moriguchi A, Yamada K, Hayashi SI, Yo Y, Matsumoto K, Nakamura T, Ogihara T. Expression of local hepatocyte growth factor system in vascular tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 215: 483-488, 1995.

Naldini L, Weidner KM, Vigna E, Gaudino G, Bardelli H, Ponzetto C, Narsimhan RP, Hartmann G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, Birchmeier W, Comoglio PM. Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J.* 10: 2867-2878, 1991.

Naldini L, Tamagnone L and Vigna E. Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J.* 11, 4825-4833, 1992.

Nishimura M, Nakano K, Ushiyama M, Nanbu A, Ohtsuka K, Takahashi H, Yoshimura M. Increased serum concentrations of human hepatocyte growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *J Clin Endocrinol Metab.* 83: 195-198, 1998.

Nishimura M, Ushiyama M, Ohtsuka K, Nishida M, Inoue N, Matsumuro A, Mineo T, Yoshimura M. Serum Hepatocyte Growth Factor as a Possible Indicator of Vascular Lesions. *J Clin Endocrinol Metab.* 84: 2475-2480, 1999.

Nishio A, Keefe EB, Gershwin ME. Immunopathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis.* 22: 291-302, 2002.

Nohuchi O, Enomoto N, Ikeda T, Kobayashi F, Marumo F, Sato C. Gene expressions of c-met and hepatocyte growth factor in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.*, 24:286-292, 1996.

Noji S, Tashiro K, Koyama E, Nohno T, Ohyama K, Taniguchi S, Nakamura T. Expression of hepatocyte growth factor gene in endothelial and Kupffer cells of damaged rat livers, as revealed by in situ hybridization. *Biochem Biophys Res Commun.* 173: 42-47, 1990.

Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. Enhanced Expression of Hepatocyte Growth Factor/c-Met by Myocardial Ischemia and Reperfusion in a Rat Model. *Am. Heart Ass.* 95: 2552-2558, 1997.

O'Reilly D, Long RG. Diabetes and the gastrointestinal tract. *Dig. Dis. Sci.* 5: 57-64, 1987.

Özkorkmaz EG, Özay Y. Yara iyileşmesi ve yara iyileşmesinde kullanılan bazı bitkiler. *Türk Bil. Der. Derg.* 2(2): 63-67, 2009.

Parrott JA, Skinner MK. Developmental and hormonal regulation of hepatocyte growth factor expression and action in the bovine ovarian follicle. *Biol Reprod.* 59: 553- 560, 1998.

Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV.: Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep.* 29: 91-8, 1963.

Rand JS, Fleeman LM, Farrow HA, Appleton DJ, Lederer R.: Canine and Feline Diabetes Mellitus Nature or Nurture, *J. Nutr.* 134: 2072-2080, 2004.

Reusch CE, Tschour F, Kley S, Boretti S, Sieber-Ruckstuhl N. Diabetes Mellitus in the Cat: A Review. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 148: 130-138, 2006.

Rice A, Chard T. 'Cytokines in Implantation' Cytokine and Growth Factor. *Rev.* 9 (3): 287-296, 1998.

Rubin JS, Chan AM, Bottaro DP, Burgess WH, Taylor WG, Cech AC, Hirschfield DW, Wang J, Miki T, Finch PW. A broad-spectrum human lung fibroblast-derived mitogen is a variant of hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 415-419, 1991.

Sakaguchi H, Seki S, Tsubouchi H, Daikuhara Y, Niitani Y, Kobayashi K. Ultrastructural location of human hepatocyte growth factor in human liver. *Hepatology*;19: 1157-63, 1994.

Schmassmann A, Stettler C, Poulsom R, Tarasova N, Hirschi C, Flogerzi B, Matsumoto K, Nakamura T, Halter F. Roles of hepatocyte growth factor and its receptor met during gastric ulcer healing in rats. *Gastroenterology* 113, 1858-1872, 1997.

Shen B, Soffer EE. Diabetic gastropathy: a practical approach to a vexing problem. *Cleve Clin J Med.* Sep; 67: 659-64, 2000.

Shih CC, Chen MH, Lin CH.: Validation of the antidiabetic and hypolipidemic effects of *Clitocybe nuda* by assessment of glucose transporter 4 and gluconeogenesis and AMPK phosphorylation in streptozotocin induced mice. Hindawi Publishing Corporation. 2014.

Shiota G, Okano JI, Kawasaki H, Kawamoto T, Nakamura T. Serum hepatocyte growth factor levels in liver diseases: Clinical implications. *Hepatology*, 21:106-12, 1995.

Shu S, Ju G, Fan L.: The glucose oxidase-dan-nickel in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neuroscience Lett.* 85: 169-171, 1988.

Steenfos HH. 'Growth Factors and Wound Healing'. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.* 28: 95-105, 1994.

Stracke S, Ernst F, Jehle DR, Grunewald RW, Haller H, Keller F, Jehle PM. Differentiating and proliferative effects of HGF in renal proximal tubular cells are mediated via different signaling pathway. *Nephrol Dial Transplant*, 13: 1398, 1998.

Sugimura K, Kim T, Goto T, Kasai S, Takemoto Y, Matsuda J, Yoshimoto M, Yamagami S, Kishimoto T. Serum hepatocyte growth factor levels in patients with chronic renal failure. *Nephron*, 70: 324– 8, 1995.

Tahara E, Kuniyasu H, Nakayama H, Yasui W, Yokozaki H. Metastasis related genes and malignancy in human esophageal, gastric and colorectal cancers. *Gan To Kagaku Ryoho*, 20: 326– 31, 1993.

Tahara Y, Ido A, Yamamoto S, et al. Hepatocyte growth factor facilitates colonic mucosal repair in experimental ulcerative colitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 307; 146-51, 2003.

Takehara K, Tashima K, Takeuchi K. Alterations in duodenal bicarbonate secretion and mucosal susceptibility to acid in diabetic rats. *Gastroenterology*, 112: 418-428, 1997

Takeshita F, Murai K, Iyama S, Ayukawa Y, Suetsugu T.: Uncontrolled diabetes hinders bone formation around titanium implants in rat tibia. A light and fluorescence microscopy, and image processing study. *J Periodontol*. 69: 314-320, 1998.

Tsubouchi H. Hepatocyte growth factor for liver disease. *Hepatology*, 30: 333-4, 1999.

Weber JR, Ryan JC. Effects on the gut of systemic disease and other extraintestinal conditions. In: Scharschmidt BF, Sleisinger MH, Feldman M (eds) *Gastrointestinal and liver disease*. WB Saunders Co, Philadelphia, pp: 413-416, 1998.

Xue F, Takahara T, Yata Y, Kuwabara Y, Shinno E, Nonome K, Minemura M, Takahara S, Li X, Yamato E, Watanabe A. Hepatocyte growth factor gene therapy accelerates regeneration in cirrhotic mouse livers after hepatectomy. *Gut*. 52: 594-700, 2003.

Vargas GA, Hoeflich A, Jehle PM. Hepatocyte growth factor in renal failure: Promise and reality. *Kidney Int*. 57:1426, 2000.

Yang H, Wright JR. Human β cells are exceedingly resistant to streptozotocin in vivo. *Endocrinology*. 143 (7): 2941-2945, 2002.

Yenigun M. Diabetes mellitus fizyopatolojisi in: Yenigun M, Altuntaş Y(eds): *Her Yonuyle Diabetes Mellitus*. Nobel Tıp kitabevi, İstanbul. (1):85-129, 2001.

Yoshiyama Y, Arakaki N, Naka D, Takahashi K, Hirono S, Kondo J, Nakayama H, Godha E, Kitamura N, Tsubouchi H, Ishii T, Hishida T, Daikuhara Y. Identification of the N-terminal residue of the heavy chain of both native and recombinant human hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 175:660-667, 1991.

You WK, McDonald DM. The hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway as a therapeutic target to inhibit angiogenesis. *BMB reports*, 41(12): 833-9, 2008.

Zarnegar R, Michalopoulos G. Purification and biological characterization of human hepatopietin A, a polypeptide growth factor for hepatocytes. *Cancer RES.* 49: 3314-3320, 1989.

Zhang YW, Vande Woude GF. HGF/SF-met signaling in the control of branching morphogenesis and invasion. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1; 88-2; 408-17, 2003.

Zioncheck TF, Richardson L, De Guzman GG, Modi NB, Hansen SE, Godowski PJ. The pharmacokinetics, tissue localization and netabolic processing of recombinant human hepatocyte growth factor after intravenous administration in rats. *Endocrinology.* 134:1879-87, 1994.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Amasya'da doğdum. İlköğretim, orta okul ve lise eğitimimi tamamladıktan sonra 2008 yılında Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü kazandım. Üniversite eğitimimi 2012'de bitirdikten sonra aynı yıl Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesinde Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladım.