



T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
ANATOMİ ANABİLİM DALI  
VAN-YLS-2014-0001

## YAŞLANMA VE TESTOSTERON'UN AORTA'DAKİ ANJİOGENİK ETKİSİ

Mehmet Utkan ÖREN

DANIŞMAN  
Prof. Dr. İlknur DABANOĞLU

AYDIN-2014

**T.C.**  
**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**  
**AYDIN**

Anatomi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Mehmet Utkan ÖREN tarafından hazırlanan “Yaşlanma ve Testosteron’un Aorta’daki Anjiogenetik Etkisi” başlıklı tez, 03/09/2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

**Ünvanı, Adı ve Soyadı :**

**Üniversitesi :**

**İmzası:**

1- Prof. Dr. İlknur DABANOĞLU

Adnan Menderes Üniversitesi

2-Prof. Dr. M. Erkut KARA

Adnan Menderes Üniversitesi

3- Prof. Dr. Şadiye KUM

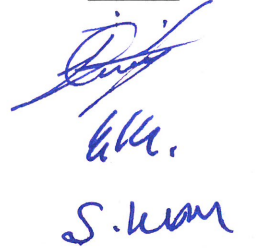
Adnan Menderes Üniversitesi

4- .....

.....

5- .....

.....



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans/Doktora Tezi Enstitü Yönetim Kurulunun..... Sayılı kararıyla ..... tarihinde onaylanmıştır.

Prof.Dr.Güzel DİŞÇİGİL

Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Anjiogenezisin vücutta oluşumun ve mekanizmasının bilinmesi, fizyolojik süreçte, tümörlü oluşumlarda, kanser oluşumu ve tedavilerinde, sinir sistemi hastalıkları/tedavilerinde ve daha farklı organ ve dokularda meydana gelebilecek birçok hastalıkta süreç ve tedavi şansının belirlenmesinde faydalı olabilecektir. Son zamanlarda teknoloji ve bilimin eş zamanlı gelişmesine bağlı olarak artık gen dizilimi ve belirlenmesi sayesinde tedavi olanakları gelişmektedir. Bu araştırma ile anjiogeneziste en karakteristik olan VEGF incelenmiş, yaşlılık ve testosteron hormonun etkileri aort üzerinde incelenmiştir. Ayrıca çalışmada dişi ve erkelerde cinsiyet açısından da testosteronun hormonunun etkileri karşılaştırılmıştır.

Yaşlanma ve testosteron hormonun aorta'daki anjiogenik etkisinin araştırıldığı bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi tarafından (VTF-12035) desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	i
ÖNSÖZ.....	ii
TABLolar DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
RESİMLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Kan Damarları.....	2
1.1.1 Arterler.....	3
1.1.1.1 Büyük tip arterler (elastik arterler) .....	4
1.1.1.2. Orta Tip Arterler (Müsküler Arterler) .....	4
1.1.1.3. Küçük Arterler .....	4
1.1.1.4. Arteriol .....	4
1.1.2. Venalar .....	4
1.1.3. Kapiller .....	5
1.2. Vaskülojenesis .....	6
1.3. Angiogenesis .....	7
1.3.1. Angiogenesis Çalışmalarının Tarihçesi .....	7
1.3.2. Angiogenesis'in Mekanizması .....	9
1.3.3. Önemli Angiogenik Faktörler ve Etkileri .....	11
1.3.3.1. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF) .....	11
1.3.3.2. Epidermal Büyüme Faktör (EGF) .....	12
1.3.3.3. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF) .....	12
1.3.3.4. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) .....	13
1.3.3.5. Anjiopöietinler .....	13
1.3.3.6. Matriks metalloproteinaz (MMPs) .....	14
1.3.3.7. Plazmin (PA) .....	14
1.3.3.8. İntegrinler .....	15
1.4. Farklı Süreçlerdeki Angiogenesis .....	15
1.4.1. Hormonlar ve Angiogenesiz .....	16
1.4.2. Yaşlanma ve Angiogenesiz .....	17
2. GEREÇ VE YÖNTEM .....	18

2.1. Hayvan Materyali ve Yetiştirilmesi .....	18
2.2. Hayvanların Gruplandırılması .....	18
2.3. Testosteron Hormonu Takviyesi .....	19
2.4. Operasyonların Yapılması .....	19
2.5. Dokuların Toplanması .....	20
2.6. Histolojik İncelemeler .....	20
2.7. Ölçümlerin Yapılması .....	21
2.8. Moleküler İncelemeler .....	21
2.8.1. Dokulardan RNA Ekstraksiyonu .....	21
2.8.2. RT PCR İle Angiogenik Faktörlerin Kantitatif Ölçümü .....	21
2.9. İstatistiksel Analiz .....	22
3.BULGULAR .....	23
3.1. Testosteron Seviyesi.....	23
3.2. Histolojik Veriler.....	26
3.2.1. Aorta Thoracica'daki İntima Kalınlığı.....	26
3.2.2. Aorta Thoracica'daki Media Kalınlığı.....	28
3.2.3. Aorta Thoracica'daki Adventisya Kalınlığı.....	30
3.2.4. Aorta Thoracica'nın Çapı.....	31
3.3. RT-PCR verileri.....	33
4.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	38
ÖZET.....	45
SUMMARY.....	46
KAYNAKLAR.....	47
TEŞEKKÜR.....	54

## TABLolar DİZİNİ

	SAYFA
<b>Tablo 1.</b> Angiogeneziste Görev Alan Önemli Moleküller.....	11
<b>Tablo 2.</b> Angiogenezisiİnhibe Eden Bazı Endojen İnhibitörler.....	15
<b>Tablo 3.</b> Hayvanların Gruplandırılması ve Yapılan Uygulamalar.....	18
<b>Tablo 4.</b> RT PCR İçin Kullanılacak Primerler.....	22
<b>Tablo 5.</b> Erkek ve dişi hayvan gruplarındaki testosteron sevipleri.....	23
<b>Tablo 6.</b> Erkek ve dişi hayvan gruplarının kendi içerisinde testosteron seviyelerinin karşılaştırılması.....	25
<b>Tablo 7.</b> Erkek hayvan gruplarında aorta thoracica'nınintima, media ve adventisya tabakalarının kalınlıkları ( $\mu\text{m}$ ), ortalama damar çapı( $\mu\text{m}$ ), ve K delta CT değerleri.....	26
<b>Tablo 8.</b> Dişi hayvan gruplarında aorta thoracica'nınintima, media ve adventisya tabakalarının kalınlıkları ( $\mu\text{m}$ ), ortalama damar çapı ( $\mu\text{m}$ ), ve K delta CT değerleri.....	27
<b>Tablo 9.</b> Erkek hayvan gruplarının aorta thoracica'nınintima, media ve adventisya tabakalarının kalınlıkları ( $\mu\text{m}$ ), ortalama damar çapı ( $\mu\text{m}$ ), ve K delta CT değerlerinin kendi içerisinde .....	35
<b>Tablo 10.</b> Dişi hayvan gruplarının aorta thoracica'nınintima, media ve adventisya tabakalarının kalınlıkları ( $\mu\text{m}$ ), ortalama damar çapı ( $\mu\text{m}$ ), ve K delta CT değerlerinin kendi içerisinde .....	36
<b>Tablo 11.</b> Erkek ve dişi hayvan gruplarının aorta thoracica'nınintima, media ve adventisya tabakalarının kalınlıkları ( $\mu\text{m}$ ), ortalama damar çapı ( $\mu\text{m}$ ), ve K delta CT değerlerinin kandaki Testosteron seviyesiyle aralarındaki korelasyon tablosu..	37

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>SAYFA</b>
<b>Şekil 1.</b> Embriyonik Döneme Ait Bir Mekanizma Olan Vaskülojeniz Mezoderm Kökenli Anjioblast Oluşumundan Sonra, Endotel Hücre Proliferasyonu İle Tüpsü Yapı Oluşturulması Aşamaları.....	10
<b>Şekil 2.</b> Anjiogenez İle İlgili Adımların Şematik Görünümü.....	10

## RESİMLER DİZİNİ

	SAYFA
<b>Resim 1.</b> Kapiller Yatak ve Çevreleyen Bağ Dokusu.....	3
<b>Resim 2.</b> Arteriol ve Venül (histolojik kesit).....	5
<b>Resim 3.</b> Arteriol, Venül, Kapillar Histolojik Kesit.....	6
<b>Resim 4.</b> Erkek hayvanlarda kastrasyon operasyonu.....	19
<b>Resim 5.</b> Dişi hayvanlarda ovariektomi operasyonu.....	20
<b>Resim 6.</b> Kesitlerin İncelenmesi .....	21



## ÇİZELGE DİZİNİ

	SAYFA
Çizelge 1. Erkek hayvanlarda kandaki testosteron seviyesi.....	24
Çizelge 2. Dişi hayvanlarda kandaki testosteron seviyesi.....	24
Çizelge 3. Erkek hayvanlarda aorta thoracica'nın intima kalınlığı (µm).....	27
Çizelge 4. Dişi hayvanlarda aorta thoracica'nın intima kalınlığı (µm).....	28
Çizelge 5. Erkek hayvanlarda aorta thoracica'nın media kalınlığı (µm).....	29
Çizelge 6. Dişi hayvanlarda aorta thoracica'nın media kalınlığı (µm).....	29
Çizelge 7. Erkek hayvanlarda aorta thoracica'nın adventisya kalınlığı (µm).....	30
Çizelge 8. Dişi hayvanlarda aorta thoracica'nın adventisya kalınlığı (µm).....	31
Çizelge 9. Erkek hayvanlarda aorta thoracica'nın ortalama çapı (µm).....	32
Çizelge 10. Dişi hayvanlarda aorta thoracica'nın ortalama çapı (µm).....	32
Çizelge 11. Erkek hayvanlarda aorta thoracica'daki VEFG değerleri.....	33
Çizelge 12. Dişi hayvanlarda aorta thoracica'daki VEFG değerleri.....	34

# 1. GİRİŞ

Yeryüzündeki tüm canlılar yaşamları boyunca sürekli olarak besin maddelerini almak ve aynı zamanda organizmaları için zararlı olan metabolizma artıklarını dışarıya atmak zorundadır. Bu olayın yapılması tek hücreli canlılarda özel bir sistem gerektirmezken, aynı olay gelişmiş hayvanlarda dolaşım adı altında bir sistemin oluşmasını zorunlu kılmıştır (Dursun 1981). Tüm evcil memeli hayvanlarda yaşam için gerekli olan oksijenin, besin maddelerinin ve iç salgı bezleri tarafından salgılanan hormonlarının hücrelere taşınması, hücrelerde oluşan metabolizma artıklarının ve CO<sub>2</sub>'nin atılması dolaşım sistemi (systema vasorum) ile olmaktadır. Dolaşım sistemi kalp, atardamarlar (arteria), toplardamarlar (venae) ve bu damarlarda dolaşan kandan oluşmaktadır (Dursun 1996).

Yeni kan damarı oluşumu vaskülogenezis, anjiogenezis ve arteriogenezis başlıkları ile tanımlanmaktadır (Ucuzian ve ark., 2010). Vaskülogenezis embriyolojik dönemde mezodermden köken alan kan damarlarının öncü hücreleri olan anjioblastlar tarafından vasküler ağın oluşturulmasıdır. Anjiogenezis ise vaskülogenezis ile oluşan damarlardan yeni kapiller damarların şekillenmesidir (Konukoğlu ve Turhan 2005, Deveci 2003). Arteriyogenezis ise bir arterin bağlanması ile oluşan iskemiye cevap olarak musküler kollateral arterlerin in situ olarak çoğalmasını tanımlar. Arteriyogenezis, angiogenezisten sonra damar duvarında düz kasların yer alması ile oluşur. Anjiyogenezis de hipoksinin, arteriyogenezis de ise iskeminin ve/veya inflamasyonun esas rolü vardır. Ne kadar da ayrı ayrı tanımlansalar da her ikisi oluşumuna etki eden faktörler açısından çok fazla ortak yön bulunur (Deveci 2003).

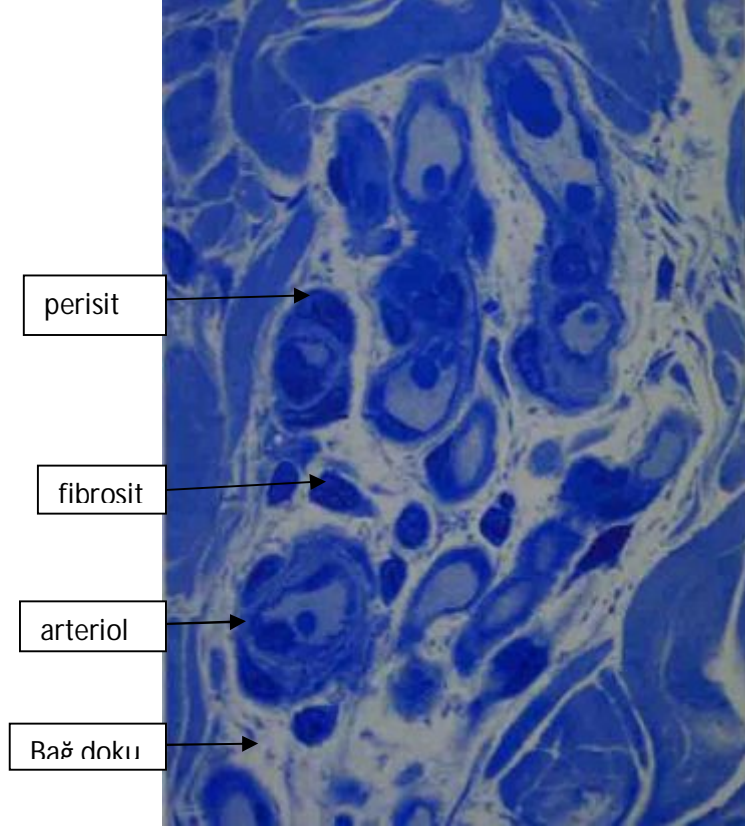
Yeni kan damarların oluşması yaşam boyunca birçok fizyolojik işlev için önemlidir (Konukoğlu ve Turhan 2005, Deveci 2003). Anjiogenezis ve arteriogenezis normal ilerleyen yaşam boyunca gelişim, ovülasyon ve özellikle kalpte yeni kollateral damarların gelişmesi açısından yaşamın devamı için çok önemlidir (Konukoğlu ve Turhan 2005, Deveci 2003). Vaskülogenezis embriyonik gelişim evresiyle sınırlandırılmışken normal anjiogenez oldukça sıkı kontrol altında yaşam boyu devam eder. Anjiogenez sadece postembriyonik doku gelişimi için değil aynı zamanda yaralanmalar ve doku hasarlarının iyileştirilmesi içinde önemlidir. Ayrıca dişi üreme sisteminde folikül gelişimi, ovülasyon sırasında korpus luteum ve gebelikte plasenta gelişimi anjiogeneze bağlıdır. Anjiogenezis

çok sıkı kontrol altında tutulmaktadır. Bu kontrol bozulduğunda patolojik anjiogenezis görülür. Bu durumlara diyabetik retinopati, ateroskleroz ve tümör oluşumu gibi örnekler verilebilir. Bunların dışında serebrovasküler malformasyonda da anjiogenik faktörlerin anormal şekilde üretildiği görülmektedir (Kılıç ve ark., 2005).

### 1.1 Kan Damarları

Kan damar sistemi kalp, arter, kapiller ve venlerden oluşur. Kapiller ve venüller dışındaki bütün kan damarları genel olarak üç tabakadan oluşur;

- Tunica intima (iç tabaka): İçte endotel hücre dizisi, bunun altında bazal lamina ve gevşek bir fibroelastik bağ dokusundan oluşan subendotel tabakadan meydana gelir (Öztaş ve Yazar 2010).
- Tunika media (orta tabaka): Esas olarak sirküler düzenlenmiş düz kas hücrelerinden meydana gelir. Kas hücreleri arasında dağılmış farklı miktarlarda elastik ve kollejen fibriller ve proteoglikanlar bulunur. Arterlerde iyi gelişmiştir (Öztaş ve Yazar 2010).
- Tunika adventisya (dış tabaka) : Daha çok uzunlamasına düzenlenmiş kollagen ve elastik fibrillerden oluşur. Özellikle venlerde bu tabakada düz kas hücreleride bulunur. Venlerin duvarında belirgin tabakadır. Büyük damarların adventisyası içinde vaso vasorum denen küçük kan damarları bulunur. Adventisya ve media tabakalarını besler (Öztaş ve Yazar 2010).



**Resim 1.** Kapiller Yatak ve Çevreleyen Bağ Dokusu (König ve Liebich, 2007)

### 1.1.1. Arterler

Kalpten organlara kan taşıyan kassel ve zarsal kanallardır. Merkezden perifere seyirli olan bu kanallar kalın bir duvara sahiptir. Duvarının kalın oluşu kalbin sistolik hareketi sırasında damar içinde oluşan basınca dayanıklılık gösterir. Arterler genelde düz seyirlidir. Buna karşın beyin ve dalak arterleri gibi kıvrımlı bir yolda takip edebilirler. Uterus, vesica urinaria ve ventriculus arterleri organın hareketine ve değişebilir hacmine uygun olarak son derece kıvrımlı bir yol takip eder. Atardamarların kıvrımlı bir yol seyretmeleri hem besledikleri organın şekil değiştirmesine uyum göstermek, hem de kanın organa sabit miktarda ve düşük basınçla verilmesini sağlamak içindir (Dursun 1996). Arterler kalpten uzaklaştıkça çapları azalarak devam eden dallanmalar yaparlar. Arterlerin gittikçe dallanmaları ile büyük çaptan daha küçük çaplı damarlar (arteriol) oluşur ve bu dallanma damarın tek bir endotel hücreli tabaka (kapiller) olmasına kadar devam eder. Kapiller, kardiyovasküler sistemin en küçük fonksiyonel elementidir. Bu şekilde dallanma gösteren arterler çaplarına göre dört gruba ayrılır (Öztaş ve Yazar 2010).

### **1.1.1.1. Büyük Tip Arterler (elastik arterler)**

Aorta, arteria pulmonalis, arteria carotis communis, a. subclavia ve a. iliaca communis bu gruba girer. Bu arterlerin duvarları çaplarına göre daha incedir. Media tabakasındaki elastik fibriller fazla olduğu için canlı dokuda sarı renkte görünürler. Kalbin yakınındaki büyük iletici damarların sistol sırasında duvarlarındaki elastik fibriller uzar, diastolde ise bu fibriller geri çekilerek kan basıncını korurlar. Böylece elastik arterler, kalp vurumları aralıklı olmasına rağmen akımın devamlılığını sağlayan yardımcı bir pompa olarak görev yaparlar (Öztaş ve Yazar 2010).

### **1.1.1.2. Orta Tip Arterler (Musküler Arterler)**

Arteria brachialis, a. femoralis, a. radialis gibi damarlar bu grupta yer alırlar. Arterial sistemdeki damarların çoğu orta tip arterlerdir. Musküler arterlerin duvarındaki elastik fibrillerin çoğu adventisyada bulunur (Öztaş ve Yazar 2010).

### **1.1.1.3. Küçük Arterler**

Çapları daha küçük ve duvarı daha ince olmakla birlikte orta tip duvar yapısına benzer özellik gösterir (Öztaş ve Yazar 2010).

### **1.1.1.4. Arteriol**

Arterial sistemin çapı 30 ile 400 mikron arasında değişen en küçük terminal dalları arteriol olarak isimlendirilir. Arterioller rezistans damarlar olarak da bilinir. Bu damarlar kalpten atılan kanın periferde karşılaştığı en büyük direnç bölgesidir; periferik direncin oluşumunu ve kontrolünü sağlar (Öztaş ve Yazar 2010).

### **1.1.2. Venalar**

Çevreden merkeze seyirli olan damarlardır. Venöz kanı kalbe getirirler. Düz seyirlidirler. Sayıları arterlerden fazladır (Dursun 1996). Atardamarların iki katı kanı barındırırlar (Tıpırdamaz ve ark.,1998). Kan sirkülasyonu, yüzlek venalardan derin venalara doğru olmaktadır. Vücuttaki kanın büyük çoğunluğu vena cava cranialis ve vena cava caudalis yoluyla kalbe geri döner (Tıpırdamaz ve ark.,1999).



**Resim 2.** Arteriol ve Venül (histolojik kesit) (König ve Liebich, 2007)

### 1.1.3. Kapiller

Arteriol ve venüllerin arasında çok sayıda dallanmalar ve anastomozlar ile bir ağ yapısı oluşturan damarlardır. Ortalama çapları 5-9 mikron kadardır. Metabolik aktivitesi fazla olan dokular (akciğer, böbrek, müköz membranlar, bezler, iskelet-kalp kası, beyin korteksi) kapillerden zengindir. Düz kaslar, tendon, sıkı bağ dokusu ve seröz membranlar gibi yapılar ise kapillerden fakirdir (Öztaş ve Yazar 2010).

Kapiller duvarı içten tek katlı yassı epitelden oluşan bir endotel ile kuşatılmıştır. Endoteli dıştan bazal membran sarar. Bu tabaka retikulum ve kollagen iplikler ile protein-lipid-mukopolisakkaritlerin oluşturduğu şekilsiz bir kitledir. İplikler arasında çok sayıda, fazlaca dallanmış uzantılı hücreler, “perisit” ler bulunur. Kapillarların arteriol ve venüllere geçiş bölgelerinde perisitler arasında düz kas hücreleride görülür. Perisitler uzantılarını geriye çekebilir ve bağ dokusuna doğru göçebilir (Artan 1988).

Küçük arterlerin son kolları kapillere açılır. Bunlar, bol dallanma gösteren ve birbirleriyle anastomozlaşan kılcak borucuklardır. Bir küçük arterden ayrılan kılcak

borucukların iç hacimleri toplamı, kendinden önceki küçük arterinkinden fazladır. Böylece kan basıncı ve kan akımı hızı düşer ve kan ile çevre dokular arasında geçişler sağlanır (Tanyolaç 1999).



**Resim 3.** Arteriol, Venül, Kapillar Histolojik Kesit

## 1.2. Vaskülogenezis

Embriyonel dönemde, endotel hücrelerinin öncü hücreleri olan anjiyoblastların kan adacıklarına dönüşmesiyle vasküler yatağın oluşması anlamına gelir. Embriyonel dönemde oluşan aorta, büyük venler gibi damarlarında vaskülogenezis ile oluştuğu bildirilmektedir (Deveci 2003).

Embriyonik yaşamın ilk aşamalarında hücreler kendileri için gerekli olan besin maddelerini difüzyon yoluyla alırlar. Fakat hücre bölünmeye devam ettikçe, difüzyon için kat edilmesi gereken mesafe giderek uzar. Dolayısıyla, en içte kalan hücrelere besin maddesi götüren ve onların artıklarını toplayan bir sistem olmaz ise hücreler ölürlür. Bu dağıtım ve toplama işlemi kardiyovasküler sistem sağlar ve taşıyıcı sıvısı ise kandır (Reece 2008).

Kan hücreleri ilk önce vitellus kesesinin splanchnic mezodermi üzerinde, mezenşim hücrelerinin yer yer diferensiyel olması ile şekillenmeye başlar. Sinsityum durumundaki bu

hücreler sonradan uzantılarını kaybederek oval ya da yuvarlak şekilli ilkel (pirimitif) kan hücresine dönüşürler. Bu hücrelerin oluşturduğu topluluklara kan adacıkları (insula sanguis) ismi verilir. Pirimitif kan hücreleri, bu hücrelerden salgıladığı ve ilerde kan plazmasını yapacak olan sıvı içerisinde bulunurlar. Gelişme ilerledikçe kan adacıkları çevresinde bulunan mezenşim hücrelerinin, damarları meydana getirmek üzere endotel hücrelerine değiştikleri ve böylece her bir kan adacığı içerisinde olan kısa borucuklar şeklinde kan damarlarının oluşmaya başladıkları görülür (Hassa ve Aştı 1997).

### **1.3. Angiogenesis**

Angiogenesis genellikle yeni kan damarlarının önceden var olan damarlardan çoğalarak (filizlenerek) meydana gelmesi şeklinde tanımlanmıştır. Her ne kadar bu genel tanımlamadan ne tür bir damarın önceden var olanlardan çoğaldığı belli olmasa da, genellikle kapiller damarların kastedildiği son yapılan çalışmalardan anlaşılmaktadır (Deveci 2003). Angiogenesis, vücutta doğal olarak ortaya çıkan bir süreç olup, bazı durumlarda patolojikte olabilir. Fizyolojik angiogenesis; embriyogenesis, yara iyileşmesi ve kadın üreme sisteminde gözlenir. Proangiogenik ve antiangiogenik faktörler arasındaki denge bozulduğunda angiogenesis kontrol edilemez. İnflamatuvar hastalıklarda (artrit, kronik inflamasyon, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, psöriazis), çeşitli kanserlerde (meme, mesane, kolon, akciğer, nöroblastom, melanom, böbrek, pankreas, uterus, serviks, glioblastom) ve göz hastalıklarında (yaşla ilişkili maküler dejenerasyon, proliferatif retinopati) anjiyogenesis patolojik olarak ortaya çıkmaktadır. Periferik arter hastalıklarında ve gecikmiş yara iyileşmesinde ise anjiyogenesisin yetersizliği söz konusu olmaktadır (Konukoğlu ve Turhan 2005). Angiogenesis patolojik koşullarda bazen istenen bazen istenmeyen bir süreç olarak karşımıza çıkar. Ör; yaraların (kaza, cerrahi operasyon vb.) iyileşmesi, enfarktüste kalpte ortaya çıkan iskemik bölgelerin daha iyi kanlanması ve beslenmesi ya da perifer arteriyel hastalıklarda ve iskelet kaslarında egzersiz sırasında yorgunluğa karşı bir direnç oluşturması bakımından istenen durumdur. Bununla birlikte özellikle tümörlerde, kronik inflamatuvar hastalıklarda angiogenesis istenmeyen süreçtir (Konukoğlu ve Turhan 2005, Deveci 2003).

#### **1.3.1. Angiogenesis Çalışmalarının Tarihçesi**

Angiogenesis ya da vaskülarizasyon hakkındaki çalışmaların genellikle 18. yüzyılda başladığı görülmektedir. Boerhaave 1747 yılında, yaralarda bulunan cerehatın



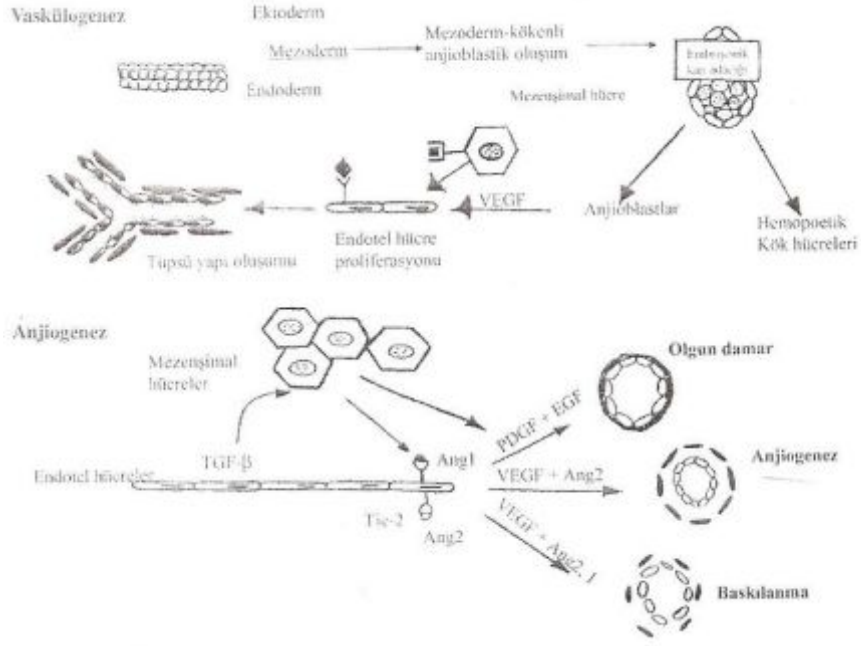
(pus, irin, iltihap) farklı damarların birbirine bağlantı yapmasına yardım ettiğini düşünmüştür. Deveci (2003) tarafından bildirildiği üzere kapillar damar büyümesi hakkında ilk çalışmalardan biri kurbağa larvaları üzerinde Platner (1844) tarafından yapılmıştır. Meyer (1852) ve Travers (1844) yara iyileşmesinde yeni kan damarların oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Billroth 1856 yılında civciv embriyosunda ve farklı tümörlerde kapillerin çoğaldığını gözlemlemiştir. Arnold ise 1871 ve 1872 yıllarında inflamasyon ve rejenerasyon dönemlerinde kapillerin oluştuğunu gözlemlemiştir. Yeni kan damarlarının oluşması ile ilgili ciddi ve seri çalışmalar tümörde Goldman tarafından 19. yüzyıl başlarında başlamış. Goldman gözlemlerini “normal olarak gelişen dokunun kan damarları anormal şekilde gelişmekte olan ve aşırı kan damarı içeren tümör tarafından bozulmakta ve özellikle tümöre komşu olan bölgelerdeki kan damarları genişlemiş ve düzensiz şekil almıştır” diye bildirmiştir. Vaskülarizasyonun oluşmasında endotel hücrelerinin rolünün son derece önemli olduğu, bu oluşumda perisitlerinde rol aldığı son yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Yeni kan damarlarının oluşmasının “angiogenezis” terimiyle ilk olarak tanımlanması 1935 yılında Herting’in gebe maymunların plasentası üzerinde yaptığı bir çalışmayla ortaya koyulmuştur. Sonraki yıllarda yeni kan damarlarının oluşumu endometriyumda kıl folikülü çevresinde, dişlerde iskelet ve kalp kasında, beyinde vb. dokularda çalışılmaya başlanmıştır (Deveci 2003).

Anjiyogenezis konusunda özellikle iskelet ve kalp kasında yapılan araştırmalarda egzersiz, hipoksik ve kalbin bradikardik olarak işlediği şartlarda çalışılmıştır. 1970’li yıllarda tümör ve yara iyileşmesi gibi konularda oluşan fizyolojik ve patolojik anjiyogenezis hakkında ciddi çalışmalar ve tartışmalar yaşanmıştır. Aynı yıllarda Folkman ve arkadaşları ilk anjiyogenik faktörü “tümör angiogenik faktör” (TAF) izole etmişlerdir. Daha sonra tümör tarafından salınan ve etrafa diffüze olan vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi faktörler belirlenmiştir. Anjiyogenezis’ den sorumlu anjiyogenik faktörlerin keşfinden sonra, antianjiyogenik faktörlerinde bulunmasıyla kanser diyabetil retinopati gibi inflamatuvar hastalıkların tedavi yoluna gidilmeye başlanmıştır. 1990’lı yıllarda ise plastik cerrahide anjiyogenik faktörlerin lokal yada topikal olarak uygulanmasıyla yara iyileştirilmesi yoluna gidilmiştir (Deveci 2003).

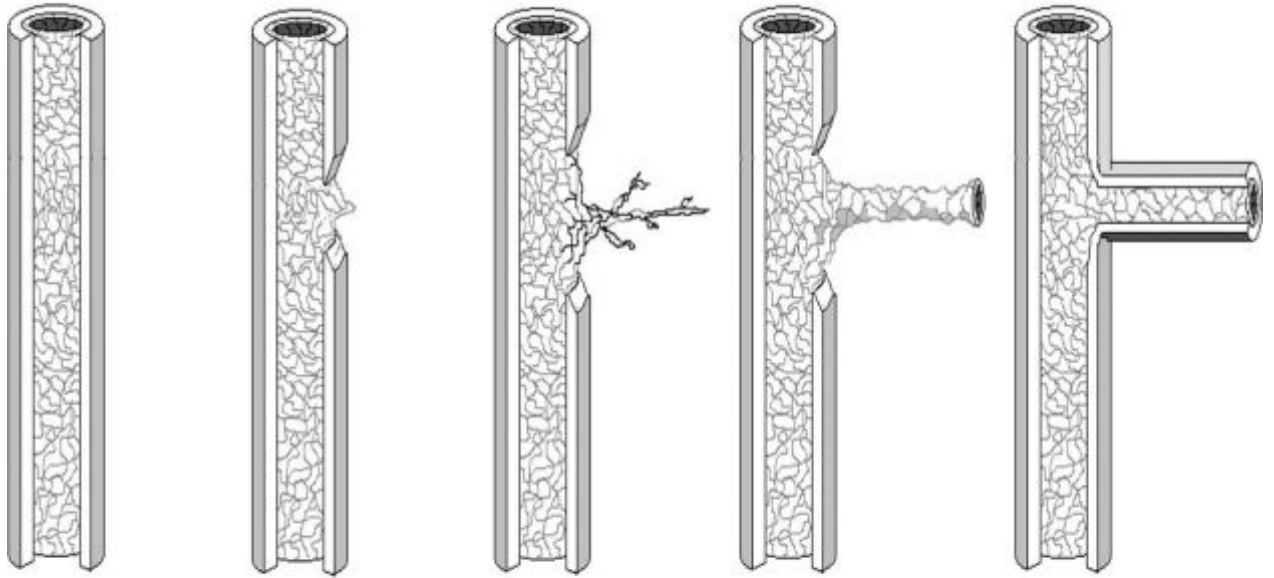
### 1.3.2. Angiogenesis'in Mekanizması

Anjiyogenesis vaskülogensisle oluşan damarlardan, özgül sinyallerle, kapillar şeklinde yeni damarların oluşması işlemine denir (Kılıç ve ark., 2005). Anjiyogenesis oldukça karmaşık bir mekanizma ile gerçekleşir. Ekstrasellüler matriks çevreleyen hücrelerden salınan pek çok büyüme faktörü, sitokinler ve bunların reseptörleri anjiyogenesis de rol oynarlar. Damar endotelini oluşturan endotel hücreleri, anjiyogenesis süreci içinde yer alan temel hücrelerdir. Perisitler ile birlikte kapiller damar duvarını oluştururlar ve ana damarları, dalları ve kapiller ağı oluşturuucu genetik bilgileri içerirler (Konukoğlu ve Turhan 2005).

Endotel hücrelerinin anjiyogenik sinyallerle oluşturduğu yanıt dört aşama içerir. Bazal membran ve ekstrasellüler matriksin yıkımı için proteazlar üretilir (Konukoğlu ve Turhan 2005, Kılıç ve ark. 2005). Bazal laminada bir açıklık meydana gelir. Endotel hücrede bazal lamina boyunca ilerleyerek sinyal kaynağına doğru hareket eder. Bunu takiben endotel proliferasyonu görülür. Proliferasyon durur, hücreler morfolojilerini değiştirerek lümen oluşturacak şekilde birbirlerine sıkıca tutunur. Tüpsü bir yapı meydana gelir.(Şekil 2) Perisitler ve düz kas hücrelerinin endotelyuma katılması ve yeni bazal membranın katılmasıyla anjiyogenesis tamamlanmış olur (Deveci 2003, Güran 2004, Kılıç ve ark. 2005 Konukoğlu ve Turhan 2005). Öncelikle yeni damar oluşumunu arttıran en önemli parametre, dokulara gelen oksijenin azalmasıdır. Oksijenin bir bölgede azalması, gen regülasyon proteini olan “hypoxia-inducible factor 1” (HIF1) yapımını arttırır. Bu protein özellikle, VEGF (vasküler endotel büyüme faktörü) geninin promotörünü etkileyerek VEGF yapımını arttırır. Çevre dokunun salgılanan VEGF bu bölgedeki endotel hücrelerini aktive ederek damarlanmayı arttırır. HIF1 etkisi sadece VEGF promotörüne değil, burada rolü olan birçok faktör üzerindedir. Yeni damar oluşumu gerçekleşip oksijen konsantrasyonu arttığıında HIF1 aktivitesi azalır ve VEGF üretimi azalır. Anjiyogenesis kontrol, çevre dokular tarafından salgılanan faktörlerce düzenlenir ve kontrol edilir (Güran 2004).



**Şekil 1.** Embriyonik Döneme Ait Bir Mekanizma Olan Vaskülojeniz Mezoderm Kökenli Anjioblast Oluşumundan Sonra, Endotel Hücre Proliferasyonu İle Tüpsü Yapı Oluşturulması Aşamaları (Kılıç ve Ark. 2005)



**Şekil 2.** Anjiogenez İle İlgili Adımların Şematik Görünümü (Ucuzian Ve Ark. 2010).

**Tablo 1.** Angiogeneziste görev alan önemli moleküller (Kılıç ve ark. 2005)

1. Endotel migrasyonu için matrisin degradasyonu	Proteazlar (MMP'ler, TIMP, uPA, tPA, PAI)
2. Endotel migrasyonu	İntegrinler, PDGF'ler
3. Endotel proliferasyonu	VEGF, FGF, PDGF'ler, EGF
4. Tüpsü yapının oluşturulması	VEGF, FGF, Anjiyopoitinler

### 1.3.3. Önemli Angiogenik Faktörler ve Etkileri

Anjiogenezi stimüle eden birçok hormon ve/veya büyüme faktörü mevcuttur. Bunlardan bazıları birlikte olduklarında tek başına olduklarından daha fazla etkilidirler (sinerjistik etki, VEGF ile FGF). Anjiyogenezi inhibe eden de birçok faktör tespit edilmiştir. Anjiyogenezi aktivatörleri ve inhibitörleri arasındaki hassas denge ile bir organizmanın herhangi bir noktasındaki anjiyogenezi çok ince bir şekilde kontrol edilmektedir (Deveci 2003).

#### 1.3.3.1. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF)

Anjiyogenezi olayında en çok çalışılan ve en karakteristik olanıdır. Glikoprotein yapısında olup, birçok isoformları (VEGF121, VEGF165, VEGF189, VEGF206, VEGF145 ve VEGF183) bulunmaktadır. VEGF, endotel hücre büyümesinde önemli rol oynamaktadır. Endotel hücrelerinin proliferasyonu, migrasyonu ve diferansiyasyonunu sağlar. Bunun yanı sıra damar permeabilitesini artırır. VEGF'nin reseptörleri transmembran tirozin yapısındadır. Başlıca reseptörleri VEGF-R1 (flt-1), VEGF-R2 (flk-1/KDR), VEGF-R3 (flt-4) ile Nöropilin-1 ve 2 (NP-1 ve NP-2) olarak sıralanabilir. Bunlardan VEGF-R1 ve R2 vasküler (arter ve vena) endotel hücrelerinde, VEGF-R3 lenf damarları endotel hücreleri üzerinde, NP-1 ve NP-2 nöronlar ile vasküler endotel hücrelerinde bulunmaktadır. VEGF-A'nın anjiyogeneziste en çok etkileşime geçtiği reseptörü VEGF-R2 (flk-1/KDR)'dir. VEGF'in nitrik oksit (NO) ile olan etkileşimi damarlaşmada önemli yer tutmaktadır. Nitrik oksit (NO) anjiyogenezinin VEGF bağımlı bir modiyatörüdür. VEGF, NO sentez enzimini indükleyerek, NO sentezini sağlar. Oluşan NO ise endotel hücre migrasyonunun oluşumunda katkı sağlamaktadır. Tümör hücrelerinde VEGF ekspresyonu

artmaktadır. Düşük glikoz seviyesi, oksidatif stres ve özellikle hipoksik ortamda düzeyi hızla artan hypoxia-inducible transcription factor-1 (HIF-1)'de VEGF salınımında etkili rol oynamaktadır. VEGF, hücre dışı matriks yıkımdan sorumlu olan matriks metalloproteazlar ile ürokinaz ve doku tipi plaminojen aktivatörlerinin salınımını da uyarır. Böylelikle invazyon ve metastazı da kolaylaştırmaktadır. Ayrıca VEGF, endotel hücrelerinin çok sayıdaki biyolojik fonksiyonunu, sitokin sentezi ve salınımını, trombolitik ve pıhtılaşma yollarında yer alan moleküllerin ekspresyonunu ve düz kas hiperplazisini düzenlemektedir (Konukoğlu ve Turhan 2005, Doğan 2006, Otröck ve ark. 2007).

VEGF'nin postnatal damarlanma, yara iyileşmesi, kanser, romatoid artrit, retinada yeni damarlanma ve kalp-damar hastalıkları dahil olmak üzere çok sayıdaki patofizyolojik durumda önemlidir. VEGF, başlangıçta damar geçirgenliğini artıran bir faktör olarak tanımlanmıştır. Endotel hücrelerinin çok sayıdaki biyolojik fonksiyonunu, sitokin sentezi ve salınımı, trombolitik ve pıhtılaşma yollarında yer alan moleküllerin ekspresyonu ve düz kas hücre hiperplazisini düzenler (Konukoğlu ve Turhan 2005).

#### **1.3.3.2. Epidermal Büyüme Faktör (EGF)**

Polipeptit yapıda olup birçok dokuda bulunur ve trombosit degranülasyonu sırasında salınır (Konukoğlu ve Turhan 2005). EGF reseptörleri (EGFR), hücre yüzeyinde bulunan tirozinkinaz aktivitesine sahip transmembran glikoproteinleridir (Doğan 2006). EGF epitel hücreler, endotel ve fibroblastlar için kemotaktiktir. Anjiyogenezisi ve kollagenaz aktivitesini uyarır (Konukoğlu ve Turhan 2005). EGFR'nün anjiyogenezis haricinde, apoptozis inhibisyonu, hücre motilitesinde artış, protein sekresyonunda artış, adezyon, invazyon, hücre yaşam süresinde artış, diferansiyasyon ve metastaz gelişimi gibi birçok olayda önemli rol aldığı bildirilmiştir (Doğan 2006).

#### **1.3.3.3. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)**

İlk olarak trombositlerde görülmüştür, daha sonra fibroblast, astrosit, keratonosit, epithelial hücrelerde de tespit edilmiştir. PDGF, glikoprotein yapısında olup, üç farklı şekilde bulunur. Alfa ve beta olmak üzere iki reseptörü vardır. Bu reseptörler hücre zarında bulunur ve tirozinkinaz aktivitesine sahiptir. PDGF, özellikle kan damarı şekillenmesinde hücrelerin büyümesi ve bölünmesini düzenler. Bağ doku hücrelerinin çoğalarak matriks proteinlerini üretmelerini sağlamaktadır (Yardımcı 1993, Otröck et al. 2007). Makrofaj ve

polimorf çekirdekli lökositlerin kemotaksisini uyarır. Fibroblast ve düz kas hücrelerinde hem kemotaksis hem de mitogenezi uyarır. Kollagen ve fibronektin sentezini uyarır, kollajenaz aktivitesini artırır (Konukoğlu ve Turhan 2005). Ayrıca PDGF, sentral sinir sisteminin gelişimi ve zedelenmiş bölgelerin iyileşme süreçleri içinde rol almakta, glial hücrelerin çoğalma ve farklılaşmasını sağlamaktadır (Yardımcı 1993, Otrrock et al. 2007). VEGF ve PDGF'nin ikili bir kontrol sistemi oluşturduğu ve bu sistemin reseptörleri ve enzim substratlarıyla olan ilişkisi açığa çıkarılmıştır (Glinskii et al. 2008).

#### **1.3.3.4. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)**

FGF'ler izole edilen ilk anjiogenik faktörlerdir ve gliom anjigenesisinde etkindirler (Kılıç ve ark., 2005). Bugüne kadar 22 üyesi olduğu bilinen FGF'nin asitik (FGF-1) ve bazik (FGF-2) iki protipi bulunur. FGF reseptörleri (FGFR), hücre yüzeyinde yer alan tirozinkinaz aktivitesine sahip bir transmembran glikoproteinlerdir. FGF-1, arteriyel damarların yapılanması için gerekli olan tüm hücre tiplerinin (endothelial ve düz kas hücrelerinin) proliferasyonu ve differensiyasyonu uyarılmaktadır. FGF-2, endothelial hücre proliferasyonu, proteaz üretimi, kemotaksi ve bu hücrelerin tüp şeklinde yapılanmasını sağlayarak anjiyogenezis uyarılmaktadır. FGF-2'nin VEGF ve VEGFR-2 ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir (Ortniz ve Itoh 2001, Kılıç ve ark., 2005, Otrrock ve ark. 2007). FGF, mezenkimal hücreler için mitojendir. Endotel proliferasyonu ve motiliteyi artırarak neovaskülarizasyonu hızlandırarak anjiyogeneziste etkilidir. Ayrıca heparinin etkilerini güçlendirmek, kollajen sentezini uyararak yaranın kontraksiyonunu ve epitelizasyonu sağlamak ve fibronektin ve proteoglikan sentezini uyararak adhezyonu kolaylaştırmak gibi etkileri vardır (Konukoğlu ve Turhan 2005). Sonuç olarak FGF'ler endotel aktivitesinin modülasyonu ve VEGF ekspresyonunu teşvik ederek iki yolla anjiyogenezise katkıda bulunurlar (Kılıç ve ark., 2005).

#### **1.3.3.5. Anjiopietinler**

Ang1, Ang2, Ang3 ve Ang4 olmak üzere dört tipi olan büyüme faktörleri ve Tie-1 ve Tie-2 diye adlandırılan iki reseptörü bulunmaktadır. Endotel hücrelerine özgü olan bu ligand-reseptör sistemi (angiopoietin-tie) ergin damarların şekillenmesinde önemlidir. Anjiopietin-1, tie-2'nin fizyolojik ligantıdır. Gelişen endotelyuma perisitlerin ve düz kas hücrelerinin katılımını, kan damarının olgunlaşmasını sağlar. Ligandı henüz belirlenmemiş olmakla beraber tie-1 vasküler bütünlüğün ve devamlılığın sağlanması için önemlidir.

Malignant melanomların, meningiom ve gliomların kapillerinde eksprese edilir. Angiopoietin-2, angiopoietin-1'in doğal antagonistidir; damarların devamlılığını engeller ve endotel apoptozunu teşvik eder. Angiopoietin-2'nin ekspresyonundaki artış ve tie-2 reseptörünün inhibe edilmesinin tümör anjiyogenezisi için gerekli olduğu düşünülmüştür (Kılıç ve ark. 2005, Otröck ve ark. 2007).

#### **1.3.3.6. Matriks metalloproteinaz (MMPs)**

Yeni damar şekillenmesinde elzem olan basal membranın degradasyonu (çözünme, dağılma) sağlayan Matriks metalloproteinazlardır. Bir enzim ailesi olan MMPs endotelial hücre matriksini değiştirmektedir. Yapısal olarak iki farklı gruba ayrılırlar. Bunlar sekresyon halindeki MMPs ve membran tip MMPs (MTMMPs)'dir. Sekresyon halindeki MMPs'ler collagenaz içerenler (MMP-1,8 ve 13) stromelizin içerenler (MMP-3,10 ve 11), jelatinaz içerenler (jelatinaz A yada MMP-2, jelatinaz B yada MMP-9) ve diğerleri olmak üzere sınıflandırılmışlardır. Bazı MMPs'in rolü anjiyogenezis aşamasında ve endotel hücrelerinde belirlenmektedir. MMP-9, proteoglycan matriksden VEGF salınımını sağlar. Diğer MMPs'lerin rolü doku ve organlara göre değişir. Örn; MT3-MMP endometriyal endotel hücrelerinde yeni kapillar şekillenmesinde rol oynar. Angiogenezisde damar stabilizasyonu için MMPs'lerin görevi bittikten sonra inhibisyonu sağlanmazsa oluşan damarda gerilemeye ve yok olmaya başlar. MMPs'lerin doku inhibitörleri (TIMPs) bulunmaktadır. MT1-MMP, ilk tanımlanan matriks metalloproteinaz olup hücre membranına bağlı bulunmaktadır. Fibrin matriks çözünmesi ve parçalanmasında fibrinolizin olarak görev yapar ve daha çok damar yaralanmalarında daha çok bulunur. MT1-MMP, endotelial hücre matriksini çözmek yanında endotel invazyon ve migrasyonu ile kapillar tüp şekillenmesinde katkıları vardır. (Ucuzian ve ark., 2010).

#### **1.3.3.7. Plazmin (PA)**

Plazmin geniş spektrumlu bir proteaz olup çoğu ekstrasellüler proteini özellikle fibrini degrade etmektedir ve yaralanmalarda angiogenezis için uyarı vermektedir. Ürokinaz tip plazminojen aktivatörü (uPA) ve doku plazminojen aktivatörü (tPA) serine proteazlar olup plazminojeni aktive ederek plazmine çevirirler. Dokularda plazmin aktivasyonunu durduran inhibitörler (PAI) bulunmaktadır (Ucuzian ve ark., 2010).

### 1.3.3.8. İntegrinler

İntegrinler hücre matriks iletişimlerinde hücre yüzey (heterodimerik transmembran) reseptörleri olup  $\alpha$  ve  $\beta$  alt türü bulunmaktadır. İntegrinler ekstrasellüler matriks ligantalarına bağlanarak çevreden gelen uyarılarla endotel hücrelerinin birbirine ve ekstrasellüler matrikse tutunmalarını sağlarlar. Bu reseptörler ligand spesifik olarak çalışırlar.  $\alpha_v$  ve  $\beta_1$  alt üniteleri özellikle morfolojik differensiyasyonda önemlidir. (Ucuzian ve ark., 2010).

**Tablo 2.** Angiogenezi İnhibe Eden Bazı Endojen İnhibitörler (Deveci 2003)

Angiostatin	Fibronektin peptitler
Endostatin	Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- $\alpha$ )
Vazostatin	Plazminojen inhibitörleri 1, 2 (PAI-1,-2)
Trambospondin- (TSP-1)	Doku metalloproteinaz inhibitörleri 1, 2, 3, 4
İnterferon- $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$	(TIMP-1, 2, 3, 4).
İnterlökin 1 (İL-1)	Somatostatin
İnterlökin 4 (İL-4)	Retinoitler
İnterlökin 12 (İL-12)	Vitamin A
Peptitler	Vitröz sıvılar
Laminin peptitler	

### 1.4. Farklı Süreçlerdeki Anjiogenezis

Angiyogenez vücutta doğal olarak ortaya çıkan bir süreç olup, bazı durumlarda patolojikte olabilir. Fizyolojik anjiyogenez; embriyogenez, yara iyileşmesi ve kadın üreme sisteminde gözlemlenir. Proanjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler arasındaki denge bozulduğunda anjiyogenez kontrol edilemez. İnflamatuar hastalıklarda (artrit, kronik inflamasyon, inflamatuar bağırsak hastalıkları, psöriazis), çeşitli kanserlerde (meme, mesane, kolon, akciğer, nöroblastom, melanom, böbrek, pankreas, uterus, serviks, glioblastom) ve göz hastalıklarında (yaşla ilişkili maküler dejenerasyon, proliferatif



retinopati) anjiyogenez patolojik olarak ortaya çıkar. Periferik arter hastalıklarında ve gecikmiş yara iyileşmesinde ise anjiyogenezin yetersizliği söz konusu olmaktadır (Konukoğlu ve Turhan 2005, Güran 2004, Özuysal 2001).

#### **1.4.1. Hormonlar ve Anjiogenez**

Hormonların, organ ve dokularda bulunan anjiogenik faktörleri direkt ya da endirekt olarak uyardığı yapılan birçok çalışmayla kanıtlanmıştır. Bunlar içerisinde eşey hormonlarından östrojen başta olmak üzere büyüme hormonu, tiroid hormonları, parathormon, prolaktin, folikül stimulan hormon, lüteinleştirici hormon ve testosteron yer almaktadır (Castillo ve ark 2005). Dişi cinsiyet hormonlarının anjiogenez olayındaki rolünün, genital organlardaki menstural değişim ve gebelikten ötürü, oldukça önemli olduğu ortaya konulmuştur. Albrecht ve ark. (2003) endometriumda yapmış olduğu çalışmada östrojenin, anjiogenik faktörlerin üretimi ve salınımını arttırıcı etkisinin olduğu moleküler ve immunohistokimyasal yöntemlerle belirlenmiştir. Ayrıca östrojenin çok sayıdaki vasküler fonksiyonlu genlerin transkripsiyonunu düzenleyen spesifik reseptörlerin olduğu bildirilmiştir (Soares ve ark. 2004, Jesmin ve ark., 2003-2004). Endotel hücreler tarafından salınan bu reseptörler sayesinde faktörlerin kontrolüyle sağladığı tespit edilmiştir (Losordo ve Isner 2001, Rubayni 2002).

Testosteron hormonunun anjiogenezise olan etkisi ile ilgili olarak az sayıda ve kısıtlı çalışma yapılmıştır. Endotel hücre kültürlerinde yapılan bir çalışmada testosteron hormonunun uygulamasının erkeklerde, VEGF'ye bağlı olarak anjiogenezisi arttırmakta olduğu ve bunun dişilerde etkisinin olmadığı ispat etmiştir. Ayrıca, genadektomi yapılan farelerde implante edilen materyallere doğru damarlaşmanın çok düşük olduğunu, androjen tedavisiyle bunun erkek farelerde arttığını, dişilerde ise etkisinin olmadığını gözlemlenmiştir. Dolayısıyla androjenlerin cinsiyete bağlı olarak anjiogenezisi arttırdığı sonucuna varmışlardır (Sieveking ve ark. 2010). Prostat kanserleriyle ilgili yapılan çalışmalarda, kastrasyonun ilk aşamadaki iyileşme sürecindeki olumlu etkisinin testosteronun azalmasına yani anjiogenik etkinin azalmasıyla bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Hammersten ve ark., 2006). Kastrasyonun kanserli dokuda VEGF düzeyinin iki kat azaltarak damarlarda gerilemeye neden olduğu daha sonraki aşama yapılan testosteron tedavisiyle anjiogenezisin indüklendiği belirlenmiştir (Gustavsson ve ark. 2008). Bunun yanı sıra testosteronun arterial damarlarda hücrelerin formasyonunu

koruyucu etkisi olduğu gözlenmiştir (Hanke ve ark. 2001). Damarlarda kinetik etkisi bakımından ise ilk aşamada vazodilatör daha uzun süreli maruz kalmalarda ise kan basıncı artışına neden olup böbrek fonksiyonlarını riske attığı belirlenmiştir (Wang ve ark. 2002, Alexandersen ve Christiansen 2004, Kearney ve Hurn 2004, Iliescu ve Reckelhoff 2006)

#### **1.4.2. Yaşlanma ve Anjiogenez**

Yaşın ilerlemesi ile ya da yaşlılık hallerinde anjiyogenezin geciktiği yada değişikliğe uğradığı tespit edilmiştir. Yaşlı bireylerdeki dokularda kapillar dansitenin genç bireylere oranla giderek azaldığı ve damarlaşmaya yönelik süreçlerinde hemen hemen %40 oranında gecikmeye uğradığı belirlenmiştir. Yaşlı dokularda anjiogenik faktörlerin (VEGF, PDGF, FGF, TGF- $\beta$ 1) yapımı ve fonksiyonlarındaki gerilemelerin damar endotelindeki proliferasyon ve migrasyonu azalttığı kabul edilmektedir. Anjiogenez oluşumunda önemli olan matriks proteinleri incelendiğinde, yapısal protein olan kollagenin çoğu yaşlı dokulardaki üretiminin azalıp, yıkımı arttığı için dokulardaki total miktarlarında azalma olduğu gözlemlenmiştir. Matriks proteinlerinden olan hücre adezyonu ve inflamasyonu düzenleyen fibronektinin yaşlı hücre kültürlerinde sentezi artarken in vivo ortamda kollagene bağlı bulunan fibronektinin ekspresyonu azaldığı tespit edilmiştir (Reed ve Edelberg 2004, Reed 2005). Yaşlı dokulardaki yara iyileşmelerindeki anjiogenezis olaylarında VEGF, PDGF, FGF, TGF- $\beta$ 1 gibi anjiogenik faktörlerin konsantrasyonlarının azalması ile kollagen birikiminin ve inflamasyon yanıtındaki azalmaların süreyi uzattığı ispatlanmıştır. Bu azalmanın tümör gelişinde de etkili olduğu, gençlere göre yaşlılarda daha hızlı geliştiği belirlenmiştir (Reed ve Edelberg 2004).

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılacak hayvan materyali ve yapılacak incelemeler alt başlıklar halinde sunulmaktadır.

### 2.1. Hayvan Materyali ve Yetiştirilmesi

Çalışmada toplam 40 adet dişi, 40 adet erkek olmak üzere 80 adet Swis-albino fare kullanılmıştır. Fareler ADÜ Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edilmiştir. Hayvanlar süt kesiminden 1 yaşına kadar 7'şerli kafeslere normal koşullar altında (20-24 °C, % 50-60 nem) ve hazır ticari pelet yemleriyle ad libitum beslenmiştir.

### 2.2. Hayvanların Gruplandırılması

Hayvanlar tablo 3'te gösterildiği gibi grublandırılmıştır. Her grupta 5 erkek ve 5 adet dişi hayvan bulunmaktadır. Kontrol grubu hayvanlara gonadektomi operasyonu ve testosteron takviyesi uygulanmamıştır. Deney gruplarından birinci grup gonadektomi yapılmayan hayvanlara aynı strese maruz kalmaları için 12 aylıkken yalancı operasyon (sadece deri ensizyonu ve kapatılması) yapılmıştır. İkinci grup hayvanlara ise gonadektomi (12 aylıkken) yapıp testosteron takviyesi yapılmamıştır, üçüncü grubu hayvanlara ise hem gonadektomi (12 aylıkken) hem de testosteron takviyesi yapılmıştır. Operasyon sonrası on gün iyileşme dönemi beklenildikten sonra deney grubundaki III. Grup hayvanlara 1 ay süreyle depo testosteron takviyesi yapılmıştır. Kontrol grubu hayvanların 12. ayında diğer grupların ise bir aylık testosteron takviyesi sonrasında kan ve doku (aorta thoracica) örnekleri alınmıştır.

**Tablo 3.** Hayvanların Gruplandırılması ve Yapılan Uygulamalar

Hayvan Grupları	Operasyon	Testosteron Takviyesi
Kontrol	-	-
Grup I	Yalancı operasyon	-
Grup II	Gonadektomi	-
Grup III	Gonadektomi	Testosteron takviyesi yapıldı

### 2.3. Testosteron Hormonu Takviyesi

Deney grubundaki testosteron takviyesi yapılacak hayvanlara 12. aydaki operatif uygulamadan 10 gün sonrasında başlamak üzere 0,01cc testosteron hormonu (250 mg/mL Sustanon 250 ®, Organon) subkutan enjeksiyon şeklinde tek doz olarak verilmiştir.

### 2.4. Operasyonların Yapılması

Hayvanlara yapılan operasyonlar ADÜ Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesindeki operasyon odasında gerçekleştirilmiştir.



**Resim4.** Erkek hayvanlarda kastrasyon operasyonu



**Resim 5.** Dişi hayvanlarda ovariektomi operasyonu

## **2.5. Dokuların Toplanması**

Hayvanların post-operatif bakımları bitiminden sonra aortun alınması için ötenazi uygulanmıştır. Bunun için önce hayvanlara intraperitoneal (i.p.) olarak Ketamine (90 mg/kg) / Xylazine (10mg/kg) kombinasyonu verilerek anestezi sağlanmıştır. Eksanguinasyon ile kan örnekleri alındıktan sonra hayvanların aortları diseke edilerek toplanmıştır.

## **2.6. Histolojik İncelemeler**

Alınan organlar % 10'luk Buffer formalin solüsyonunda tespit edilmiş, uygun doku takibinden sonra parafine gömülmüşlerdir. Parafin bloklardan 50  $\mu$  ara ile 5'er  $\mu$ 'luk üç seri kesit alınmış, kesitlere deparafinasyon işlemi uygulandıktan sonra triple boyama yapılarak ışık mikroskopunda belirlenen ölçümler yapılmıştır. Alınan bazı kesitlerin üst üste binmesi, dokunun katlanması gibi nedenlerde bazı aort kesitleri histolojik olarak incelenememiştir.

## 2.7. Ölçümlerin Yapılması

Preperatları hazırlanan aortlardan tunica media, tunica adventisya ve tunica intimanın kalınları, damar lümeninde ise en kısa ve en uzun ölçümler alınarak karşılaştırılmıştır. Ölçümler alınırken güvenilirliği ve ölçüm yapan kişinin hata payını azaltmak için aynı ölçüm beş kere alınmış, istatistiksel analize bu beş ölçümün ortalaması incelenmiştir.



**Resim 6.** Kesitlerin İncelenmesi

## 2.8. Moleküler incelemeler

Moleküler incelemeler ADÜ Merkez Laboratuvarında yapılmıştır.

### 2.8.1. Dokulardan RNA Ekstraksiyonu

Total RNA ekstraksiyonu için alınan doku örnekleri GeneJET RNA Purification kiti (Fermentas) kullanarak spin kolon yöntemiyle total RNA ekstraksiyonu üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

### 2.8.2. RT PCR İle Angiogenenik Faktörlerin Kantitatif Ölçümü

Revers transkripsiyon için 2µg total RNA kullanılarak ve RevertAid M-MuLV reverse transcriptaz enzimi içeren RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit ile üretici

firmanın (Fermentas) direktifleri doğrultusunda revers transkripsiyon işlemi gerçekleştirildi. Oluşan cDNA real time PCR amplifikasyonları için kullanıldı. Bu amaçla RNA ekstraksiyonu ve PCR işleminin kontrolü ve standardizasyon için housekeeping transkript olan (GAPDH) kullanıldı. PCR reaksiyonu için QuantiTect SYBR er PCR Kit (ABM) üretici firmanın direktifleri doğrultusunda kullanıldı. Tablo 4'te RT PCR için kullanılacak primerler gösterilmiştir.

**Tablo 4.** RT PCR İçin Kullanılacak Primerler

Genler	Primer 1	Primer 2
VEGF (Shidaifat 2007)	GGAGATCCTTCGAGGAGCACTT	GGCGATTTAGCAGCAGATATAAGAA

## 2.9. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın istatistiksel analizinde STATISTICA 7.0 paket programı kullanılmıştır. Dişi ve erkek hayvanlardan elde edilen verilerin gruplar arası karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi uygulanmıştır. Farklılığın hangi gruptan olduğunu kontrol etmek için Duncan testi yapılmıştır.

## 3.BULGULAR

### 3.1. Testosteron Seviyesi

**Erkek hayvanların**, kanlarındaki testosteron seviyeleri (Tablo 5, Çizelge 1) incelendiğinde Grup I de hormon seviyesinin pik yaptığı, en düşük seviyenin kastrasyona bağlı olarak Grup II de görüldüğü, Grup III de yapılan testosteron takviyesiyle 6 ve 12 aylık dönemdeki seviyelerin arasında bulunduğu gözlenmiştir.

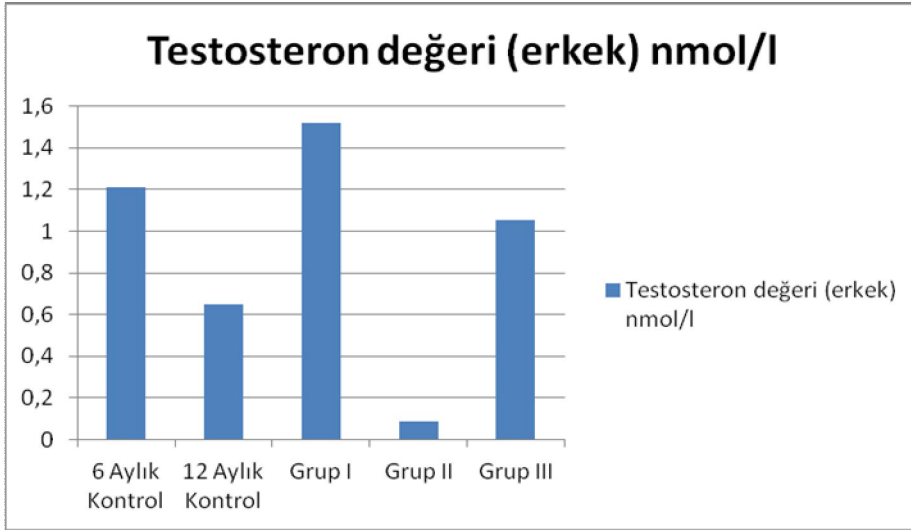
Bununla birlikte 12 aylık kontrol grubu ile grup I ( $p < 0.01$ ), grup I ile grup II ( $p < 0.01$ ) ve grup I ile grup III ( $p < 0.05$ ) arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılık bulunmuştur (Tablo 6.)

**Tablo 5.** Erkek ve dişi hayvan gruplarındaki testosteron sevipleri

Hayvan Grupları (N)	Cinsiyet	Testosteron seviyesi nmol/L (Mean $\pm$ S.D.)
Grup I (5)	Erkek	1,517 $\pm$ 1,173
Grup I (8)	Dişi	0,140 $\pm$ 0,101
Grup II (8)	Erkek	0,089 $\pm$ 0,075
Grup II (8)	Dişi	0,051 $\pm$ 0,064
Grup III (8)	Erkek	1,051 $\pm$ 0,478
Grup III (8)	Dişi	3,862 $\pm$ 2,838
12 Aylık Kontrol (8)	Erkek	0,650 $\pm$ 0,514
12 Aylık Kontrol (8)	Dişi	0,183 $\pm$ 0,105
6 Aylık Kontrol (7)	Erkek	1,208 $\pm$ 0,860
6 Aylık Kontrol (8)	Dişi	0,205 $\pm$ 0,280



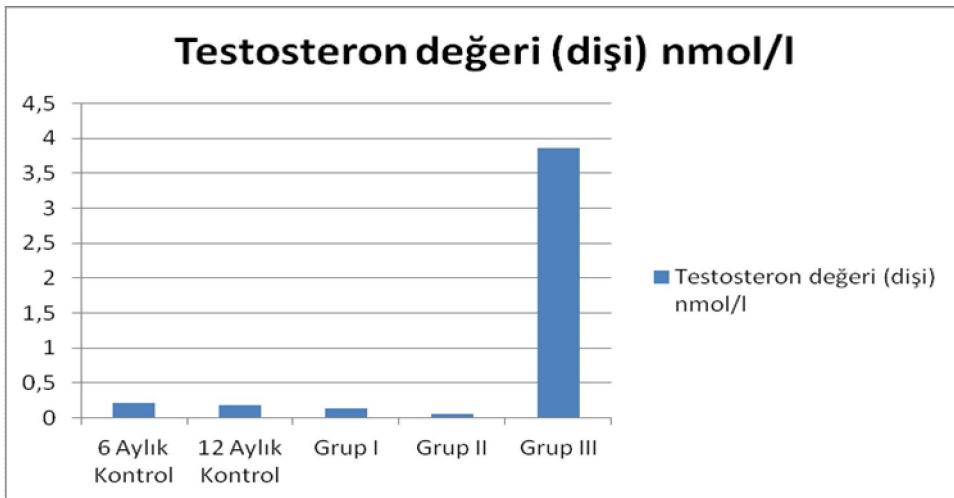
**Çizelge 1.** Erkek hayvanlarda kandaki testosteron seviyesi



**Dişi hayvanların,** kanlarındaki testosteron seviyeleri (Tablo 5, Çizelge 2.) incelendiğinde dışardan testosteron takviyesi uygulanan grup (Grup III) haricinde hormon seviyesinin düşük olduğu tespit edilmiştir. Grup III de ise bu seviyenin oldukça yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Bununla birlikte grup III ile 6 aylık kontrol grubu ( $p < 0.001$ ), 12 aylık kontrol grubu ( $p < 0.001$ ), grup I ( $p < 0.001$ ), ve grup II ( $p < 0.001$ ) arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılık bulunmuştur (Tablo 6.).

**Çizelge 2.** Dişi hayvanlarda kandaki testosteron seviyesi



**Tablo 6.** Erkek ve dişi hayvan gruplarının kendi içerisinde testosteron seviyelerinin karşılaştırılması,

Hayvan Grupları	6 Aylık	12 Aylık	Grup I	Grup II	Grup III
	<b>Kontrol</b>	<b>Kontrol</b>			
<b>Erkek hayvanlarda</b>	<b>6 Aylık Kontrol</b>				
	<b>12 Aylık Kontrol</b>	0,144482			
	<b>Grup I</b>	0,388179	0,029904*		
	<b>Grup II</b>	0,005706**	0,121912	0,000712***	
	<b>Grup III</b>	0,659187	0,264246	0,221907	0,013800*
<b>Dişi hayvanlarda</b>	<b>6 Aylık Kontrol</b>				
	<b>12 Aylık Kontrol</b>	0,972210			
	<b>Grup I</b>	0,925094	0,947405		
	<b>Grup II</b>	0,829169	0,848067	0,889780	
	<b>Grup III</b>	0,000124***	0,000063***	0,000055***	0,000033***

\* ;  $p \leq 0,05$ , \*\* ;  $p \leq 0,01$ , \*\*\* ;  $p \leq 0,001$

## 3.2. Histolojik Veriler

### 3.2.1. Aorta Thoracica'daki İntima Kalınlığı

**Erkek hayvanların** aorta thoracica'sının intima katmanını incelendiğinde Kontrol grubu hayvanlarda en kalın Grup I' de en ince olduğu saptanmıştır (Tablo 7. Çizelge 3) . Bu durumda deney grupları kendi içlerinde değerlendirildiğinde kastrasyonla intimada bir değişiklik olmadığı ve kastre edilmiş hayvanlara dışarıdan verilen hormon takviyesinin intima tabakasında bir etkisinin bulunmadığı gözlemlenmiştir.

Bununla birlikte Kontrol grubu ile Grup I ( $p < 0.01$ ), Grup II ( $p < 0.05$ ) ve Grup III ( $p < 0.01$ ) arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılıklar bulunmuştur (Tablo 7.)

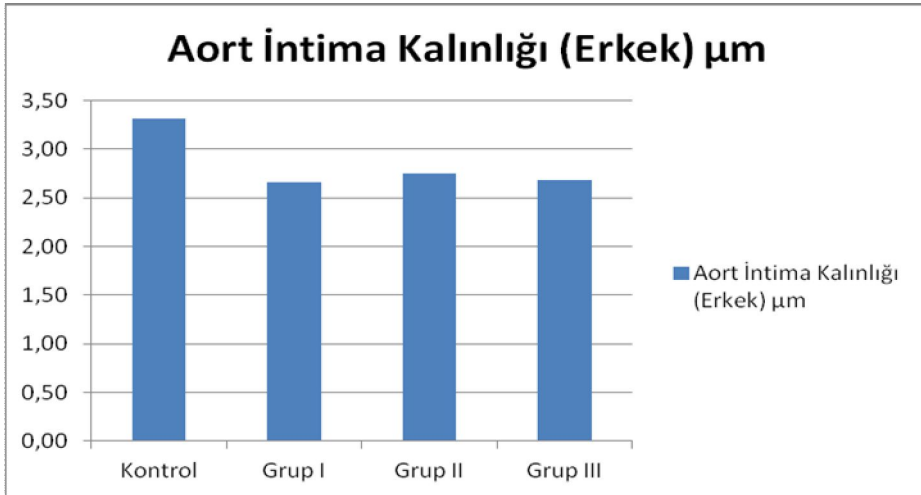
**Tablo 7.** Erkek hayvan gruplarında aorta thoracica'nın intima, media ve adventisya tabakalarının kalınlıkları ( $\mu\text{m}$ ), ortalama damar çapı( $\mu\text{m}$ ), ve K delta CT değerleri

Hayvan Grupları	İntima kalınlığı (Mean $\pm$ S.D.)	Media kalınlığı (Mean $\pm$ S.D.)	Adventisya kalınlığı (Mean $\pm$ S.D.)	Ortalama Çap (Mean $\pm$ S.D.)	VEGF K delta CT (Mean $\pm$ S.D.)
<b>Kontrol</b> (N)	3,313 $\pm$ 0,191 (2)	54,144 $\pm$ 0,021 (2)	28,750 $\pm$ 3,170 (5)	600,400 $\pm$ 63,908 (2)	4,568 $\pm$ 0,799 (5)
<b>Grup I</b> (N)	2,664 $\pm$ 0,275 (4)	63,777 $\pm$ 5,343 (4)	30,316 $\pm$ 4,320 (4)	535,743 $\pm$ 184,397 (4)	5,068 $\pm$ 1,130 (4)
<b>Grup II</b> (N)	2,757 $\pm$ 0,145 (4)	65,156 $\pm$ 9,404 (4)	35,255 $\pm$ 5,066 (4)	616,523 $\pm$ 70,801 (4)	1,064 $\pm$ 2,239 (5)
<b>Grup III</b> (N)	2,681 $\pm$ 0,238 (4)	63,218 $\pm$ 8,640 (4)	29,042 $\pm$ 3,947 (5)	624,488 $\pm$ 100,590 (4)	2,897 $\pm$ 3,515 (4)

**Tablo 8.** Dişi hayvan gruplarında aorta thoracica'nın intima, media ve adventisya tabakalarının kalınlıkları (µm), ortalama damar çapı (µm), ve K delta CT değerleri

Hayvan Grupları	İntima kalınlığı (Mean ± S.D.)	Media kalınlığı (Mean ± S.D.)	Adventisya kalınlığı (Mean ± S.D.)	Ortalama Çap (Mean ± S.D.)	VEGF K delta CT (Mean ± S.D.)
<b>Kontrol</b> (N)	2,958 ± 0,308 (5)	68,325 ± 4,994 (5)	24,783 ± 4,890 (5)	590,252 ± 107,677 (5)	4,710 ± 0,320 (4)
<b>Grup I</b> (N)	2,721 ± 0,135 (5)	63,892 ± 3,006 (5)	24,429 ± 5,252 (4)	568,902 ± 94,214 (5)	4,262 ± 0,518 (5)
<b>Grup II</b> (N)	2,537 ± 0,092 (4)	63,832 ± 8,550 (4)	20,179 ± 4,616 (2)	568,145 ± 86,913 (5)	0,293 ± 2,514 (5)
<b>Grup III</b> (N)	2,918 ± 0,125 (5)	61,961 ± 5,096 (5)	24,351 ± 3,790 (4)	621,154 ± 53,652 (5)	-1,721 ± 0,759 (5)

**Çizelge 3.** Erkek hayvanlarda aorta thoracica'nın intima kalınlığı (µm)

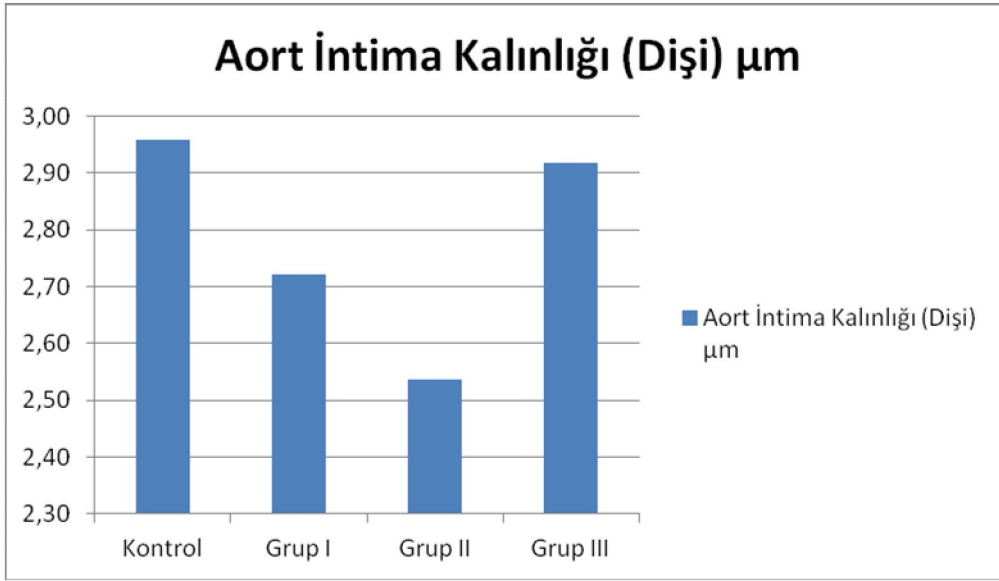


**Dişi hayvanların** aorta thoracica'sının intima katmanı incelendiğinde Kontrol grubu hayvanlarda en kalın Grup II' de en ince olduğu saptanmıştır (Tablo 8, Çizelge 4.) . Bu durumda deney grupları kendi içlerinde değerlendirildiğinde overioktomi operasyonu

ile intimada bir azalma olduğu ve operasyon yapılan hayvanlara dışarıdan verilen hormon takviyesiyle intima tabakasında önemli bir artış olduğu gözlemlenmiştir.

Bununla birlikte Kontrol grubu ile Grup II ( $p < 0.01$ ) ve Grup II ile Grup III ( $p < 0.01$ ) arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılıklar bulunmuştur (Tablo 8.)

**Çizelge 4.** Dişi hayvanlarda aorta thoracica'nın intima kalınlığı ( $\mu\text{m}$ )

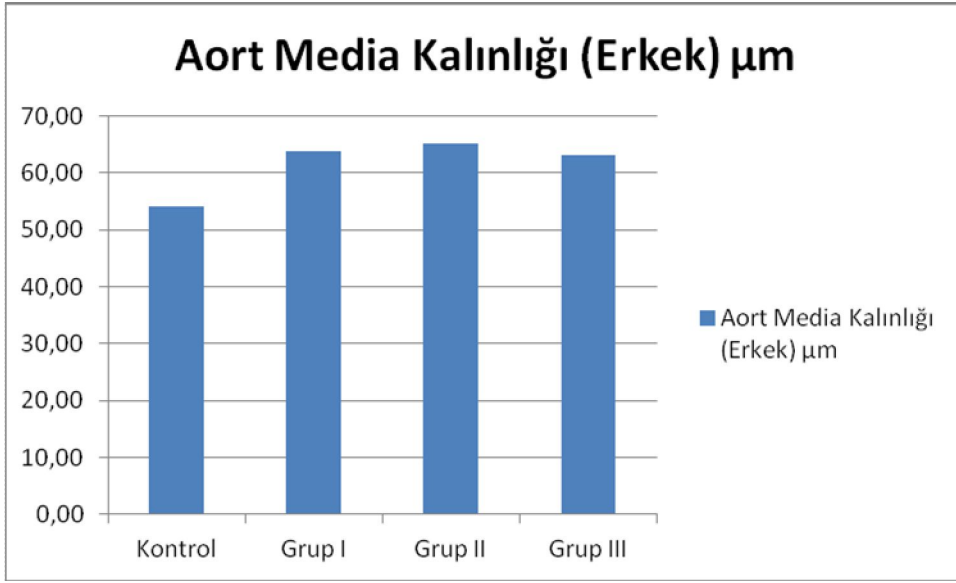


### 3.2.2. Aorta Thoracica'daki Media Kalınlığı

**Erkek hayvanların** aorta thoracica'sının media katmanı incelendiğinde Grup II'deki hayvanlarda en kalın Kontrol grubunda ise en ince olduğu saptanmıştır (Tablo 7.) . Bu durumda deney grupları kendi içlerinde değerlendirildiğinde kastrasyonla media'da bir değişiklik olmadığı ve kastre edilmiş hayvanlara dışarıdan verilen hormon takviyesinin media tabakasında bir etkisinin bulunmadığı gözlemlenmiştir.

Bununla birlikte gruplar arasında istatistiksel olarak önemli derecede bir farklılık bulunmamıştır (Tablo 7.)

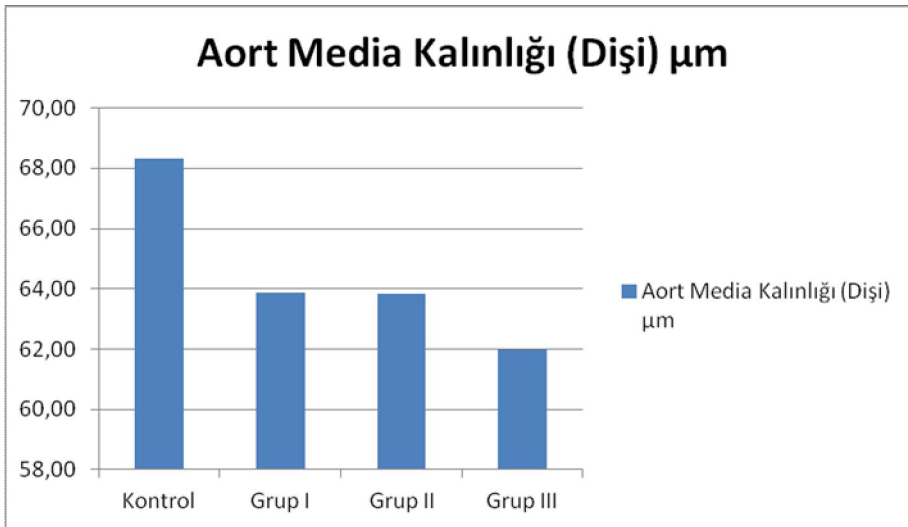
**Çizelge 5.** Erkek hayvanlarda aorta thoracica'nın media kalınlığı (µm)



**Dişi hayvanların** aorta thoracica'sının media katmanı incelendiğinde Kontrol grubu hayvanlarda en kalın Grup III' de en ince olduğu saptanmıştır (Tablo 8, Çizelge 6) . Bu durumda deney grupları kendi içlerinde değerlendirildiğinde ovariyoektomi operasyonu ile media'da bir değişiklik olmadığı ve operasyon yapılan hayvanlara dışarıdan verilen hormon takviyesiyle media tabakasında bir azalma olduğu gözlemlenmiştir.

Bununla birlikte gruplar arasında istatistiksel olarak önemli derecede bir farklılık bulunmamıştır (Tablo 8.).

**Çizelge 6.** Dişi hayvanlarda aorta thoracica'nın media kalınlığı (µm)

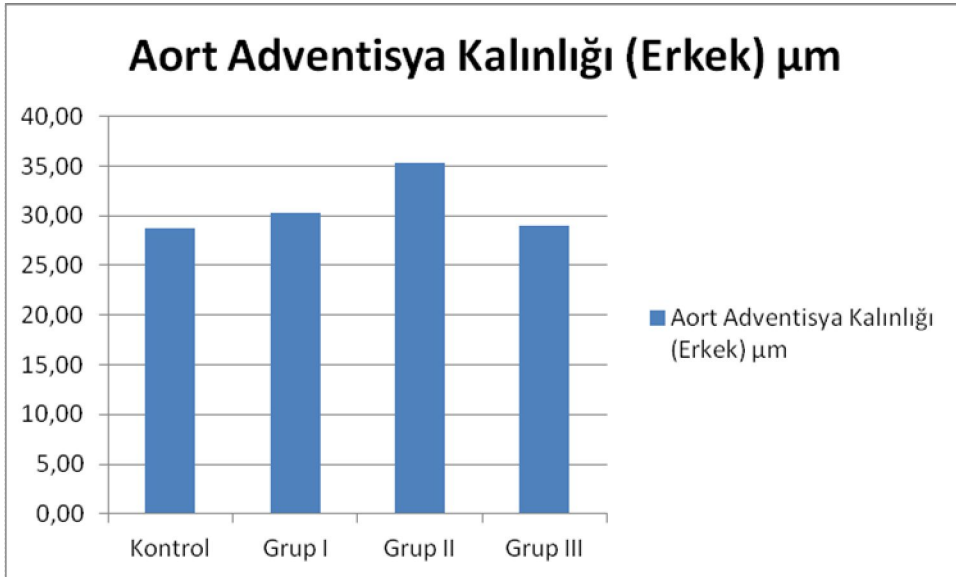


### 3.2.3. Aorta Thoracica'daki Adventisya Kalınlığı

**Erkek hayvanların** aorta thoracica'sının adventisya katmanı incelendiğinde Grup II'deki hayvanlarda en kalın, Kontrol grubunda en ince olduğu saptanmıştır (Tablo 7 ,Çizelge 7.). Bu durumda deney grupları kendi içlerinde değerlendirildiğinde kastrasyonla adventisya'da bir artış olduğu ve kastre edilmiş hayvanlara dışarıdan verilen hormon takviyesinin adventisya tabakasında bir azalmaya neden olduğu gözlemlenmiştir.

Bununla birlikte Kontrol grubu ile Grup II ( $p < 0.05$ ) ve Grup II ile Grup III ( $p < 0.05$ ) arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılıklar bulunmuştur (Tablo 7.)

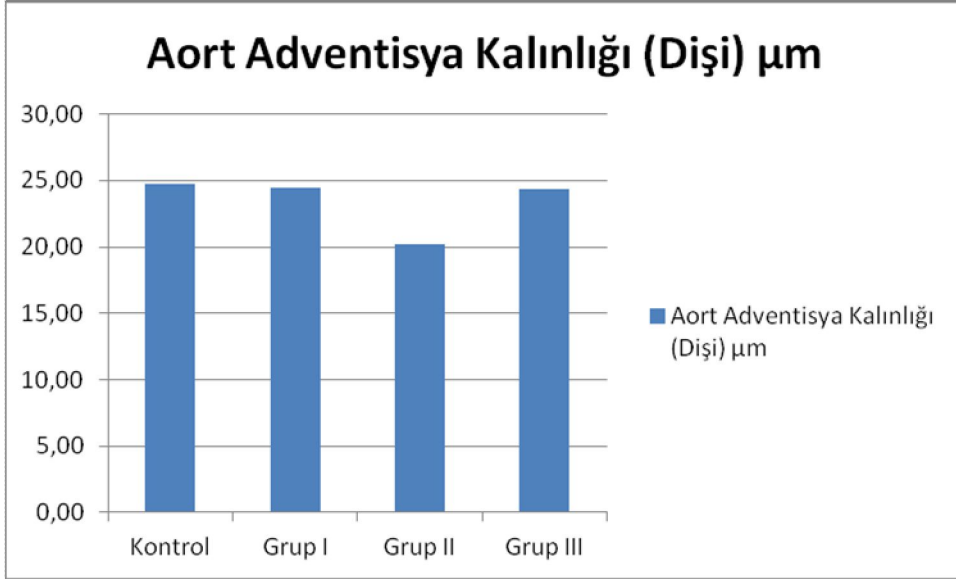
**Çizelge 7.** Erkek hayvanlarda aorta thoracica'nın adventisya kalınlığı ( $\mu\text{m}$ )



**Dişi hayvanların** aorta thoracica'sının adventisya katmanı incelendiğinde Kontrol grubu hayvanlarda en kalın Grup II' de en ince olduğu saptanmıştır (Tablo 8, Çizelge 8.) . Bu durumda deney grupları kendi içlerinde değerlendirildiğinde ovariyoektomi operasyonu ile adventisya'da bir azalma olduğu ve operasyon yapılan hayvanlara dışarıdan verilen hormon takviyesiyle adventisya tabakasında bir artış olduğu gözlemlenmiştir.

Bununla birlikte gruplar arasında istatistiksel olarak önemli derecede bir farklılık bulunmamıştır (Tablo 8 .)

**Çizelge 8.** Dişi hayvanlarda aorta thoracica'nın adventisya kalınlığı (µm)



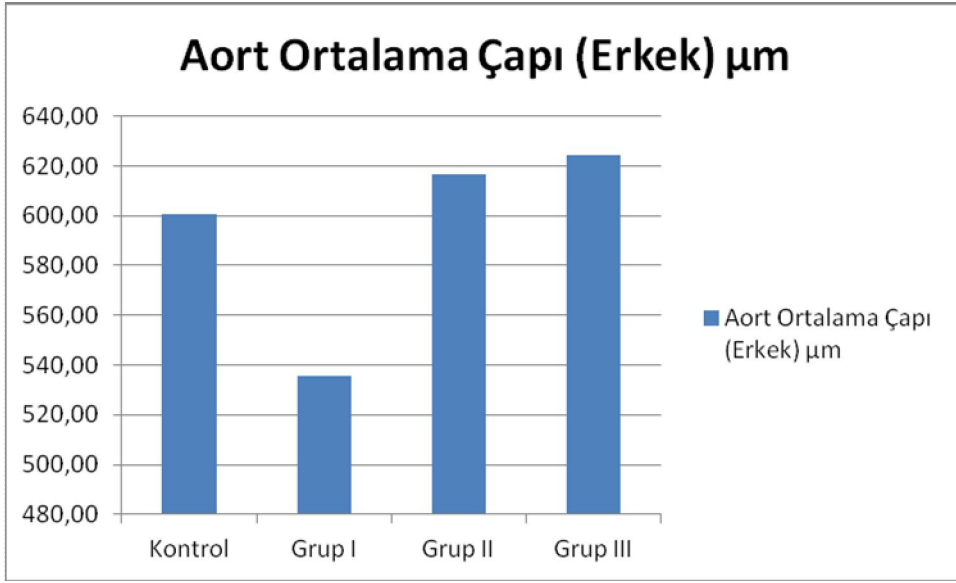
### 3.2.4. Aorta Thoracica'nın Çapı

**Erkek hayvanların** aorta thoracica'sının iç lümen çapı incelendiğinde Grup III' deki hayvanlarda en geniş Grup I 'de ise en dar olduğu saptanmıştır (Tablo 7, Çizelge 9.) . Bu durumda deney grupları kendi içlerinde değerlendirildiğinde kastrasyonla aort çapında bir artış olduğu ve kastre edilmiş hayvanlara dışarıdan verilen hormon takviyesinin bu çapta az bir artışa neden olduğu gözlemlenmiştir.

Bununla birlikte gruplar arasında istatistiksel olarak önemli derecede bir farklılık bulunmamıştır (Tablo 7.)



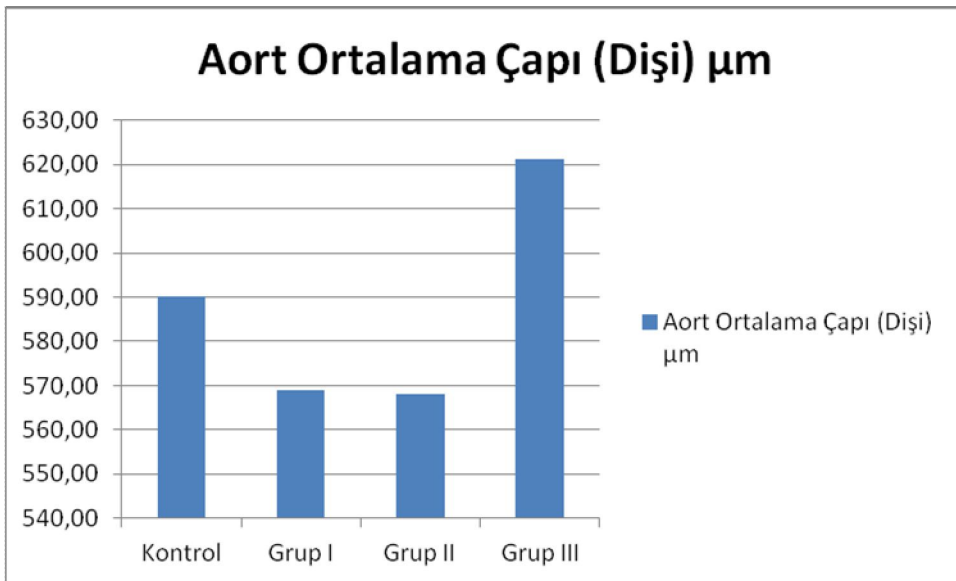
**Çizelge 9.** Erkek hayvanlarda aorta thoracica'nın ortalama çapı (µm)



**Dişi hayvanların** aorta thoracica'sının iç lümen çapı incelendiğinde Grup III'deki hayvanlarda en geniş Grup II' de en dar olduğu saptanmıştır (Tablo 8, Çizelge 10.) . Bu durumda deney grupları kendi içlerinde değerlendirildiğinde ovariyoektomi operasyonu damar çapında bir değişiklik olmadığı ve operasyon yapılan hayvanlara dışarıdan verilen hormon takviyesiyle damar çapında bir artış olduğu gözlemlenmiştir.

Bununla birlikte gruplar arasında istatistiksel olarak önemli derecede bir farklılık bulunmamıştır (Tablo 8 .)

**Çizelge 10.** Dişi hayvanlarda aorta thoracica'nın ortalama çapı (µm)

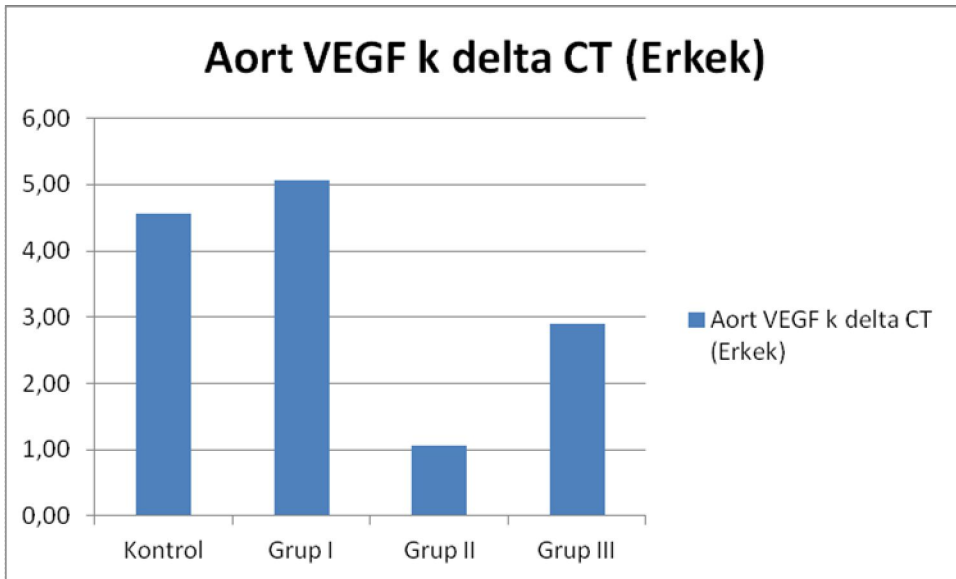


### 3.3. RT-PCR verileri

**Erkek hayvanların** aorta thoracica'sındaki VEGF'nin mRNA değerleri incelendiğinde en fazla değer Grup I hayvanlarda en düşük değer ise Grup II'de görüldüğü belirlenmiştir (Tablo 7, Çizelge 11.). Deneysel gruplar kendi içlerinde değerlendirildiğinde ise kastrasyonla bu değer önemli derecede azaldığı dışarıdan testosteron takviyesi yapılanlarda ise bu değerde bir artış olduğu saptanmıştır.

Bununla birlikte Kontrol grubu ile Grup II ( $p < 0.05$ ) ve Grup I ile Grup II ( $p < 0.05$ ) arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılıklar bulunmuştur (Tablo 7.).

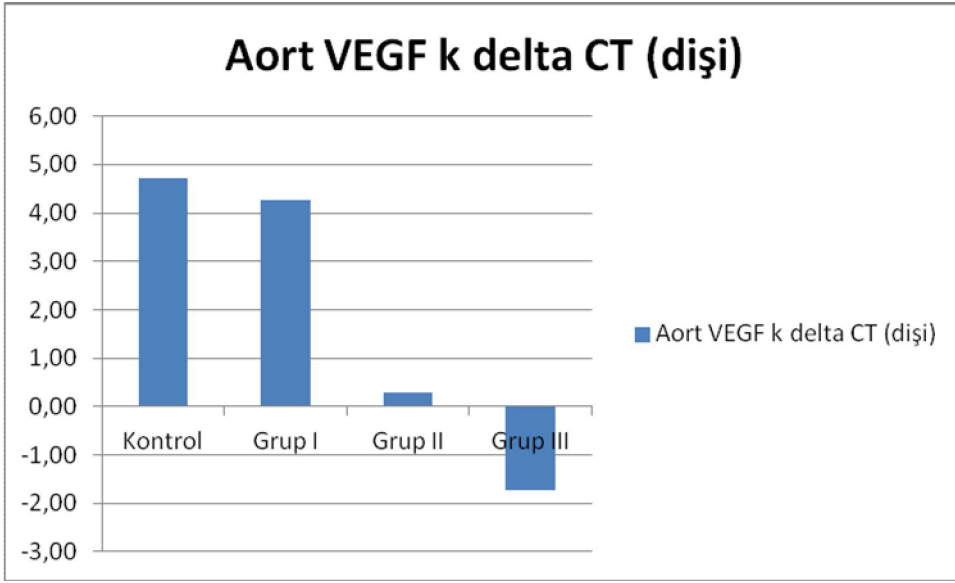
**Çizelge 11.** Erkek hayvanlarda aorta thoracica'daki VEGF değerleri



**Dişi hayvanların** aorta thoracica'sındaki VEGF'nin mRNA değerleri incelendiğinde erkeklerden farklı olarak en fazla değer Kontrol grubu hayvanlarda, en düşük değer ise Grup III'de görüldüğü belirlenmiştir (Tablo 7, Çizelge 12). Deneysel gruplar kendi içlerinde değerlendirildiğinde ise ovarioektomi ile bu değer önemli derecede azaldığı dışarıdan testosteron takviyesi yapılanlarda ise bu değerde önemli derecede bir gerileme olduğu saptanmıştır.

Bununla birlikte Kontrol grubu ile Grup II ile Grup II ( $p < 0.001$ ) ve Grup III ( $p < 0.001$ ) arasında, Grup I ile Grup II ( $p < 0.001$ ) ve Grup III ( $p < 0.001$ ) arasında, Grup II ile Grup III ( $p < 0.05$ ) arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılıklar bulunmuştur (Tablo 7.).

**Çizelge 12.** Dişi hayvanlarda aorta thoracica'daki VEGF değerleri



**Tablo 9.** Erkek hayvan gruplarının aorta thoracica'nın intima, media ve adventisya tabakalarının kalınlıkları (µm), ortalama damar çapı (µm), ve K delta CT değerlerinin kendi içerisinde Tek Yönlü Varyans Analizi (Duncan) ile karşılaştırılması

	Hayvan Grupları	Kontrol	Grup I	Grup II	Grup III
İntima	Kontrol				
	Grup I	0,006242**			
	Grup II	0,010422*	0,623176		
	Grup III	0,006373**	0,922196	0,675677	
Media	Kontrol				
	Grup I	0,155819			
	Grup II	0,117459	0,822844		
	Grup III	0,161199	0,927668	0,764263	
Adventisya	Kontrol				
	Grup I	0,598182			
	Grup II	0,045541*	0,094373		
	Grup III	0,917150	0,650622	0,049090*	
Ortalama çap	Kontrol				
	Grup I	0,521573			
	Grup II	0,871826	0,446657		
	Grup III	0,818289	0,414403	0,936485	
VEGF k delta CT	Kontrol				
	Grup I	0,731546			
	Grup II	0,034476*	0,020594*		
	Grup III	0,261912	0,170609	0,220473	

\* ; p ≤ 0,05, \*\* ; p ≤ 0,01, \*\*\* ; p ≤ 0,001

**Tablo 10.** Dişi hayvan gruplarının aorta thoracica'nın intima, media ve adventisya tabakalarının kalınlıkları (µm), ortalama damar çapı (µm), ve K delta CT değerlerinin kendi içerisinde Tek Yönlü Varyans Analizi (Duncan) ile karşılaştırılması

	Hayvan Grupları	Kontrol	Grup I	Grup II	Grup III
İntima	Kontrol				
	Grup I	0,088884			
	Grup II	0,006264**	0,158068		
	Grup III	0,752937	0,132712	0,009984**	
Media	Kontrol				
	Grup I	0,238079			
	Grup II	0,255725	0,987188		
	Grup III	0,123850	0,619825	0,611636	
Adventisya	Kontrol				
	Grup I	0,924402			
	Grup II	0,264609	0,289954		
	Grup III	0,912631	0,983556	0,276394	
Ortalama çap	Kontrol				
	Grup I	0,715000			
	Grup II	0,720451	0,989754		
	Grup III	0,598006	0,401532	0,407948	
VEGF k delta CT	Kontrol				
	Grup I	0,628161			
	Grup II	0,000345***	0,000674***		
	Grup III	0,000066***	0,000096***	0,042171*	

\* ; p ≤ 0,05, \*\* ; p ≤ 0,01, \*\*\* ; p ≤ 0,001

**Tablo 11.** Erkek ve dişi hayvan gruplarının aorta thoracica'nın intima, media ve adventisya tabakalarının kalınlıkları ( $\mu\text{m}$ ), ortalama damar  $\mathcal{C}$ apı ( $\mu\text{m}$ ), ve K delta CT değerlerinin kandaki Testosteron seviyesiyle aralarındaki korelasyon tablosu

	Hayvan Sayısı (N)	İntima kalınlığı	Media kalınlığı	Adventisya kalınlığı	Ortalama $\mathcal{C}$ ap	VEGF K delta CT
Testosteron seviyesi nmol /L	Erkek (12)	0,34	-0,25	-0,43	-0,15	0,45
	Dişi (10)	0,58	0,44	0,34	0,29	-0,58

Aorta thoracica'daki anjiogenik olaylar ile testosteron seviyesi arasında anlamlı korelasyon bulunamamıştır (Tablo 11).

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmada erkek hayvanlarda kastrasyonla aorta thoracica'nın intima ve media takasında bir değişim gözlenmezken, adventisya katmanında istatistiksel olarak önemli olmayan bir artış olmuştur. Damar çapında istatistiksel olarak önemli olmayan bir artış ve VEGF miktarında istatistiksel olarak önemli bir azalma gözlenmiştir. Kastre hayvanlara dışarıdan yapılan testosteron takviyesiyle intima ve media takasında bir değişim gözlenmezken, adventisya katmanında istatistiksel olarak önemli olmayan bir azalma olmuştur. Damar çapında bir değişim gözlenmezken VEGF miktarında istatistiksel olarak önemli olmayan bir artış gözlenmiştir.

Dişi hayvanlarda ovarioektomi operasyonu ile aorta thoracica'nın intima ve adventisya takasında istatistiksel olarak önemli olmayan bir azalma olurken media tabakasında bir değişim gözlenmemiştir. Damar çapında bir değişim gözlenmezken VEGF miktarında istatistiksel olarak önemli bir azalma gözlenmiştir. Operasyon yapılan hayvanlara dışarıdan yapılan testosteron takviyesiyle intima takasında istatistiksel olarak önemli olmayan bir artış gözlenirken ve media takasında çok az bir azalma, adventisya katmanında çok az bir artış gözlenmiştir. Damar çapında istatistiksel olarak önemli olmayan bir artış gözlenirken, VEGF miktarında istatistiksel olarak önemli bir azalma gözlenmiştir.

Bu çalışma testosteron hormonunun farelerde yaşlılıkta aorta thoracica üzerindeki anjiogenik etkisinin nasıl olduğu ve testosteron takviyesinin, eksikliğinde oluşabilecek değişimlere bir katkısının olup olmayacağını belirlemek açısından orijinal bir çalışmadır. Bu amaçla gonadektomi yapılan yaşlı hayvanların ve dışarıdan testosteron hormonu verilen hayvanların aorta thoracica'larındaki anjiogenik değişimler histolojik ve moleküler olarak incelenmiştir.

Hayvanlarda testosteron hormonu çevresel şartlara göre oldukça değişkenlik göstermektedir. Hormonun etkilerini net bir şekilde görebilmek için bu değişimleri ortadan kaldırıp sabit bir seviyede tutmak gerekir. Bunun için hormonun salgılandığı en önemli yer olan gonadların ortadan kaldırılması yani hayvanlara gonadektomi operasyonu yapılması gerekmektedir. Daha sonra hormon takviyelerinin uygulanır. Hormon takviyelerinde birçok yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar arasında silikon implant (Sieveking ve ark. 2010), depo testosteron (Silva ve ark. 2007) ya da günlük hormon enjeksiyonları

(Nettleship ve ark. 2007) kullanılmaktadır. Buradaki asıl amaç kandaki hormon seviyesini fizyolojik aralıkta tutabilmektir. Yapılan incelemelerde erkek farelerde (10 aylık) plazma testosteron seviyesinin normalde 0.6 nmol/l olduğu bildirilmiştir (Aboudkhil ve ark. 2003). Bizim çalışmamızda erkek hayvanlarda kandaki testosteron seviyesi 6 aylıkken 1.208 nmol/l, 12 aylıkken 0,650 nmol/l, 13 aylıkken (Grup I) 1,517 nmol/l olduğu tespit edilmiştir. Kastrasyon operasyonu sonrası bu değer oldukça azalmış ve 0,089 nmol/l'ye kadar düşmüştür. Kastre erkeklerle dışarıdan verilen hormon takviyesiyle bu seviyenin tekrar fizyolojik seviyeye yükseldiği görülmüştür ( 1.051 nmol/l). Nettleship ve arkadaşları (2007) kastre edilmiş farelerin kandaki fizyolojik testosteron seviyesini sağlayabilmek için 10 µL enjeksiyonun (100 mg/mL Sustanon100) yeterli olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada aynı dozda testosteron hormonu (Sustanon 100) subkutan verilerek kandaki hormon seviyesi fizyolojik aralıkta (1,051 nmol/l) tutulabilmiştir.

Yaşın ilerlemesiyle ya da yaşlılık hallerinde anjiogenezisin geciktiği ya da değişikliğe uğradığı bildirilmektedir. Yaşlı bireylerdeki dokularda kapillar dansitenin genç bireylere oranla gidererek azaldığı ve damarlaşmaya yönelik süreçlerin de hemen hemen % 40 oranında gecikmeye uğradığı belirlenmiştir. Yaşlı dokularda anjiogenik faktörlerin (VEGF, PDGF, FGF, TGF β1) yapımı ve fonksiyonlarındaki gerilemelerin, damar endotellerindeki proliferasyon ve migrasyonu azalttığı kabul edilmektedir. (Reed ve Edelberg 2004, Reed, 2005). Ratlarda yapılan bir çalışmada yaşlanmaya bağlı olarak kandaki testosteron hormonu seviyesindeki azalmanın beyin dokusunda da paralellik gösterdiği belirlenmiştir (Rosario ve ark. 2009). Yaşlılıkla beyinde damar dansitesinde azalma görülmektedir. (Brown ve ark. 2011). Farelerde yapılan deneysel bir çalışmada yaşlanmayla anjiogenezisin, inflamatörük yanıtın ve anjiogenik faktörlerden VEGF ve reseptörünün (VEGFR2) azaldığı saptanmıştır (Sadoun ve Reed 2003). Erkek ratlarda yapılan bir çalışmada yaşlanma ile aorta thoracica'da oluşabilecek morfolojik değişimlerle ekstrasellüler matriks'in yapısındaki değişimleri incelemişlerdir. Sonuçta yaşlılıkla damar çapında artış, media tabasında ise azalmanın görüldüğünü tespit etmişlerdir. Bununla birlikte kollagen, elastin ve hücre sayılarında azalma saptamışlardır.

Bizim çalışmamızda 12 aylık kontrol grubu hayvanlar ile 40 günlük periyod sonrasındaki yalancı operasyon yapılmış Grup I hayvanlar arasındaki karşılaştırmalarda intima katmanında erkeklerde istatistiksel olarak önemli ve dişilerde ise önemli olmayan bir azalma gözlenmiştir. Media tabakasında erkeklerde istatistiksel olarak önemsiz bir artış



dişilerde ise önemsiz bir azalma tespit edilmiştir. Adventisya tabakasında ise her iki cinste de bir değişiklik saptanamamıştır. Damarın iç lümen çapı her iki cinste de istatistiksel olarak önemsiz bir azalma göstermiştir. Aorta'daki anjiogenik faktörlerden VEGF'nin mRNA miktarı bu sürenin sonunda erkeklerde istatistiksel olarak önemsiz bir artış gösterirken dişilerde de önemsiz bir azalma göstermiştir.

Cinsiyet hormonlarının birçok doku ve organlardaki anjiogenik faktörlerin üretimini ve salınımını artırarak damarlaşmaya pozitif yönde etkilerinin olduğu bildirilmektedir (Castillo ve ark. 2005). Östrojen hormonun dişilerdeki genital organlardaki menstrual dönem ve gebelikteki anjiogenik etkisi birçok çalışmaya konu olmuştur (Losordo ve Isner 2001, Albrecht ve ark. 2003). Östrojen'nin damarlardaki endotelial proliferasyon ve migrasyonunu, başta VEGF olmak üzere birçok anjiogenik faktörlerin kontrolüyle sağladığı bilinmektedir (Losordo ve Isner 2001, Rubanyi ve ark. 2002) Ratlarda yapılan bir çalışmada 17 beta östrodiol'un arteria mesenterica cranialis ve aorta thoracica'da akut vazorelaksasyona neden olduğu bildirilmektedir (Tep-areenan ve ark., 2003).

Androjenlerin anjiogeneze olan etkisi ile ilgili olarak az sayıda çalışma yapılmıştır. (Shidaifat 2007, Sieveking ve ark. 2010). Testosteron hormonun erkeklerde, anjiogenik faktörlerden biri olan VEGF'ye bağlı olarak anjiogenezi artırmakta olduğu ve bunun dişilerde etkisinin olmadığını ispat edilmiştir. Androjenler hücre kültürlerinde VEGF aracılığıyla eritropoietin üretiminin stimülasyonu sağlayarak anjiogenezi uyardığı ve endotelial ana hücrelerinin, hormonal olarak düzenlendiği belirlenmiştir. Tam tersi bu hormonların eksikliğinde yani kastrasyonda damarlaşmada gerileme olduğu saptanmıştır (Sieveking ve ark. 2010). Köpeklerde kastrasyonla prostat bezinde VEGF nin hem transkripsiyonun hem de translasyonunun azaldığı saptanmıştır (Shidaifat ve ark. 2007). Tfm (testicular feminized mice) farelerde yapılan bir çalışmada, testosteron azalması ve androjen reseptör eksikliğine bağlı olarak damar (a. femoralis) endoteli fonksiyonlarında bir azalma ve kalsiyum kanal aktivitelerinde bozulma yaptığı saptanmıştır (Jones ve ark. 2003). Genç erkek farelerde kastrasyonla beyindeki androjen reseptörlerinin on kat kadar azaldığı görülmüştür (Silva ve ark. 2007). Ergin ratlarda deneysel olarak oluşturulan myokardiyal infarkt olayında kastrasyon ile kapillar dansitesinin azaldığı belirlenmiştir (Chen ve ark. 2012). Erkek hayvanlarda kastrasyon ile yani testosteron hormonunun eksikliğiyle damarlaşmadaki azalmanın belirlenmesi bu olgunun etkilerini kanser dokusu üzerinde incelemeye yöneltmiştir. Bu konuda en çok çalışma prostat kanserlerinde

yapılmıştır. Bu amaçla ratlarda yapılan bir çalışmada tek başına kastrasyonun prostat kanserlerinde kısa süreli olarak bir anti anjiyogenik ilaç gibi damar dansitesini azaltarak hipoksi ve apoptosizsi artırarak tümör gelişimini yavaşlattığı belirlenmiştir (Hammarsten ve ark. 2006). Östrojen ve androjenler kanser hücre kültürlerinde VEGF nin m RNA sının stabilizasyonunu ve gen transkripsiyonunda artış sağladığı tespit edilmiştir (Ruohola ve ark. 1999). Bizim yaptığımız çalışmada yaşlı erkek hayvanlara (12 ay) uygulanan gonadektomi operasyonun etkilerini görmek için Grup I ve Grup II hayvanlar karşılaştırıldığında; aorta thoracica'nın intima katmanında erkeklerde bir değişiklik gözlenmezken, dişilerde ise istatistiksel olarak önemli olmayan bir azalma tespit edilmiştir. Media tabakasında her iki cinste de bir değişiklik saptanamamıştır. Adventisya tabakasında erkeklerde istatistiksel olarak önemsiz bir artış, dişilerde ise önemsiz bir azalma saptanmıştır. Damar çapında erkeklerde istatistiksel olarak önemsiz bir artış gözlenirken, dişilerde bir değişiklik saptanamamıştır. Gonadectomi operasyonu, aorta'da VEGF'nin m RNA miktarında her iki cinste de istatistiksel olarak önemli derecede azalmaya sebep olmuştur.

Yaşlılıkta ve gonadektomi operasyonu ile damarlaşmada görülen değişimlere, androjenlerin nasıl bir etkisinin olabileceğini saptamak için gonadektomi yapılmış yaşlı hayvanlara testosteron hormonu takviyeleri uygulanarak aorta'daki değişimler incelenmiştir. Yapılan literatür taramalarına göre; Sordello ve arkadaşları (1998) testosteron hormonunun prostat hücre kültürlerinde (insan) VEGF nin mRNA larında ve biyolojik aktivitelerinde bir artışa neden olduğunu saptamışlardır. İn vivo olarak testosteron enjekte edilen ratlarda ise prostat ventral lob ağırlığında geçici bir artış ve prostata ait VEGF'nin spesifik aktivitesinde 7 kat artışa neden olduğu gözlemlenmişlerdir. Genç erkek farelerde kastrasyonla beyindeki androjen reseptörlerinin on kat kadar azaldığı testosteron tedavisiyle bu reseptör miktarının diğer normal hayvanlardaki seviyeye tekrar ulaştığı saptanmıştır (Silva ve ark. 2007). Erkeklerde iskemik yaralanmalarda endojen androjenlerin neovaskülerizasyonun sağlanmasında etkili olduğu gösterilmiştir (Sieveking, ve ark. 2010). Androjen tedavisi uygulanan ergin dişi kanaryalarda testosteron hormonunun VEGF ve onun reseptörü flk 1'in üretimini indükleyerek beyindeki ses merkezinindeki (HVC) endotel hücrelerinde beyin kaynaklı nörotrofik faktör üretimini artışına yol açtığı bunun sonucunda ise bu hücrelerde bölünme ve sinir hücrelerine farklılaşma ile bu bölgelerde damarlaşmada artış tespit edilmiştir (Hartog ve ark. 2009).

Chen ve arkadaşları (2009) ovarioektomili hayvanlarda deneysel olarak oluşturulan myokardiyal infarkt olayında östrojen tedavisiyle kemik iliği kök hücrelerin mobilizasyonunun ve kapillar dansitenin artışıyla anjiogenezisin sağlandığını belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar (2012) bu sefer kastrasyon ve testosteron tedavisinin angiogenik etkisini incelemişler. Kastre hayvanlarda VEGF ekspresyon seviyesinin ve kapillar dansitenin azaldığı belirlenmiştir. Testosteron tedavisiyle oluşan bu ters etkilerin düzeldiğini saptanmışlardır. Testosteron hormonunun kalp krizinin patofizyolojinde önemli bir rolünün olduğu ve hormon tedavisinin bu bağlamda faydalı etkilerinin olduğu bildirilmektedir (Kang ve ark. 2012). Kastre edilmiş farelere dışarıdan yapılan östrojen ve androjen tedavisinin etkileri incelenmiştir. Sonuçta androjenlerin östrojene göre daha belirgin olarak kalp kasında artışa dolayısıyla anjiogenezise neden olduğu saptanmıştır (Svensson ve ark. 2010). Androjenlerin anjiogenezisde rol alan endotelial öncü hücreler üzerine etkisi incelenmek üzere yapılan invitro çalışmalarda testosteronun geç dönem endotelial öncü hücrelerin gelişimi ve fonksiyonunda bir etkisinin bulunmazken, erken dönemdeki hücrelerde pozitif düzenleyici etkisinin olduğunu tespit edilmiştir. Ratlarda kastrasyonla kandaki bu öncü hücrelerin azaldığı, testosteron tedavisiyle normal seviyeye çıkarılmadığı tespit edilmiştir. Bu olayın ise ratlarda bulunan çok düşük seviyedeki östrojenle ilişkili olabileceği ve testosteronun direkt etkisinin olamayacağı sonucunu çıkarmışlardır (Fadini ve ark. 2009). Erkek ratlarda abdominal aorta'da testosteron hormonunun direkt potasyum kanallarını açıp, kalsiyum kanallarını ise bloke ederek relaksasyona neden olduğu tespit edilmiştir (Oloyo ve ark. 2011). Cai ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan invitro bir çalışmada testosteron hormonunun primer insan aorta endotel hücre kültürlerinde androjen reseptörlerinin ve VEGF'nin gen ekspresyonunu artışına ve hücre proliferasyonunu sağladığı belirlenmiştir. Birçok hayvanda (rat, tavşan, köpek) testosteron hormonunun damarlarda (thoracic aorta, koroner damar) akut vazodilatator etkisinin olduğu saptanmıştır. Bu etkinin ise cinsiyete dayalı olduğu, androjen reseptörlerinden ve endoteliumdan bağımsız şekillendiği saptanmıştır (Andrew ve ark., 2001, Alvarez ve ark., 2010, Costeralla ve ark. 1996) Androjenlerin erkeklerde miyokardial iskemi insidensini azatırken, atherogenik etkiye de sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Bu bağlamda, yapılan invitro bir çalışmada testosteronun damarlardaki reseptörleriyle etkileşerek düz kas hücrelerinde proliferasyonu sağladığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu etkiyi sağlayan bir genin (PTOV1) olduğu ispat edilmiştir (Nakamura ve ark. 2006).

Bizim çalışmamızda yaşlı gonadektomize hayvanlara dışardan testosteron hormonu takviyesiyle aorta thoracica'nın intima katmanında erkeklerde bir değişiklik gözlenmezken, dişilerde ise istatistiksel olarak önemli bir artış tespit edilmiştir. Media tabakasında erkeklerde yine bir değişiklik gözlenmezken, dişilerde ise istatistiksel olarak önemsiz bir azalma saptanmıştır. Adventisya tabakasında erkeklerde istatistiksel olarak önemli bir azalma, dişilerde ise önemsiz bir artış saptanmıştır. Damar çapında erkeklerde bir değişiklik gözlenmezken, dişilerde istatistiksel olarak önemsiz bir artış belirlenmiştir. Hormon takviyesi, aorta'da VEGF'nin mRNA miktarında erkeklerde istatistiksel olarak önemsiz derecede artışa, dişilerde ise istatistiksel olarak önemli bir azalmaya sebep olmuştur.

Androjenler anjiyogenezisde cinsiyete göre farklı etki göstermektedirler. Bu bağlamda yapılan in vitro çalışmalarda androjenlerin reseptörleriyle birlikte erkeklerde anjiogenik olayları stimüle ettiği, dişilerde ise bunun görülmediği saptanmıştır. Ayrıca invivo çalışmalarda endojen androjenlerin erkeklerde anjiogenezisi düzenlediği dişilerde ise bunun görülmediği belirlenmiştir (Sieveking ve ark. 2010). Dişilerde damarlaşmada androjenler yerine östrojen hormonunun etkili olduğunu gösteren bir çalışmada 44 haftalık ratlara ovariectomi operasyonu yapıldığında beyindeki (frontal korteks) damar yoğunluğunun ve VEGF ile reseptörlerinin azaldığı, östrojen tedavisiyle bu değişimlerin tamamen düzeldiği tespit edilmiştir (Jesmin ve ark. 2003). Birçok hayvanda (rat, tavşan, köpek) testosteron hormonunun damarlarda (aorta thoracica, a.coronaria) akut vazodilatator etkisinin olduğu saptanmıştır. Bu etkinin ise cinsiyete dayalı olduğu, androjen reseptörlerinden ve endoteliumdan bağımsız şekillendiği saptanmıştır (Andrew ve ark., 2001, Alvarez ve ark., 2010, Costeralla ve ark. 1996) Bizim çalışmamızda ise gonadektomi operasyonu ile erkek hayvanlarda aorta thoracica'nın intima ve media tabakasında bir değişim gözlenmezken, adventisya katmanında istatistiksel olarak önemli olmayan bir artış olmuştur. Dişilerde ise aorta thoracica'nın intima ve adventisya tabakasında istatistiksel olarak önemli olmayan bir azalma olurken, media tabakasında bir değişim gözlenmemiştir. Erkeklerde damar çapında istatistiksel olarak önemli olmayan bir artış gözlenirken, dişilerde bir farklılık saptanamamıştır. VEGF miktarında her iki cinste de istatistiksel olarak önemli bir azalma gözlenmiştir. Gonadektomize edilmiş hayvanlara dışarıdan yapılan testosteron takviyesiyle erkeklerde intima ve media tabakasında bir değişim gözlenmezken, adventisya katmanında istatistiksel olarak önemli olmayan bir azalma

olmuştur. Dişilerde ise aorta thoracica'nın intima ve adventisya tabakasında istatistiksel olarak önemli olmayan bir azalma olurken media tabakasında bir değişim gözlenmemiştir. Damar çapında erkeklerde bir değişim gözlenmezken, dişilerde istatistiksel olarak önemli olmayan bir artış saptanmıştır. VEGF miktarında erkeklerde istatistiksel olarak önemli olmayan bir artış varken, dişilerde istatistiksel olarak önemli bir azalma gözlenmiştir.

Çalışmanın çeşitli aşamalarında bazı hayvanlarda ölüm görülmüş, bazı doku kesitleri üst üste binmiş bu nedenle ölçümler alınamamıştır. Bu nedenle istatistiksel analizler örnek sayısının bazı gruplarda az olması sonuçları etkileyebilir. Daha fazla hayvan ve kesit sayısı ile yapıldığında sonuçlarda bir değişiklik meydana gelebilir.

Sonuç olarak; yaşlılık dönemindeki farelerde ilerleyen yaşa bağlı (12 ay + 40 günlük) aorta thoracica'da histolojik olarak erkeklerde ortalama damar kalınlığında (intima + media) bir artış gözlenirken, iç lümen çapında bir daralma görülmektedir. Dişilerde damar kalınlığında erkeklerin tersine azalma gözlenirken, iç lümen çapında erkeklerdekine benzer bir daralma tespit edilmiştir. Oluşan bu duruma karşılık VEGF miktarında erkeklerde bir artış, dişilerde ise bir azalma olduğu görülmüştür.

Yaşlı erkek hayvanlarda androjenlerin eksikliği histolojik olarak aorta thoracica'da ortalama damar kalınlığında bir değişiklik görülmezken, lümen çapında bir genişlemeye neden olduğu gözlenmiştir. Dişilerde cinsiyet hormonlarının eksikliğinde, ortalama damar kalınlığında ve iç lümen çapında bir değişiklik saptanamamıştır. Cinsiyet hormonlarındaki bu eksikliğin her iki cinsten de VEGF miktarında bir azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Bu hayvanlara dışarıdan testosteron hormonu verilmesiyle erkeklerde aorta thoracica'da ortalama damar kalınlığında ve iç lümen çapında bir değişiklik saptanamamıştır. Dişilere verilen testosteron hormonu takviyesiyle ortalama damar kalınlığında bir değişiklik görülmezken, iç lümen çapında genişleme saptanmıştır. Hormon takviyesiyle VEGF miktarında erkeklerde artış gözlenirken, dişilerde azalma saptanmıştır.

Yaşın ilerlemesi ile ya da yaşlılık hallerinde anjiyogenezisin geciktiği yada değişikliğe uğradığı tespit edilmiştir. Yaşlı bireylerdeki dokularda kapillar densitenin genç bireylere oranla giderek azaldığı ve damarlaşmaya yönelik süreçlerinde hemen hemen %40 oranında gecikmeye uğradığı belirlenmiştir. Yaşlı dokularda anjiogenik faktörlerin (VEGF, PDGF, FGF, TGF- $\beta$ 1) yapımı ve fonksiyonlarındaki gerilemelerin damar endotelindeki proliferasyon ve migrasyonu azalttığı kabul edilmektedir (Reed ve Edelberg 2004)

# YAŞLANMA VE TESTOSTERON'UN AORTA'DAKİ ANJİOGENİK ETKİSİ

## ÖZET

Damarlaşma (anjiogenezis), fizyolojik olarak önceden var olan kan damarlarından yeni damarların gelişmesi olarak tanımlanmaktadır. Doku ve organlarda damarlaşmayı (anjiogenezis) uyarıcı protein yapısında, anjiogenik faktörler bulunmaktadır. Bu faktörlerin sentezi ve uyarımını sağlayan birçok etken sayılabilir. Testosteron hormonunun anjiogenezise olan etkisiyle ilgili az sayıda ve kısıtlı çapta çalışmaya rastlanılmıştır. Anjiogenezisi uyarıcı ya da artırıcı etmenlerin yanı sıra bu sürecin yaşa bağlı değişimi de söz konusudur. Yaşın ilerlemesiyle anjiogenezin geciktiği ya da değişikliğe uğradığı tespit edilmiştir. Bu iki farklı etkenin yani yaş ve testosteron hormonunun birlikte anjiogenezisi memelilerde nasıl etkilediğine dair hiçbir literatür bilgiye ulaşılamamıştır. Bu projedeki amaç; farelerde testosteron hormonunun yaşa bağlı olarak aorta'daki anjiogenik etkisinin moleküler ve histolojik yöntemlerle belirlenmesidir. Bu amaçla gonadektomi yapılan farelere ve testosteron tedavisi uygulanmış olanların farelerin aorta thoracica'sından alınan örneklerde intima, media ve adventisya katmanlarının kalınlığı ile damar lümenin iç çapı ölçülmüştür. Alınan doku örneklerinin bir kısmından RT PCR ile anjiogenik faktörlerden vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) ekspresyonu kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

Yaşlı erkek hayvanlarda androjenlerin eksikliği aorta thoracica'nın lümen çapında bir genişlemeye neden olduğu gözlenmiştir. Cinsiyet hormonlarındaki bu eksikliğin her iki cinsten de VEGF miktarında bir azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Bu hayvanlara dışarıdan testosteron hormonu verilmesiyle dişilerde iç lümen çapında genişleme saptanmıştır. Hormon takviyesiyle VEGF miktarında erkeklerde artış gözlenirken, dişilerde azalma saptanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** anjiogenezis, testosteron, yaş, aorta, VEGF, fare

# ANGIOGENIC EFFECTS OF TESTOSTERONE AND AGING IN THE AORTA

## SUMMARY

Angiogenesis is a physiological process involving the growth of new blood vessels from pre-existing vessels. Angiogenic factors, found in a lot of organs and tissues, are made of protein and stimulate angiogenesis. There are many factors for increase of synthesis or stimulation of angiogenic agents. There are few and limited studies about the effect of testosterone on angiogenesis. In addition to the factors mentioned above angiogenesis is also affected by the age. It is now known that the interruption and changes in angiogenesis by aging play as a major factor. There is no literature about how aging and testosterone hormone affect the angiogenesis in mammalian. The purpose of this project is determination the angiogenic effect of testosterone hormone depending on the age in mice aorta by molecular and histological methods. For this; intima, media and adventitial layer thickness and the inner diameter of thoracic aorta in gonadectomized and testosterone treatment applied to mice was measured. Additionally, expression of the angiogenic factor, vascular endothelial growth factor (VEGF), was assessed qualitatively and quantitatively by RT PCR.

Androgen deficiency to cause an expansion in lumen diameter of aorta thoracica were observed in male aged animals. This lack of sex hormones in both sexes are also cause a reduction in the amount of VEGF, respectively. Administering testosterone to female the inner lumen diameter expansion was determined. With hormone supplements, increase in the amount of VEGF was observed in male, the decline was noted in females.

**Keywords:** angiogenesis, testosterone, age, aorta, VEGF, mouse.

## KAYNAKLAR

Aboukhalil S, Zaïd A, Henry L, Bureau JP. Influence of age, castration, and testosterone on T cell subsets. *Biology of the Cell* 2003;95: 9–16.

Abulafia O, Triest WE, Sherer DM, Hanses CC, Ghezzi F., angiogenesis in endometrial hyperplasia and stage I endometrial carcinoma *Obstet Gynecol* 1995: 86: 479-85

Albrecht E D., Babischkin JS, Lidor Y., Anderson LD, Udoff L C., Pepe G J Effect of estrogen on angiogenesis in co-cultures of human endometrial cells and microvascular endothelial cells, *Human Reproduction* Vol.18, No.10 pp. 2039±2047, 2003

Alvarez E., Cairraõ E., Morgado M., Morais C., Verde I. Testosterone and Cholesterol Vasodilation of Rat Aorta Involves L-Type Calcium Channel Inhibition Hindawi Publishing Corporation *Advances in Pharmacological Sciences* Volume 2010

Andrew Q. Ding, John N. Stallone Testosterone-induced relaxation of rat aorta is androgen structure specific and involves K1 channel activation *J Appl Physiol* 91: 2742–2750, 2001

Artan ME. *Histoloji İstanbul: İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Prof. Dr. Nazım Terzioğlu Basım Atölyesi* 1988 Syf: 201-215

Alexandersen P, Christiansen C. The aging male: testosterone deficiency and testosterone replacement. An up-date, Review, *Atherosclerosis* 2004;173:157–169.

Brown WR, C. R. Thore CR. Cerebral microvascular pathology in ageing and neurodegeneration. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2011; 37; 56–74.

Castillo C., Cruzado M., Ariznavarreta C., Lahera V., Cachofeiro V., Gil-Loyzaga P., Tresguerres J.A. F Effects of Ovariectomy and Growth Hormone Administration on body composition and vascular function and structure in old female rats. *Biogerontology* (2005) 6: 49–60



Cai J, Hong Y, Weng C, Tan C, Imperato-McGinley J, Zhu Y-S. Androgen stimulates endothelial cell proliferation via an androgen receptor/VEGF/cyclin A-mediated mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300: H1210–H1221, 2011. First published January 21, 2011; doi:10.1152/ajpheart.01210.2010

Chen Y, Fu L, Han Y, Teng Y, Sun J, Xie R, Cao J. Testosterone replacement therapy promotes angiogenesis after acute myocardial infarction by enhancing expression of cytokines HIF-1a, SDF-1a and VEGF. *European Journal of Pharmacology* 2012; 684: 116–124.

Davis PJ, Davis FB, Mousa SA. Thyroid hormone-induced angiogenesis *Curr Cardiol Rev.* 2009 Jan;5(1):12-6.

David A. Kendall, Michael D. Randall Mechanisms of vasorelaxation to testosterone in the rat aorta Patcharin Tep-areenan *European Journal of Pharmacology* 465 (2003) 125–132

Deveci D, Marshall JM, Egginton S, Relationship between capillary angiogenesis, fiber type and fiber size in chronic systemic hypoxia *Am J Physiol* 2001;281;H241-52

Deveci D., Anjiyogenezis, Arteriyogenezis ve Vaskülojenezis Terimlerinin Anlamları Ve Hipoksik Ve/Veya İskemik Koşullarda Anjiyogenezis *Genel Tıp Dergisi* 2003; 13(3): 141-151

Doğan A. Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri Olgularında Radyoterapinin Serum Vasküler Endotel Büyüme Faktörü Ve Periferik Kan Trombosit Düzeylerine Etkisi *Uzmanlık Tezi* T.C. Sağlık Bakanlığı Şişli Eftal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Radyasyon Onkolojisi kliniği İstanbul 2006

Douglas W. Losordo and Jeffrey M. Isner Estrogen and Angiogenesis : A Review *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001;21;6-12

Dursun N. Veteriner Komparatif anatomi Dolaşım Sistemi (Angiologia) Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi 1981

Dursun N. Veteriner Anatomi II Ankara: Medisan Yayınevi 1996 186-287.

Fadini GP, Albiero M, Cignarella A, Bolego C, Pinna C, Boscaro E, Pagnin E, De Toni R, de Kreutzenberg S, Agostini C, Avogaro A. Effects of androgens on endothelial progenitor cells in vitro and in vivo. *Clinical Science* 2009; 117: 355–364.

Glinskii OV., Abraha TW., Turk JR., Glinsky VV., Huxley VH., PDGF/VEGF System Activation And Angiogenesis Following Initial Postovariectomy Meningeal Microvessel Loss *Cell Cycle* 7:10, 1385-1390; 15 May 2008]; ©2008 Landes Bioscience

Gustavsson H, Jennbacken K, Welen K, Damber JE. Altered Expression of Genes Regulating Angiogenesis in Experimental Androgen-Independent Prostate Cancer. *The Prostate* 2008; 68: 161-170

Gutman G, Barak V, Maslovitz S, Amit A, Lessing JB, Geva E. Regulation of vascular endothelial growth factor-A and its soluble receptors Flt-1 by luteinizing hormone in vivo: implication for ovarian follicle angiogenesis. *Fertil Steril.* 2008 Apr;89(4):922-6. Epub 2008 Mar 17.

Güran Ş, Kalp Yetmezliğinde Anjiyogenezis ve Gen Tedavisi *Gülhane Tıp Dergisi* 46 (1): 84-87 (2004)

Hammarsten P, Halin S, Wiksto P, Henriksson R, Haiggstrom S, Rudolfsson, Bergh A Inhibitory Effects of Castration in an Orthotopic Model of Androgen-Independent Prostate Cancer Can Be Mimicked and Enhanced by Angiogenesis Inhibition, *Clin Cancer Res* 2006;7431 12(24) December 15, 2006

Hanke H, Lenz C, Hess B, Spindler KD, Weidemann W. Effect of Testosterone on Plaque Development and Androgen Receptor Expression in the Arterial Vessel Wall. *Circulation* 2001;103:1382-1385.

Hartog TE, Dittrich F, Pieneman AW, Jansen RF, Frankl-Vilches C, Lessmann V, Lilliehook C, Goldman SA, Gahr M. Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling in the HVC Is Required for Testosterone-Induced Song of Female Canaries. *The Journal of Neuroscience* 2009; 29(49):15511–15519

Hassa O., Aştı RN., *Embriyoloji (Genişletilmiş Üçüncü Baskı)* Ankara 1997

Iliescu R, Reckelhoff JF. Testosterone and vascular reactivity. *Clinical Science* 2006; 111, 251–252

Jesmin S, Hattori Y, Sakuma I, Liu MY, Mow CN, Kitabatake A. Estrogen Deprivation and Replacement Modulate Cerebral Capillary Density With Vascular Expression of Angiogenic Molecules in Middle-Aged Female Rats. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 23:181–189 © 2003

Jones RD, Pugh PJ, Hall J, Channer KS, Jones TH. Altered circulating hormone levels, endothelial function and vascular reactivity in the testicular feminised mouse. *European Journal of Endocrinology* 2003;148: 111–120

Kılıç T, Yıldırım Ö, Şahin S, Pamir MN, Glial Tümörlerin Anjiyogenezisi *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 2005, Cilt.:, Sayı:1, 1-9

Konukoğlu D., Turhan ST. Anjiyogenezin Temel Moleküler Mekanizmaları ve Tümör Anjiyogenezisi *Cerahpaşa Tıp Dergisi* 2005; 36: 42-48

Kang NN, Fu L, Xu J, Han Y, Cao JX, Sun JF, Zheng M. Testosterone improves cardiac function and alters angiotensin II receptors in isoproterenol-induced heart failure. *Archives of Cardiovascular Disease* 2012; 105: 68—76.

Kearney ML, Hurn FPD. Testosterone as a Modulator of Vascular Behavior, *Biological Research For Nursing* 2004;5(4), 276-285.

König HE, Liebich HG, *Veterinary Anatomy of Domestic Mammals Textbook and Colour Atlas 3rd Edition* 2007 Schattaver GmbH, Höldertinsstrabe3 70174 Stuttgart, Germany (König ve Liebich, 2007)

Nettleship JE, Jones TH, Channer KS, Jones RD. Physiological testosterone replacement therapy attenuates fatty streak formation and improves high-density lipoprotein cholesterol in the tfm mouse an effect that is independent of the classic androgen receptor. *Circulation* 2007;116:2427-2434

Nakamura Y, Suzuki T, Igarashi K, Kanno J, Furukawa T, Tazawa C, Fujishima F, Miura I, Ando T, Moriyama N, Moriya T, Saito H, Yamada S, Sasano H, a novel testosterone-induced atherogenic gene in human aorta *Journal of Pathology J Pathol* 2006; 209: 522–531

Oloyo AK., Sofola O A ., Nair R R, Harikrishnan V.S., Fernandez A C., Testosterone relaxes abdominal aorta in male Sprague–Dawley rats by opening potassium (K<sup>+</sup>) channel and blockade of calcium (Ca<sup>2+</sup>) channel *Pathophysiology* 18 (2011) 247–253

Ornitz DM., Itoh N., Fibroblast Growth Factor Genome Biology 2001, 2(3): reviews3005.1-3005.12

Otrock ZK., Mahfouz RAR., Makarem JA., Shamseddine AI., Understanding the Biology of Angiogenesis: Review of the Most Important molecular Mechanisms, *ScienceDirect Blood Cells, Molecules, and Diseases* 39 (2007) 212-220

Özuyosal S, Tümöral Angiogenesis *Türk Patoloji Dergisi* 17 (3-4): 90-93 (2001)

Rhee Y, Park SY, Kim YM, Lee S, Lim SK. Angiogenesis inhibitor attenuates parathyroid hormone-induced anabolic effect. *Biomed Pharmacother.* 2009 Jan;63(1):63-8. Epub 2007 Nov 20.

Reece WO. *Dukes Veteriner Fizyoloji Malatya: Türkçe Birinci Baskı Medipres Matbaacılık yayıncılık Ltd. Şti.* 2008: 193-359

Reed MJ, Bradshaw AD, Shaw M, Sadoun E, Han N, Ferrara N, Funk S, Puolakkainen P, Sage EH. Enhanced Angiogenesis Characteristic Of Sparc-Null Mice Disappears With Age. *Journal of Cellular Physiology* 2005; 204:800–807.

Reed MJ, Edelberg JM. Impaired Angiogenesis in the Aged. *Sci. Aging Knowl. Environ.* 2004;18 (7): pe7.

Rosario ER, Chang L, Beckett TL, Carroll JC, Murphy MP, Stanczyk FZ, Pike CJ. Age-related changes in serum and brain levels of androgens in male Brown Norway rats. *Neuro Report* 2009; 20: 1534–1537.

Rubanyia GM, Johnsb A, Kauser K, Effect of estrogen on endothelial function and angiogenesis. *Vascular Pharmacology* 38 (2002) 89– 98

Ruohola JK, Valve EM, Karkkainen MJ, Joukov V, Alitalo K, Härkönen PL. Vascular endothelial growth factors are differentially regulated by steroid hormones and antiestrogens in breast cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1999; 149: 29–40.

Sadoun E, Reed MJ. Impaired Angiogenesis in Aging Is Associated with Alterations in Vessel Density, Matrix Composition, Inflammatory Response, and Growth Factor Expression. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2003;51(9):1119–1130.

Shidaifat F, Gharaibeh M, Bani-Ismail Z. Effect of castration on extracellular matrix remodeling and angiogenesis of the prostate gland. *Endocr J.* 2007; 54(4):521-529.

Sieveking D P, René W.Y. Chowa and Martin K.C ,Androgens, angiogenesis and cardiovascular regeneration. *Ng a,b,c Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity* 2010, 17:277–283

Silva MA, Dorantes MR, Baig S, Montor JM. Effects of castration and hormone replacement on male sexual behavior and pattern of expression in the brain of sex-steroid receptors in BALB/c AnN mice. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 2007;147: 607–615.

Soares R., Balogh G., Guo S., Gartner F., Russo J., Schmitt F., Evidence for the Notch Signaling Pathway on the Role of Estrogen in Angiogenesis *Molecular Endocrinology* 18(9):2333–2343 2003

Sordello S, Bertrand N, Plouet J. Vascular Endothelial Growth Factor Is Up-Regulated in Vitro and in Vivo by Androgens. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 1998; 251: 287–290.

Struman I, Bentzien F, Lee H, Mainfroid V, D'Angelo G, Goffin V, Weiner RI, Martial JA. Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Feb 16;96(4):1246-51.

Svensson J, Movérare-Skrtic S, Windahl S, Swanson C, Sjögren K. Stimulation of both estrogen and androgen receptors maintains skeletal muscle mass in gonadectomized male mice but mainly via different pathways. *Journal of Molecular Endocrinology* 2010; 45: 45–57.

Tanyolaç A. Özel Histoloji Ankara 1999 ; 32-38

Tep-areenan P, David A. Kendall, Michael D. Randall Mechanisms of vasorelaxation to 17 $\alpha$ -oestradiol in rat arteries *European Journal of Pharmacology* 476 (2003) 139– 149

Trousdale RK, Pollak SV, Klein J, Lobel L, Funahashi Y, Feirt N, Lustbader JW. Single-chain bifunctional vascular endothelial growth factor (VEGF)-follicle-stimulating hormone (FSH)-C-terminal peptide (CTP) is superior to the combination therapy of recombinant VEGF plus FSH-CTP in stimulating angiogenesis during ovarian folliculogenesis. *Endocrinology*. 2007 Mar;148(3):1296-305. Epub 2006 Nov 22.

Tıprıdamaz S., Yalçın H., Beşoluk K., Eken E., Ruminantlarda Toplardamarlar (Venae) Konya: Selçuk Üniversitesi Basımevi 1999

Ucuzian AA, Gassman AA, East AT, Greisler HP, Moleküler Mediators of Angiogenesis *J Burn Care Res* 2010;31:158-175

Yardımcı S., Trombosit Kaynalı Büyüme Faktörü Temel Tıp Bilimleri Ankara 1993,13

Wang W, Chao S, Xian W. Alteration of vascular response to norepinephrine, calcitonin gene-related peptide, and acetylcholine in orchidectomized rats. *Acta Pharmacol Sin* 2002; 23 (11): 985 -990.

Öztaş E, Yazar F, Damarların Histolojik Yapısı Ve Özellikleri <http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/ichastaliklari/files/kitaplar/69.pdf> (29.12.2010)

## TEŞEKKÜR

Tezimin ve yüksek lisansımın tüm aşamalarında benden bilgi ve tecrubesini eksiltmeyen, hoŐ gürsünü benden esirgemeyen tez danıŐmanım Prof. Dr. İlknur DABANOĞLU ‘ teŐekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisansım boyunca bana destek veren sayın Prof. Dr. M. Kamil Öcal’a, Prof. Dr. Hasan Erden’e, bana tamamen bir abi gibi her türlü desteğini sunan Prof. Dr. M. Erkut Kara ve Doğ. Dr. Erkut Turan hocalarım, çalışma ve özel hayatım da her zaman yanımda olan, AraŐ Gör. Figen Sevil Kilimci ve Dr. Veteriner Hekim İ. Gökçe Yıldırım’a ve Anatomi Anabilim Dalı ailesine,

Tez çalıŐmalarım da her zaman yardım eden Histoloji ve Fizyoloji Anabilim Dalı hocaları ve asistanlarına,

Zor günlerimde her zaman yanımda olan ailem ve eŐim AyŐegül’ e

TeŐekkürlerimi borç bilirim.