

**T.C.**  
**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KAN BEYİN BARIYERİ GELİŞİMİNİN**  
**GESTASYONEL DİABETES MELLİTUS'DA İNCELENMESİ**

**PINAR AKOKAY**  
**0000-0002-0915-8694**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI**

**DOKTORA TEZİ**

**İZMİR**  
**MAYIS 2021**

**TEZ KODU: DEU.HSI.PhD- 2013970172**

**T.C.**  
**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KAN BEYİN BARIYERİ GELİŞİMİNİN**  
**GESTASYONEL DİABETES MELLİTUS'DA İNCELENMESİ**

**PINAR AKOKAY**  
**0000-0002-0915-8694**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI**

**DOKTORA TEZİ**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Güven ERBİL**

**0000-0002-8448-0691**

**İkinci Danışman: Prof. Dr. Bekir Uğur ERGÜR**

**0000-0002-6448-2593**

**İZMİR**

**MAYIS 2021**

## İÇİNDEKİLER

|                                                              |      |
|--------------------------------------------------------------|------|
| İÇİNDEKİLER .....                                            | i    |
| TABLolar DİZİNİ .....                                        | iv   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                        | v    |
| GRAFİKLER DİZİNİ .....                                       | vi   |
| KISALTMALAR .....                                            | vii  |
| KABUL ve ONAY .....                                          | viii |
| KABUL ve ONAY .....                                          | ix   |
| ETİK BEYAN.....                                              | x    |
| ÖZET.....                                                    | xi   |
| ABSTRACT .....                                               | xii  |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ .....                                       | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                       | 5    |
| 2.1 Beyin Dokusu Histolojisi .....                           | 5    |
| 2.1.1 Substansia Grisea .....                                | 6    |
| 2.1.2 Substansia Alba.....                                   | 7    |
| 2.2. Beyin Anatomisi .....                                   | 8    |
| 2.3. Beyin Dokusu Gelişimi .....                             | 8    |
| 2.3.1 Nörogenezis.....                                       | 12   |
| 2.4 Kan Beyin Bariyeri .....                                 | 13   |
| 2.4.1 Kan Beyin Bariyeri Bulunmayan Bölgeler .....           | 17   |
| 2.4.2 Kan Beyin Bariyerinin Yapısı .....                     | 17   |
| 2.4.2.1 Kan Beyin Bariyerini Oluşturan Hücreler.....         | 18   |
| 2.4.2.1.1 Endotel Hücreleri .....                            | 18   |
| 2.4.2.1.2 Perisit Hücreleri .....                            | 22   |
| 2.4.2.1.3 Astrosit Hücreleri .....                           | 23   |
| 2.4.2.1.4 Nöronlar .....                                     | 24   |
| 2.5 Diabetes Mellitus .....                                  | 24   |
| 2.5.1 Gestasyonel Diabetes Mellitus.....                     | 26   |
| 2.5.1.1 Gestasyonel Diabetes Mellitus ve Beyin Gelişimi..... | 27   |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM .....                                     | 30   |
| 3.1 Araştırmanın Tipi .....                                  | 30   |
| 3.2 Araştırmanın Yeri Ve Zamanı.....                         | 30   |
| 3.3 Araştırmanın Evreni Ve Örneklem .....                    | 30   |

|                                                                                        |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.4 Çalışma Materyali .....                                                            | 31        |
| 3.5 Araştırmanın Değişkenleri .....                                                    | 31        |
| 3.6 Veri Toplama Araçları .....                                                        | 32        |
| 3.6.1 Araştırmada Kullanılan Yöntemler .....                                           | 33        |
| 3.6.1.1 Denek Kan/Glukoz Düzeylerinin Değerlendirilmesi .....                          | 33        |
| 3.6.1.2 Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi .....                                   | 33        |
| 3.6.1.3 Deneklerin Menstrüel Sikluslarının Belirlenmesi .....                          | 33        |
| 3.6.1.4 Histokimyasal İncelemeler .....                                                | 34        |
| 3.6.1.4.1 Hematoksilen-Eosin Boya Protokolü .....                                      | 34        |
| 3.6.1.4.2 Krezil Viyole Boya Protokolü .....                                           | 36        |
| 3.6.1.5 Morfometrik Değerlendirmeler .....                                             | 37        |
| 3.6.1.5.1 Hematoksilen-Eosin Boyama Değerlendirmesi .....                              | 37        |
| 3.6.1.5.2 Beyin Prefrontal Korteks Bölgesinde Nöron Sayımı .....                       | 37        |
| 3.6.1.6 İmmünohistokimyasal İncelemeler .....                                          | 37        |
| 3.6.1.6.1 İmmunhistokimya Boyama Protokolü .....                                       | 37        |
| 3.6.1.6.2 Yarı-sayısal İmmunohistokimyasal Analiz .....                                | 38        |
| 3.7 Araştırma Planı .....                                                              | 38        |
| 3.8 Verilerin Değerlendirilmesi .....                                                  | 38        |
| 3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları .....                                                  | 39        |
| 3.10 Etik Kurul Onayı .....                                                            | 39        |
| <b>4. BULGULAR .....</b>                                                               | <b>40</b> |
| 4.1 Annelerin Ağırlıklarının Değerlendirilmesi .....                                   | 40        |
| 4.2 Annelerin Kan/Glukoz Seviyelerinin Değerlendirilmesi .....                         | 41        |
| 4.3 Yavruların Ağırlıklarının Değerlendirilmesi .....                                  | 43        |
| 4.4 Yavruların Kan/Glukoz Seviyelerinin Değerlendirilmesi .....                        | 46        |
| 4.5. Canlı Doğum Sayılarının Değerlendirilmesi .....                                   | 48        |
| 4.6 Histokimyasal Bulgular .....                                                       | 49        |
| 4.6.1 Hematoksilen-Eosin Boyama Değerlendirmesi .....                                  | 49        |
| 4.6.2 Krezil Viyole Boyama Değerlendirmesi .....                                       | 54        |
| 4.6.2.1. Beyin Prefrontal Korteks Bölgesinde Nöron Sayımı .....                        | 54        |
| 4.7 İmmünohistokimyasal Bulgular .....                                                 | 59        |
| 4.7.1 Anti Klaudin 5 ve Anti VE Kaderin 5 İmmunhistokimya Boyama Değerlendirmesi ..... | 59        |
| 4.7.2. Anti Aquaporin-4 İmmunhistokimya Boyama Değerlendirmesi .....                   | 67        |

|                                                                      |           |
|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.7.3 Anti $\alpha$ -SMA İmmunhistokimya Boyama Değerlendirmesi..... | 72        |
| <b>5. TARTIŞMA .....</b>                                             | <b>77</b> |
| <b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLERİ.....</b>                                 | <b>82</b> |
| <b>7. KAYNAKLAR .....</b>                                            | <b>83</b> |
| <b>8. EKLER.....</b>                                                 | <b>88</b> |



## TABLÖLAR DİZİNİ

### Sayfa No

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> Çalışmada kullanılan demirbaş ve sarf malzemeler..... | 32 |
| <b>Tablo 2.</b> Doku Takip Protokolü.....                             | 34 |
| <b>Tablo 3.</b> Hematoksilen-Eosin boya protokolü.....                | 35 |
| <b>Tablo 4.</b> Krezil Viyole boya protokolü.....                     | 36 |
| <b>Tablo 5.</b> Araştırmanın Planı ve Takvim .....                    | 38 |
| <b>Tablo 6.</b> Deney Gruplarının p Değerleri.....                    | 41 |
| <b>Tablo 7.</b> Deney Gruplarının p Değerleri.....                    | 41 |
| <b>Tablo 8.</b> Deney Gruplarının p Değerleri.....                    | 42 |
| <b>Tablo 9.</b> Gruplarda p Değerleri .....                           | 44 |
| <b>Tablo 10.</b> Gruplarda p Değerleri .....                          | 45 |
| <b>Tablo 11.</b> Gruplarda p Değerleri .....                          | 46 |
| <b>Tablo 12.</b> Deney gruplarının p Değerleri .....                  | 47 |
| <b>Tablo 13.</b> Deney gruplarının p Değerleri .....                  | 48 |
| <b>Tablo 14.</b> Deney gruplarının p Değerleri .....                  | 55 |
| <b>Tablo 15.</b> Deney Gruplarının p Değerleri.....                   | 60 |
| <b>Tablo 16.</b> Gruplarda p Değerleri .....                          | 68 |
| <b>Tablo 17.</b> Deney gruplarının p Değerleri .....                  | 73 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

|                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. Nörovasküler Ünite.....                                                             | 1  |
| Şekil 2. Beyin kapiller endotel hücrelerinde SHH yolağı.....                                 | 3  |
| Şekil 3. Beynin dört ana lobu.....                                                           | 6  |
| Şekil 4. Nöroepitel, radyal glial ve bazal progenitör hücrelerinin polarize özellikleri..... | 12 |
| Şekil 5. Kan Beyin Bariyerinin anatomik ve fonksiyonel yapısı.....                           | 15 |
| Şekil 6. Nörovasküler Ünite.....                                                             | 16 |
| Şekil 7. Sirkumventriküler organlar.....                                                     | 17 |
| Şekil 8. KBB moleküllerinin şematik gösterimi. ....                                          | 21 |
| Şekil 9. Perisitlerin ultrastrüktürel özellikleri ve perisit-endotel etkileşimleri. ....     | 22 |
| Şekil 10. Astrositler ve KBB .....                                                           | 23 |
| Şekil 11. Diabetes Mellitus'un sınıflandırılması .....                                       | 25 |
| Şekil 12. Kontrol gruplarına ait HE boyaması.....                                            | 51 |
| Şekil 13. Sham gruplarına ait HE boyaması. ....                                              | 52 |
| Şekil 14. GDM gruplarına ait HE boyaması.....                                                | 53 |
| Şekil 15. Kontrol gruplarına ait KV boyaması.. ....                                          | 56 |
| Şekil 16. Sham gruplarına ait KV boyaması.....                                               | 57 |
| Şekil 17. GDM gruplarına ait KV boyaması. ....                                               | 58 |
| Şekil 18. Kontrol gruplarına ait Klaudin 5 boyaması. ....                                    | 61 |
| Şekil 19. Sham gruplarına ait Klaudin 5 boyaması .....                                       | 62 |
| Şekil 20. GDM gruplarına ait Klaudin 5 boyaması. ....                                        | 63 |
| Şekil 21. Kontrol gruplarına ait VE-Kaderin 5 boyaması.....                                  | 64 |
| Şekil 22. Sham gruplarına ait VE-Kaderin 5 boyaması.....                                     | 65 |
| Şekil 23. GDM gruplarına ait VE-Kaderin 5 boyaması.....                                      | 66 |
| Şekil 24. Kontrol gruplarına ait Aqp-4 boyaması.....                                         | 69 |
| Şekil 25. Sham gruplarına ait Aqp-4 boyaması. ....                                           | 70 |
| Şekil 26. GDM gruplarına ait Aqp-4 boyaması. ....                                            | 71 |
| Şekil 27. Kontrol gruplarına ait $\alpha$ -SMA boyaması.....                                 | 74 |
| Şekil 28. Sham gruplarına ait $\alpha$ -SMA boyaması.....                                    | 75 |
| Şekil 29. GDM gruplarına ait $\alpha$ -SMA boyaması.....                                     | 76 |

## GRAFİKLER DİZİNİ

### Sayfa No

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Grafik 1.</b> Deney Gruplarında Annelere Ait Ağırlık Değişimleri .....              | 40 |
| <b>Grafik 2.</b> Deney Gruplarında Annelere Ait Kan Şekeri Değerleri.....              | 43 |
| <b>Grafik 3.</b> P:0 Günlük Yavruların Ağırlık Değerleri.....                          | 44 |
| <b>Grafik 4.</b> P:7 Günlük Yavruların Ağırlık Değerleri.....                          | 45 |
| <b>Grafik 5.</b> P:21 Günlük Yavruların Ağırlık Değerleri.....                         | 46 |
| <b>Grafik 6.</b> Yavrulara Ait Kan Şekeri Değerleri .....                              | 48 |
| <b>Grafik 7.</b> Deney Gruplarına Ait Canlı Doğum Sayıları .....                       | 49 |
| <b>Grafik 8.</b> Deney Gruplarına Ait Prefrontal Korteks Hücre Sayımı .....            | 55 |
| <b>Grafik 9.</b> Deney Gruplarına Ait VE-Kaderin 5 ve Klaudin-5 İmmunreaktivitesi .... | 59 |
| <b>Grafik 10.</b> Deney Gruplarına Ait Aqp-4 İmmunreaktivitesi.....                    | 67 |
| <b>Grafik 11.</b> Deney Gruplarına Ait $\alpha$ -SMA İmmunreaktivitesi .....           | 73 |

## KISALTMALAR

|                |                                                  |
|----------------|--------------------------------------------------|
| $\alpha$ -SMA  | Alpha Smooth Muscle Actin                        |
| AJ             | Adherens Bağlantılar                             |
| Aqp-4          | Aquaporin-4                                      |
| BEH            | Beyin Endotel Hücresi                            |
| BOS            | Beyin Omurilik Sıvısı                            |
| CD13           | Alanine Aminopeptidaz                            |
| DM             | Diabetes Mellitus                                |
| GDM            | Gestasyonel Diabetes Mellitus                    |
| Gli-1          | GLI family zinc finger 1                         |
| IGF-1          | İnsülin Benzeri Büyüme Faktör-1                  |
| IPC            | Ara Progenitör Hücreler                          |
| KBB            | Kan Beyin Bariyeri                               |
| NVU            | Nörovasküler Ünite                               |
| MarvelD2       | Tricellulin                                      |
| MSS            | Merkezi Sinir Sistemi                            |
| NDM            | Neonatal Diabetes Mellitus                       |
| NG-2           | Nöro/Glial Antijen-2                             |
| NTD            | Nöral Tüp Defektleri                             |
| NVC            | Nörovasküler Eşleşme                             |
| MODY           | Gençlerde Olgunluk Başlangıçlı Diabetes Mellitus |
| PCOS           | Polikistik Over Sendromu                         |
| PDGFR- $\beta$ | Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü Beta           |
| PECAM          | Trombosit Endotel Hücre Adhezyon Molekülleri     |
| Ptc1           | Patched-1                                        |
| SHH            | Sonic Hedgehog                                   |
| Smo            | Smoothened                                       |
| STZ            | Streptozotosin                                   |
| TJ             | Sıkı Bağlantı Kompleksleri                       |
| TAMP           | Sıkı Bağlantı Kompleksi İlişkili Protein Ailesi  |
| VE-Kaderin     | Vasküler Endotelial Kaderin                      |
| WHO            | Dünya Sağlık Örgütü                              |
| ZO             | Zonula Okludens                                  |

## TEZ KABUL ONAYI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı/Histoloji ve Embriyoloji Programı öğrencisi tarafından hazırlanan Kan Beyin Bariyeri Gelişiminin Gestasyonel Diabetes Mellitus’da İncelenmesi başlıklı tez çalışması 27/05/2021 Günü 10:00-11:00 Saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile DOKTORA TEZİ olarak kabul/ret edilmiştir.

**Jüri Başkanı:** Prof. Dr. Güven ERBİL

Dokuz Eylül Üniversitesi, Histoloji ve Embriyoloji AD

Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum

ORCID ID Numarası: 0000-0002-8448-0691

İMZA

**Üye:** Doç. Dr. Serap C. MIÇILI

Dokuz Eylül Üniv, Histoloji ve Embriyoloji AD

Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum

ORCID ID Numarası: 0000-0002-9830-0989

İMZA

**Üye:** Doç. Dr. Funda ERDOĞAN

Dokuz Eylül Üniv, Çocuk Sağ.ve Hastalıkları AD

Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum

ORCID ID Numarası:0000-0001-5348-1168

İMZA

**Üye:** Prof. Dr. Meltem KURUŞ

İKCÜ, Histoloji ve Embriyoloji AD

Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum

ORCID ID Numarası: 0000-0002-2455-9605

İMZA

**Üye:** Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL

Ege Üniv, Histoloji ve Embriyoloji AD

Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum

ORCID ID Numarası:0000-0002-4016-0522

İMZA

Tez hakkında alınan jüri kararı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

## TEZ KABUL ONAYI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı/Histoloji ve Embriyoloji Programı öğrencisi tarafından hazırlanan Kan Beyin Bariyeri Gelişiminin Gestasyonel Diabetes Mellitus’da İncelenmesi başlıklı tez çalışması 27/05/2021 Günü 10:00-11:00 Saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile DOKTORA TEZİ olarak kabul/ret edilmiştir.

**Jüri Başkanı:** Prof. Dr. Güven ERBİL

Dokuz Eylül Üniversitesi, Histoloji ve Embriyoloji AD

Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum

ORCID ID Numarası: 0000-0002-8448-0691

İMZA

**Üye:** Doç. Dr. Serap C. MIÇILI

Dokuz Eylül Üniv, Histoloji ve Embriyoloji AD  
Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum

ORCID ID Numarası: 0000-0002-9830-0989

**Onay Durumu**

**KABUL**

**Üye:** Doç. Dr. Funda ERDOĞAN

Dokuz Eylül Üniv, Çocuk Sağ.ve Hastalıkları AD  
Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum

ORCID ID Numarası: 0000-0001-5348-1168

**Onay Durumu**

**KABUL**

**Üye:** Prof. Dr. Meltem KURUŞ

İKCÜ, Histoloji ve Embriyoloji AD

Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum

ORCID ID Numarası: 0000-0002-2455-9605

**Onay Durumu**

**KABUL**

**Üye:** Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL

Ege Üniv, Histoloji ve Embriyoloji AD

Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum

ORCID ID Numarası: 0000-0002-4016-0522

**Onay Durumu**

**KABUL**

Tez hakkında alınan jüri kararı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

**T.C.**  
**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**  
**ETİK BEYANI**

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum ‘Kan Beyin Bariyerinin Gestasyonel Diabetes Mellitus’da İncelenmesi’ başlıklı Doktora tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabul edeceğimi beyan ederim.

İmza

Pınar AKOKAY

Tarih

# **KAN BEYİN BARIYERİ GELİŞİMİNİN GESTASYONEL DİABETES MELLİTUS'DA İNCELENMESİ**

**Doktora Tezi**

**Pınar AKOKAY**

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

## **ÖZET**

Bu çalışma postnatal gebelik diyabetinde kan beyin bariyerinin gelişimini incelemek amacıyla yapıldı.

18 adet dişi fare ve elde edilen 63 adet yavru kullanıldı. Dişi fareler Kontrol, Sham ve Gebelik Diyabeti olmak üzere rastgele 3 gruba ayrıldı. Katıma alınan deneklerin normal doğum süreleri beklenildi. Kontrol grubuna hiçbir uygulama yapılmadı. Sham grubundaki deneklere gebeliklerinin 5. gününde intraperitoneal sodyum sitrat buffer uygulaması yapıldı. Gebelik Diyabeti grubundaki deneklere gebeliklerinin 5. gününde 40 mg/kg streptozotosin uygulandı. Dişilerden elde edilen yavrular, her grupta 7 denek olacak şekilde P:0, P:7 ve P:21 günlerinde beyin dokuları alındı. 5 µm'lik seri kesitler alınarak histolojik ve immunohistokimyasal olarak incelendi. Çalışma grubumuz tarafından geliştirilen semi-kantitatif bir yöntemle prefrontal kortekste hücre sayımı yapıldı. Sonuçta, Gebelik Diyabeti grupları Sham ve Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında maternal diyabetin prefrontal kortekste hücre sayısını anlamlı olarak azalttığı görüldü. Çalışmamızda kan beyin bariyerinin endotel hücrelerinin, sıkı bağlantı kompleksleri olan VE-Kaderin-5 ve Klaudin-5 immunhistokimya boyamalarında Gebelik diyabetin bu moleküllerin ifadesini anlamlı olarak azalttığı gözlemlendi. Astrosit işaretlemesinde Aqp-4 boyaması sonucundaysa anlamlı azalma gösterildi. Perisit hücrelerinde maternal diyabetin bir etkisi bulunmadığı gözlemlendi.

Bu sonuçlara göre gebelik diyabetinin yeni doğanda kan beyin bariyeri gelişimi üzerinde olumsuz etkileri olduğunu ve geçirgenliğini artırdığını ön görmekteyiz.

**Anahtar Sözcükler:** Beyin, Kan Beyin Bariyeri, Gestasyonal Diyabet, Semi-kantitatif Nöron Sayımı

**Tezin sayfa sayısı:** 107

**Danışman:** Prof. Dr. Güven ERBİL

**BLOOD BRAIN BARRIER DEVELOPMENT  
INVESTIGATION IN GESTATIONAL DIABETES MELLITUS**

**PhD Thesis**

**Pınar AKOKAY**

**DOKUZ EYLÜL UNIVERSITY HEALTH SCIENCES INSTITUTE**

**Department of Histology and Embryology**

**ABSTRACT**

This study was conducted to examine the development of the blood brain barrier in postnatal gestational diabetes.

18 female mice and 63 offspring obtained were used. Female mice were randomly divided into 3 groups as Control, Sham and Gestational Diabetes. Normal birth periods of mice mated were expected. No application was made to the control group. Intraperitoneal sodium citrate buffer was administered to mice in the sham group on the 5th day of their pregnancy. 40 mg / kg streptozotocin was administered to mice in the Gestational Diabetes group on the 5th day of their pregnancy. Brain tissues were taken from the offspring from the females at P: 0, P: 7 and P: 21 days, with 7 subjects in each group. Serial sections of 5 µm were taken and examined histologically and immunohistochemically. Cell count was made in the prefrontal cortex with a semi-quantitative method developed by our study group. As a result, when Gestational Diabetes groups were compared with Sham and Control groups, it was observed that maternal diabetes significantly decreased the number of cells in the prefrontal cortex. In our study, it was observed that gestational diabetes significantly decreased the expression of these molecules in the immunohistochemistry staining of VE-Kaderin-5 and Klaudin-5, which are tight junction complexes of endothelial cells of the blood brain barrier. Significant decrease was shown in astrocyte marking as a result of Aqp-4 staining. It was observed that maternal diabetes had no effect on pericyte cells.

According to these results, we predict that gestational diabetes has negative effects on the development of the blood brain barrier in the newborn and increases permeability.

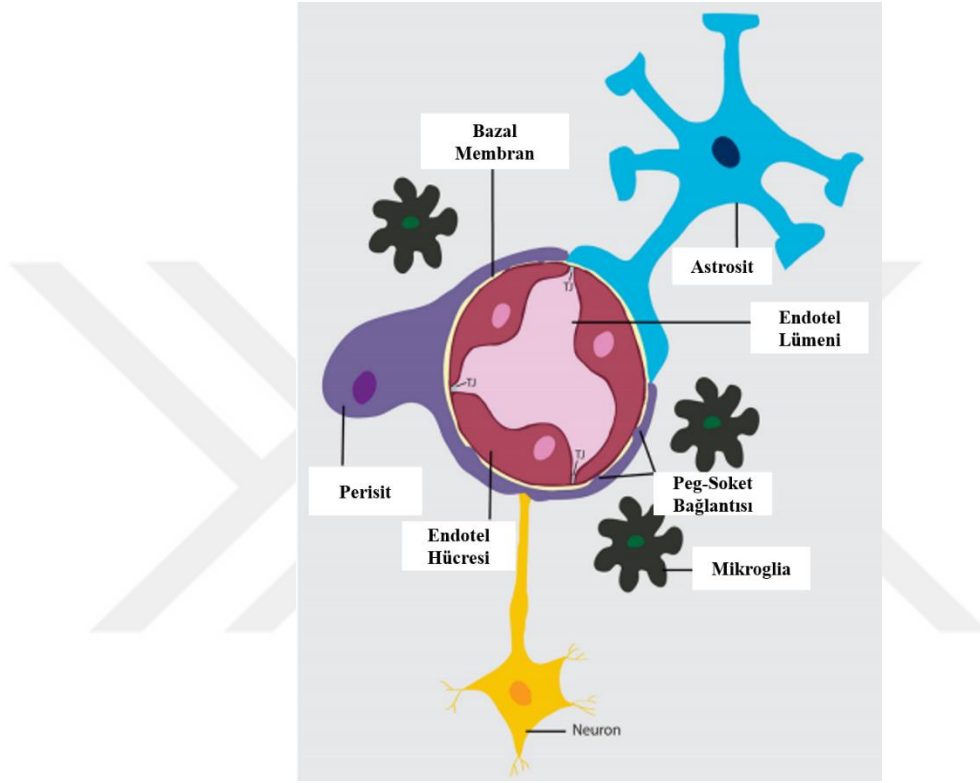
**Keywords:** Brain, Blood Brain Barrier, Gestational Diabetes, Semi-quantitative Neuron Count

**Page Number:** 107

**Advisor:** Prof. Dr. Güven ERBİL

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kan beyin bariyeri (KBB), perisitler, glial hücreler (astrositler ve mikroglialar) ve nöronlar ile yakın temas halinde olan beyin endotel hücrelerinden (BEH) oluşur. Bu hücrelere topluca nörovasküler ünite (NVU) denir. Bu yapıyı oluşturan hücreler arasında, karşılıklı moleküler sinyaller vardır (1).



**Şekil 1.** Nörovasküler Ünite; endotel hücrelerinin, KBB’de bulunan diğer hücre tipleri ile ilişkisi (1).

BEH’ler, periferik endotel hücrelerinden bariyer özellikleri yönüyle farklılık gösterir. Plazma zarlarının apikal ve lateral kenarlarında yer alan transmembran proteinleri ve sitoplazmik adaptör proteinlerini içeren BEH’ler arasında bağlantı kompleksleri vardır. KBB’nin yapısal bütünlüğü, çoğunlukla sıkı bağlantı kompleksleri (Tight Junction-TJ) tarafından sağlanmaktadır (2,3). KBB’deki adherens bağlantı birimlerinin işlevi henüz tam olarak aydınlatılamamış olsa da, TJ’ların BEH’lerin bir arada tutulmasında önemli rol oynadıkları bilinmektedir (4).

Perisitler mikrodamarların adluminal yüzeyinde yer almaktadırlar. BEH'ler ile ortak bir bazal membrana sahiptirler ve endotel hücrelerini saran uzun sitoplazmik uzantıları vardır (5). Merkezi sinir sisteminin (MSS) damarlarındaki perisit hücre yoğunluğu, periferdeki perisitlere göre anlamlı derecede yüksektir. MSS'de perisitlerin, endotel hücrelerine oranı 1:1-1:3 arasındayken, örneğin çizgili kaslarda bu oranın 1:10-1:100 olduğu tahmin edilmektedir (6).

Perisitler çeşitli nörovasküler fonksiyonların düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Anjiyogenez sırasında damar oluşumuna, yeniden şekillenmesine ve damarların stabilize olmasına katkıda bulunabilirler (7,8).

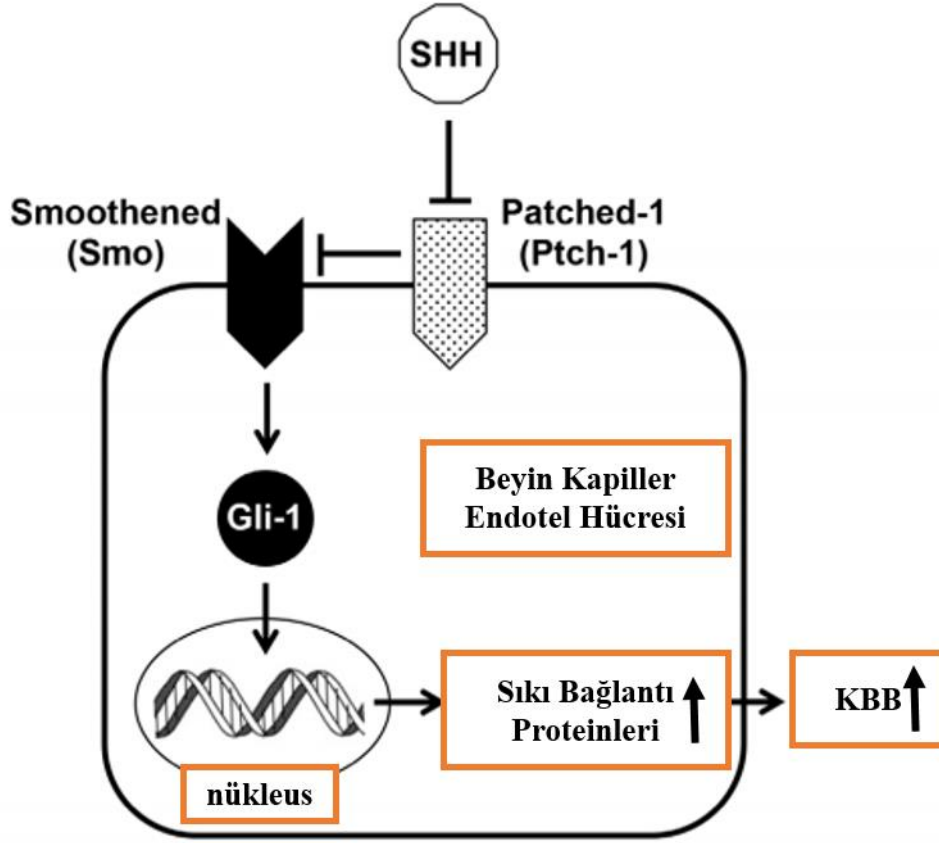
Perisit hücrelerinin eksikliği durumunda, transitozun artması ve TJ proteinlerinin ekspresyondaki azalmaya bağlı olarak KBB'nin geçirgenliği artar. Perisitler ayrıca astrosit son ayaklarının polarizasyonuna aracılık eder ve kan damarlarına yönlendirir (4,7).

Beyinde en çok bulunan hücreler olan astrositler, BEH'leri kaplayan, astrositik son ayaklar da dahil olmak üzere birçok hücresel dallanma gösteren gliyal hücrelerdir. Spesifik olarak, astrositik son ayakları, su kanalı Aquaporin-4 (Aqp4) ve potasyum kanalı KIR4.1 gibi MSS su homeostasisini düzenleyen transmembran proteinleri yoluyla BEH'ler ile etkileşim kurar (9).

Jui M. Dave ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptıkları çalışmada, farelerde embriyonik dönem E10,5'da anjiyogenezisin başladığı ve bundan 1 gün sonra E11,5 da perisitlerin endotel hücrelerini sardığı bildirilmiştir (10).

KBB'nin geçirgenliği, felç, diyetle bağlı obezite, inflamatuvar durumlar, diabetes mellitus ve yaşlanma dahil olmak üzere doğum sonrası yaşam süresince çeşitli patolojik durumlar altında tehlikeye girebilir (11,12). Erişkindeki patolojik durumlara ek olarak, maternal ortamda da KBB gelişim sürecinde, KBB'nin geçirgenliği için de çok önemli olduğu gösterilmiştir. Örneğin, gelişen fetüsünün kortikosteroidlere fazla maruz kalması ya da bağırsak mikrobiyatasına azaltılmış maruziyetin, yeni doğanlarda KBB permeabilitesini ve TJ ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle, çalışmacılar düzensiz veya patolojik bir maternal çevrenin, gelişmekte olan fetüste KBB oluşumunu bozabileceğini ve daha sonraki yaşamda uzun vadede sağlık risklerine yol açabileceği görüşüne varmışlardır (13).

KBB'nin gelişimi sürecine, Sonic hedgehog (Shh) yolu ile aktive olan Patched-1 (Ptc1) kendisi de dahil olmak üzere aşağı doğru hedef genlerin ekspresyonunu indükleyen transkripsiyon faktörü GLI family zinc finger 1 (Gli 1)'in aktivasyonuna yol açar (13,14).



**Şekil 2.** Beyin kapiller endotel hücrelerinde SHH yolağı (15).

Sıkı bağlantı proteinlerini ekspresyonunu sağlayan ve arttıran Smoothened (Smo) ve Gli-1 arasındaki karşılıklı sinyal mekanizmaları KBB bütünlüğünü arttırmaktadır (Şekil 2). SHH'deki bir azalma, Ptch-1'in Smo-Gli-1 sinyalini baskılamasına neden olur. Sağlıklı durumda, endotel hücrelerindeki sıkı bağlantı proteinlerini yukarı regüle eden ve KBB bütünlüğünü koruyan SHH'yi salgırlar (16).

Maternal diyabetli gebeliklerden doğan çocuklarda, büyüme bozuklukları ve konjenital malformasyonların görülme oranı %6-9 iken, nondiyabetik annelerin çocuklarında bu oran %2-3 kadardır. Prenatal gelişim sırasında ise en çok etkilenen organlar; kalp, böbrek ve MSS'dir. Önceki çalışmalarda artan glukoz düzeylerinin

malformasyonlara yol açtığı ayrıca, oksidatif stres, polyol yolundaki bozukluklar ve prostaglandin metabolizmasının diyabetik embriyopatiye yol açtığı da öne sürülmüştür (17).

Maternal diyabette gözlenen spontan abortus, ölü doğum, makrozomi, intrauterin büyüme geriliği ve solunum sıkıntısı sendromu komplikasyonların çoğu, gebelik öncesi ve gebelik sırasında sıkı glisemik kontrol ile önemli ölçüde azaltılabilir. Ancak gebeliğin ilk 8 haftasında ortaya çıkan konjenital malformasyonların önlenmesi, glisemik kontrol olsa dahi çok zordur (15,18). Gestasyonel diabetes mellitus (GDM)'un fetal sinir sistemini etkilediği ve organların yapısı ile işlevinde, kısa ve uzun vadede olumsuz değişiklikler oluşturduğu bilinmektedir (19).

Bu çalışmada, gebelikte gestasyonel diyabetin postnatal dönemde KBB gelişimi üzerindeki etkilerini incelemeyi amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Beyin Dokusu Histolojisi

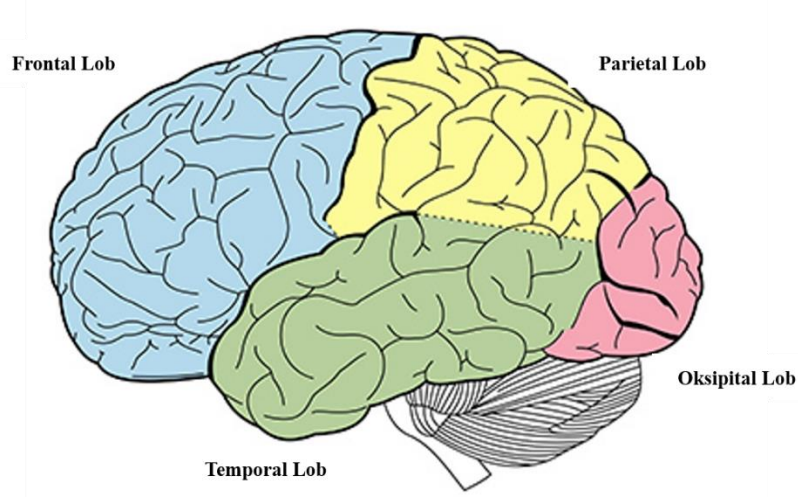
MSS'nin en büyük organı olan beyin, iki tarafı da simetrik, yumuşak ve jelatinimsi yapıda bir organdır. Bebeklerde yaklaşık 400 gram, yetişkinlerde ise 1250-1450 gram kadardır. Kadınların beyin ağırlığı erkeklere oranla daha azdır. Beyin en dışta kafatası olarak bilinen kranium ile korunurken, içten beyin zarları olarak bilenen meninksler ile sıkıca çevrelenmiştir. Meninksler beyni ve kan damarlarını korur. Ayrıca venöz sinüsler etrafında bir koruma alanı oluşturur. Bağ dokusundan oluşan bu zarlar dura mater, araknoid membran ve pia mater olarak adlandırılır (20).

Dura mater, 2 fibröz bağ dokusundan oluşan güçlü bir meninkstir. Araknoid membran, beyin zarlarının ortasında bulunur ve subdural boşluk ile dura mater tabakasından ayrılır. Subaraknoid alan araknoid membran ile piamater arasında bulunur ve beyin-omurilik sıvısı (BOS) ile büyük kan damarları bu aralıkta bulunmaktadır. Araknoid villuslar üst tarafa doğru çıkıntı yapar ve BOS'un venöz kana emilmesine izin verir. Piamater ise, beyne sıkıca tutunan bir zardır (20).

BOS, kan plazmasına benzemekle beraber daha az protein ve farklı iyon konsantrasyonları içeren sulu bir çözeltilidir. BOS, MSS'yi oluşturan organlara kaldırma kuvveti uygulayan, böylece beyni kendi ağırlığı altında ezilmesini önleyen sıvı bir yastık oluşturur. MSS'yi darbelerden ve travmalardan koruduğu gibi, beyne besin ve kimyasal sinyaller taşımaktadır (20).

Beyin embriyonik gelişim sırasında rostralardan kaudale kadar telensefalon, diensefalon, mezensefalon, metensefalon ve miyelensefalon olmak üzere 5 bölgeden oluşur. Daha sonra gelişimle birlikte bu bölgeler kaybolur ve yetişkin beyni meydana gelir (20).

Beyin, beyin sapı üzerinde bulunan 2 adet hemisferium serebri'den (beyin yarımküreleri) oluşmaktadır. Hemisferiumlar içinde ventrikül boşlukları yer alır. Hemisferlerde girus denilen kıvrımlar ve sulkus denilen girintiler bulunur. Her hemisfer frontal, parietal, temporal ve oksipital olmak üzere 4 ana loba ayrılır (21).



**Şekil 3.** Beynin dört ana lobu

Beyin dokusunun histolojik yapısı oldukça karmaşıktır. Dıştan içe doğru incelendiğinde dışta Substansia grisea (Korteks serebri/Serebral korteks/Gri cevher) ve Substansia alba (Korteks serebri/Beyaz cevher) olmak üzere 2 kısımdan oluşur (21).

Beyin gri cevherde nöronlar, beyaz cevherde gliyal hücreleri ile karakterizedir. Küçük bir hacime sahip olmasına rağmen, intertisiyel sıvının bu karmaşık hücresel sistemin homeostazının korunmasında önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. İntertisiyel sıvının bileşimi, büyük ölçüde KBB tarafından düzenlenir. KBB ayrıca beynin nörotoksik bileşiklere karşı korunmasında ve artık maddelerin beyinden perivasküler alanlara geçmesinde önemli bir rol oynar (22).

### **2.1.1 Substansia Grisea**

Substansia grisea beyin tüm kıvrımlarını örter ve kalınlığı 2-6 mm arasındadır. Beynin bu bölgesinde nöron soması, dendritler, aksonlar, sinir lifleri, nöroglia hücreleri ve kan damarları bulunmaktadır. Bunların dışında belirli görevleri yapmak için bir araya gelmiş nöron gövdelerinden oluşan ve nükleus olarak adlandırılan özelleşmiş bölgeler de bulunmaktadır (21).

Substansia grisea Allokorteks (paleokorteks) ve İzokorteks (neokorteks) olmak üzere 2 bölgeden oluşur. Allokorteks, korteksin ilk gelişen bölgesidir ve tüm korteksin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır. İzokorteks ise, allokorteksten sonra oluşmaktadır ve korteksin %90'nını oluşturmaktadır. İzokorteks hücre ve liflerin yapısına göre, sırasıyla sitoarkitektür ve miyeloarkitektür olarak tabakalanma gösterir (21).

**a. Sitoarkitektür Düzenlenme:**

1. **Lamina Molekölare:** Pia materin hemen altında bulunan ve az sayıda horizontal tip nöron içeren tabakadır. Ayrıca piramidal hücrelerin apikal dendritlerini ve bazı stellat hücrelerin dendritlerinin yaptığı horizontal dallanmaları içerir.

2. **Lamina Granularis Eksterna:** Lamina molekölarenin hemen altında yer alan bu tabaka küçük granüler nöronlar, stellat hücreleri, küçük piramidal hücreleri ve çeşitli sinir sonlanmaları içerir.

3. **Lamina Piramidalis Eksterna:** Bu bölge küçük ve orta piramidal nöronlar ile az sayıda stellat nöronları içermektedir.

4. **Lamina Granularis Interna:** Granüler nöronların yer aldığı tabakadır. Bu tabakada talamusdan gelen afferent fibriller yoğunlaşarak Baillarger'in dış bandını oluşturur.

5. **Lamina Piramidalis Interna:** Orta ve büyük piramidal nöronlar ile stellat nöronların yer aldığı tabakadır. Bu tabakada bulunan en büyük nöronlar Betz'in dev nöronlarıdır. Ayrıca piramidal nöronların horizontal fibrilleri burada Baillarger'in iç bandını oluşturmaktadır.

6. **Lamina Multiformis:** Bu tabakada yıldızsı, fuziform nöronlar ile Martinotti nöronları bulunmaktadır. Fuziform şekilli nöronların aksonları substansia albaya kadar uzanır.

**b. Miyeloarkitektür Düzenlenme:**

1. Lamina tanjensiyalis
2. Lamina disfibroza
3. Lamina superradiata
4. Stria Baillarger eksterna
5. Lamina interradiata
6. Lamina infrastriata

**2.1.2 Substansia Alba**

Substansia grisea'nın hemen altında yer alır ve çok sayıda sinir fibrili içeren bu bölgeye 'beyaz cevher'de denmektedir. Miyelinli ve miyelinsiz sinir fibrilleri ile çok sayıda kan kapillerlerinden oluşmaktadır. Bazı bölgelerinde nöron topluluklarının oluşturduğu substansia grisea adacıkları olan nükleuslar bulunmaktadır (21).

## **2.2. Beyin Anatomisi**

Beyin MSS'nin en gelişmiş kısmıdır ve Cavum cranii'nin (kafatası boşluğu) tamamını doldurmaktadır. Erişkin bir insanda ağırlığı yaklaşık 1400-1500 gr kadardır (23). Beyin anatomik olarak medulla spinalis'den yukarıya doğru, rombensefalon, mezensefalon ve prozensefalondan oluşmaktadır (24).

MSS, arteria vertebralis ve arteria karotis interna tarafından beslenmektedir. Arteria vertebralisin dalları ponsta birleşerek arteria basillaris'leri oluşturur ve bunlarda orta beyinde tekrar 2 dala ayrılıp, süperior ve posterior serebral arterleri verirler. Posterior serebral arterler dallanarak internal karotid arterlere bağlanan posterior ilişkili arterlere dallanırlar. Bu damarsal yapılanma ile beynin her yerine kan akışını sağlayan Willus Poligonu'nu oluştur (21).

## **2.3. Beyin Dokusu Gelişimi**

Embriyogenez sırasında nörogelişimsel bozuklukların çoğunluğu erken gelişim sırasında ortaya çıkar. Bu nedenle bu bozuklukların temel nedenini anlamak için beynin normal gelişimini tanımlamak gerekmektedir. Etik olarak insan embriyoları ile çalışma kısıtlılıkları olması nedeniyle, erken insan beyni gelişimini doğrudan incelemek zordur. Bu nedenle bilim insanları hayvan modelleri ve hücre kültürleri gibi alternatiflere yönelmişlerdir (25).

Hayat boyunca beynin karmaşık yapısı işlevine göre hem mikroskobik hem de makroskobik olarak değişmektedir. Gebeliğin 3. haftasından ölüme kadar, beyin sürekli olarak yeni durumlara adapte olur ve yaralanma ya da hastalık durumlarında işlevini yeniden düzenleyebilir. Genel olarak insan beyninin yaşam döngüsünü beyin gelişimi ve beyin yaşlanması olarak 2'ye ayrılır (26).

Erken embriyogenez sırasında ektodermin bir kısmı altta bulunan mezoderm tarafından indüklenerek nöral plaka haline gelir ve daha sonra nöral tüpü oluşturarak kapanır. Nöronal tüpün orta hat kenarlarında organizasyon merkezleri oluşur ve burada morfojenler sentezlenmeye başlar. Bu morfojenler nöroepitelyal kök hücrelerinden beyin bölgesine özgü olan transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu indükler. Sonuç olarak ortaya çıkan bu sinir dokusu rostra-kaudal eksen boyunca, telensefalon ve diensefalondan oluşan önbeği (prozensefalon), orta beyini (mesensefalon), arka beyini

(metensefalon ve miyelensefalon) ve medulla spinalis'i oluşturacak şekilde bölünür. Bu bölgeler birbirine bitişik şekilde gelişse de yetişkin beyinde anatomik ve fonksiyonel olarak farklı bölgelerin oluşmasına neden olur. Telensefalon serebral korteks, bazal gangliyonlar, hipokampus ve amigdalaya ayrılır. Diensefalon hipotalamus ve talamusu içerir, mezensefalon bitişik rostral ve kaudal bölgeleri birbirine bağlar ve tektum serebral akuaduktü içerir ve rombensefalon serebellum, medulla oblongata ve pons'u içerir. Bu yapıların her birinde farklı hücre tipleri bulunmaktadır. Uygun sinaptik bağlantıları oluşturmak ve belirli fonksiyonel aktiviteleri desteklemek için farklı gelişim yönlerine sahiptir (27).

Hücre proliferasyonu, göçü ve hücre agregasyonu süreçleri sonunda, serebral duvarın geçici 3 katlı görünüm kazanmasına neden olur. Embriyonik dönemin sonunda, embriyonik beyin tüm bölümleri ve ana alt bölümleri silvian fossa düzeyinde ve serebral hemisferler üzerinde koronal bölümlerde görülebilir. Telensefalon lateral olarak genişleyen serebral veziküller, rinensefalon olarak bilinen septal alan, ganglionik eminens ve bazal telensefalondan oluşur. Serebral hemisferlerin rostral (frontal), dorsal (parietal), kaudal (oksipital) ve temporal yönde genişlemesi için ana kaynak, lateral hemisferik yüzeyin ortasında bulunan insula primordiumudur (28).

Gelişimin 11. haftasında, korpus kallozum rostral telensefalonun eski komissural tabakasında ortaya çıkar. Diensefalonun masif dorsal kısmı, ventral hipotalamik bölgeden lif bakımından zengin bir bölge ile ayrılan talamusu temsil eder (28).

Beyin gelişiminde erken fetal fazda hücre proliferasyonu, hücre göçü ve moleküler spesifikasyon histogenetik ve nörogenetik olarak çok önemlidir. Bu 3 olay gerçekleştikçe geçici fetal bölgelerin mikroyapısı, hücre kümelenmesinin yoğunluğu, akson ve dendritlerin düzeni ve hücre dışı matriks miktarı düzenlenir. Beynin hücresel yapısının düzenlenmesindeki anahtar rol kortikal plağın oluşumudur (28).

Sinir sisteminin gelişiminin en erken aşaması nörolasyondur. Bu süreç insanlarda 3. haftada, ektodermden gelişen nöral kıvrımların nöral tüpü oluşturması ile başlar. Nöral tüpün duvarı, nöral progenitör hücrelerden oluşur ve nöroepitel olarak adlandırılır. Hücreler silindirik şekillidir ve hücre döngüsü sırasında nükleuslar hücrenin apikal ve bazal tarafları arasında göç ettikleri için nöroepitele yalancı çok

katlı bir görünüm kazandırır. Sonuçta nöral tüpün anterior ve posterior bölgelerinden sırasıyla serebrum ve medulla spinalis haline gelir (28).

Tavuk, fare ve insan embriyosunda nöral plaka, içi boş lümenli bir tüp oluşturmak için yükselir, katlanır ve birleşir (29).

İnsanlarda majör organogenez embriyonik dönemde fertilizasyondan sonra 8. haftanın sonunda gelişir. MSS embriyonik diskin ektoderm tabakasından gelişmektedir. Fertilizasyondan sonraki 18. günde, embriyonik diskin orta hattı, nöronal oluğu oluşturmak için derinleşir. Aynı zamanda, ektodermin rostral kısmı daha sonra beyni oluşturacak olan simetrik nöral plağı oluşturmak üzere kalınlaşır. Bilateral nöral kıvrımlar, nöral oluk boyunca belirgin hale gelirler. Yaklaşık 20. günde, nöral kıvrımlar gelecekteki serebrum ve medulla spinalisi oluşturmak için birbirleri ile kaynaşmaya başlarlar ve nöronal tüpü oluşturmak için hem rostral hem de kaudal uzanırlar. Rostral nöropor yaklaşık 24 günde kapanır ve bundan 2-4 gün sonra da kaudal nöropor kapanarak nöral tüpün oluşumu tamamlanır (30).

20. günde, kranial nöroektodermin kalınlaşması ile 3 beyin vezikülü olan prozensefalon (ön beyin), mezensefalon (orta beyin) ve rombensefalon (arka beyin) primordiyaları ortaya çıkar. Nöral tüp kapandıktan kısa bir süre sonra mezensefalik, pontin ve servikal fleksürler şeklinde 3 kısımda bükülür. 5. haftada ise 3 bölümden oluşan beyin, 5 parçaya ayrılır. Prozensefalondan telensefalon ve diensefalon oluşur. Mezensefalon bölünmeden kalır ve tüp şeklinde bir yapı oluşturur. Serebellum ve ponsun gelişmesi ile arka beynin metensefalon ve miyelsefalon ya da medulla oblongata olarak bölünmesi ile belirgin hale gelir. Orta beyin ile arka beyin arasındaki bağlantı nispeten dardır ve istmus rombensefali olarak adlandırılır (30).

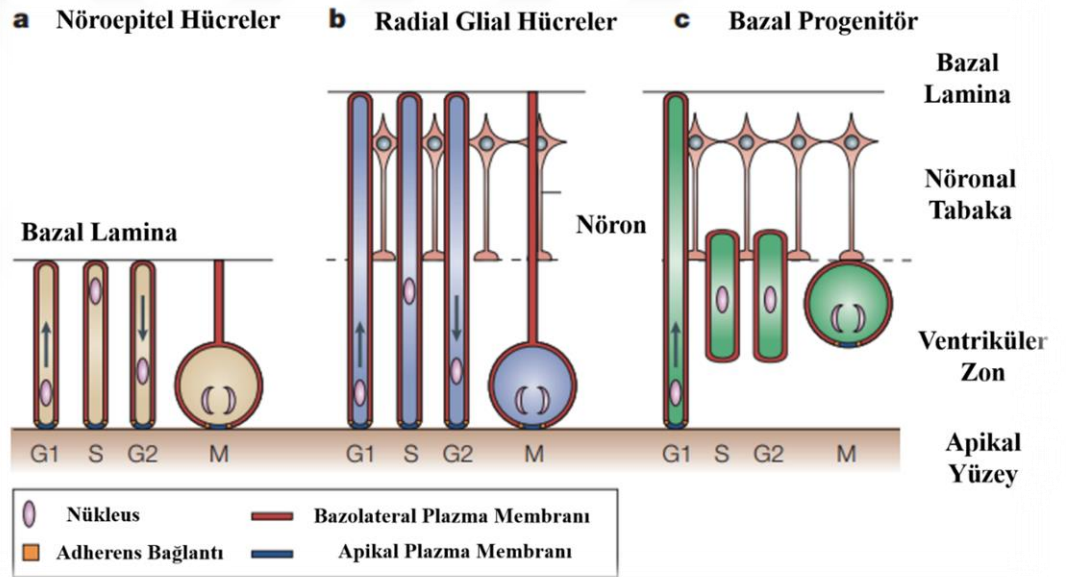
Telensefalik veziküller, serebral hemisferleri oluşturmak için iki taraflı genişler. Embriyonik dönemin sonunda hızla genişler ve diensefalonu hızla kaplar. Her iki tarafın nöral katlantıları kaynaştığında, bazı hücreler nöroektodermden ayrılır ve nöral krest hücrelerini oluştururlar. Bu hücreler spinal kranial ve otonom ganglion hücrelerini, adrenal bezin medullasını, epidermin melanositlerini ve baş bölgesinin iskelet ve bağ dokusunun birçok farklılaşmış hücre tipini oluşturmak için göç ederler (30).

Başlangıçta nöral tüpün duvarı matriks tabakası olarak adlandırılan tek katlı nörepiteyal hücrelerden oluşur. Bu tabaka kalınlaştıkça yalancı çok katlı bir görünüm sergiler. İç ve dış sınırlayıcı membranlar ile temas halinde olan bu nöroektodermal hücrelerin çekirdekleri giderek daha fazla tabaka halinde düzenlenirler. Mitoz bölünme hücre tabakasının ventriküler yüzeyinin yakınında oluşur ve farklılaşmış nöronal hücreler nöral tüpün dış yüzeyine göç ederek 2. tabakaya yerleşirler. Manto tabakası olarak adlandırılan bu bölge, ventriküler bölgeden daha fazla hücre göç ettikçe, daha kalın hale gelir. Ventriküler zonla manto zonu arasında bulunan intermedier zon, nöronlar ve glial hücreler ile daha çok farklıdır. Radyal glial hücreler nörogenezin erken aşamalarında görülmektedir. Nöronal hücreler, nöral tüpün dış yüzeyi boyunca uzanan radyal glial hücreler boyunca, manto tabakasından, serebral korteksin primordiyumu olan kortikal tabakayı oluşturmak için göç ederler. Kortikal plağın oluşumu gestasyonun 7. ve 16. haftaları arasında gerçekleşir. Bu nedenle serebral korteksin büyümesi ve kortikal nöronların proliferasyonu büyük ölçüde fetal dönemde olmaktadır. Fetal dönemde görülen en önemli değişimler, serebral hemisferlerin büyümesi median kısımlarının oluşumu, serebral hemisferlerin genişlemesi ve temporal lob, sulkus ve girusların oluşumu ile özellikle korpus kallozum olmak üzere komissural bağlantıların oluşumudur. Frontal, temporal ve oksipital kutuplar belirgin hale gelirken ventral yüzeyde bulbus olfaktoryus görünür hale gelir. Beyin parçalarının hızla büyümesi ile birlikte ventriküler sistemde genişler ve organize olur. Beynin yan yüzeyinde sulkus lateralis ve sulkus setralis 4. aydan itibaren tanınabilir hale gelir. Prefrontal korteksin gelişimi ile önce, sulkus sentralis kademeli olarak kaudale doğru hareket eder. Medial yüzeyinde önce parieto-okspital ve singulat sulkus ortaya çıkar, ardından kalkarin ve central sulkus gelişir. Hipokampal formasyon ise dentat girus, hipokampus, subikulum ve parahipokampal girusdan oluşur (30).

Koroid pleksus, 7. haftada dördüncü ventrikül tavanı altında ve lateral ventrikülde, 8. haftanın başlarında üçüncü ventrikülde ortaya çıkar. Koroid pleksusun primordiyumu, ventriküllere çıkıntı yapan endim hücrelerinin basit kıvrımları olarak görünür. Koroid pleksuslar gestasyonun 8. haftasında vaskülarize olur. Embriyonik koroid pleksus embriyonik kapiller ağı gelişmesi ile birlikte 9. haftada fetal hale gelir (30).

### 2.3.1 Nöroenezis

Gelişim sırasında nöronal kök hücreler, MSS'nin tüm kök hücrelerini oluşturmaktadır. Ayrıca MSS'deki astrosit ve oligodendrosit olarak adlandırılan makroglial hücrelerinin kaynağıdır. Nöroenezden önce nöral tüp, tek tabakalı nöroepitel hücrelerinden oluşmaktadır. Nöroepitel hücrelerinin çekirdekleri, hücre döngüsü sırasında apikal-bazal ekseninde aşağı yukarı hareket ettiği için, nöroepitel yalancı çok tabakalı (psödostratifiye) görünür (Şekil 1a) (31). Nöroepitel hücreler, tipik epitel özelliği gösterir ve apikal-bazal eksenleri boyunca polarize olurlar (Şekil 1a). Nöronların çoğalması ile nöroepitel çok sayıda hücre katmanına sahip bir dokuya farklanır. Progenitör hücre gövdelerinin çoğunu içeren en apikal tabaka ventriküler bölge olarak adlandırılır (Şekil 1b).



**Şekil 4.** Nöroepitel hücreleri, radyal glial hücreleri ve bazal progenitör hücrelerinin polarize özellikleri (31).

Nöroenez ile birlikte, nöroepitel hücreleri, özellikle sıkı bağlantı noktaları ve bazı plazma membran proteinlerinin ekspresyonu ile epitel özellik kazanıp, apikal-bazal polaritesini düzenler. Aynı zamanda astroglial ayırıcı özellikler ortaya çıkar. Nöroenezin başlangıcından sonra, nöroepitelyal hücreler hem nöroepitel hem de astroglial özellik gösteren bir hücre tipi olan radyal glial hücrelere farklılaşırlar. Radyal glial hücreler, nöroepitel hücrelerden daha kısıtlı progenitör hücrelerdir. Ancak

yine de beyindeki hücrelerin çoğu doğrudan ya da dolaylı olarak radyal glial hücrelerden gelişirler. Radyal glial hücreler nöroepitel hücreler gibi, interkinetik nükleer göç gösterirler (Şekil 1b). Bununla birlikte nöroepitel hücrelerde çekirdekler tüm sitoplazma boyunca hareket etmesine rağmen, radyal glial hücrelerde durum bu şekilde değildir (Şekil 1b) (31).

Radyal glial hücreler olarak da bilinen nöral prgenitör hücreler, ara progenitör hücreler (IPC) ya da nöronları oluşturmak için hem simetrik hem de asimetrik olarak bölünürler. IPC'ler daha sonra subventriküler zon oluşturmak için ve dolaylı olarak nöronal üretimi artırmak için bölünmeler geçirir. Bu postmitotik nöronlar kortikal plağa aşamalı olarak yerleşmek için, oluştukları ilk bölgeden radyal olarak göç ederler. Farklı projeksiyon nöronlarının ardışık göçü, kortikal katmanların içten-dışa bir şekilde oluşmasını sağlar. Neokortikal gelişim, radyal glial hücrelerin proliferasyonunu, ne yöne farklılaşacağını belirlenmesi, yeni oluşan nöronun konumlandırılması, olgunlaşması ve fonksiyonel entegrasyonunu gerektiren zamana bağlı karmaşık bir süreçtir.

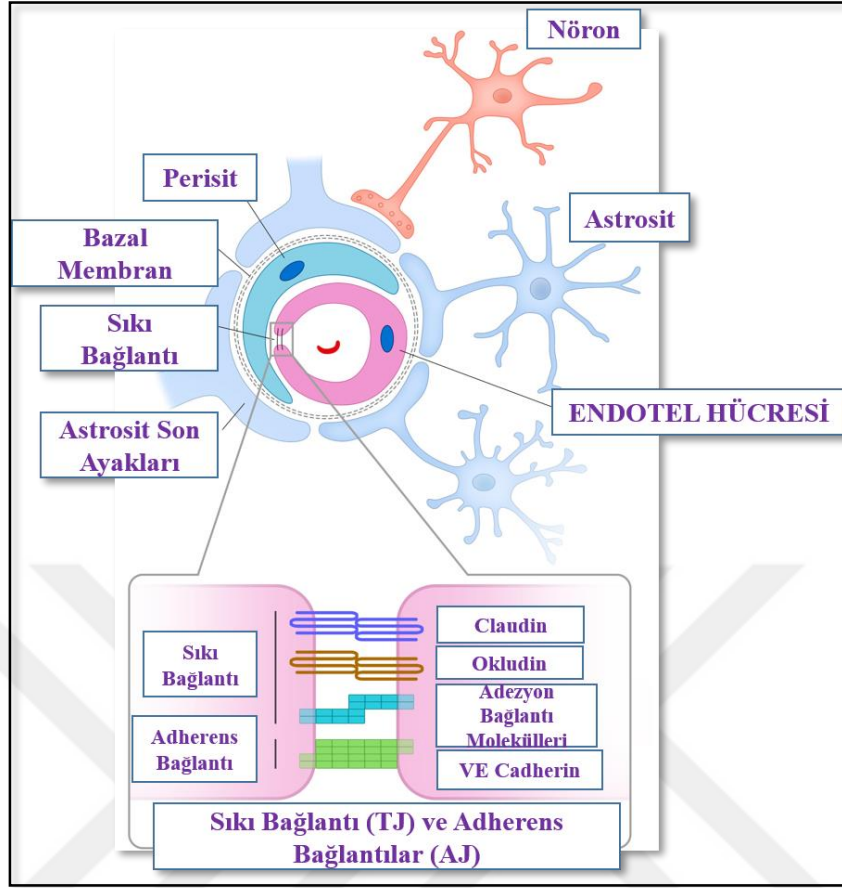
Nörogenezin düzgün gerçekleşmesi, kortikal gelişim sırasında beyin organizasyonu için kritiktir. Nörogenez sırasında oluşacak herhangi bir bozukluk, beyin malformasyonu ya da şizofreni, otizm, depresyon ve epilepsi dahil olmak üzere bir çok nöropsikiyatrik bozukluk ile ilişkilidir. Ayrıca genlerin işlev bozukluğunun neden olduğu anormal embriyonik nörogenez, postnatal hayatı etkileyebilmektedir. Yetişkin nörogenezi mikro çevre tarafından düzenlenmesine rağmen, alkol, lipopolisakkarit, IL-6 gibi maternal etkiler astrositlerin asenkron gelişimini etkileyerek, embriyonik nörogenezi birincil yoldan etkileyebilir (32).

## **2.4 Kan Beyin Bariyeri**

KBB'nin varlığını gösteren ilk deneyler 1885 yılında alman immünolog Paul Ehrlich tarafından yapıldı. Ehrlich periferik olarak enjekte edilen bir boyanın organları boyarken, beyin dokusunu boyamadığını gözlemledi. Daha sonra 1900 yılında, Lewandowsky'nin beyin içerisine enjekte ettiği bir boyanın periferik organlara geçmediğini göstermiş, bu da bir bariyer varlığını düşündürdü. Bu engel, Goldman tarafından 'kan beyin bariyeri' olarak adlandırıldı (33).

KBB, nörotoksik plazma bileşenlerinin, kan hücrelerinin ve patojenlerin beyne girmesini engeller. Ayrıca KBB, MSS'ye giren ve çıkan moleküllerin taşınmasını, nöronal işleyiş için gerekli olan nöronal ortamın kimyasal bileşimini korumak için kontrol eder. KBB'nin disfonksiyonu, zararlı kan bileşenlerin ya da nörolojik düzensizliklere neden olabilecek moleküllerin MSS'ye sızmasına, hücrel infiltrasyona, beyin kan akışının azalması neden olmaktadır. Serebral kan damarlarının paterni duyu, hafıza ve hareketle ilişkili ana beyin bağlantılarını takip ederler. Bu nedenle serebrovasküler sistemin, MSS'nin işleyişinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Normal fizyolojik koşullar altında, insan beyni kalp debisinin %20'sini ve vücuttaki oksijen ve glikozun da %20'sini kullanmaktadır. Beyin normal fonksiyonları için ihtiyaç duyduğu enerjiyi depolayamaz. Bu nedenle enerji substratlarını kan beyin bariyeri yolu ile kandan direkt olarak alıp, tüketir. Memeli beyinde serebral arterler, arterioller ve kapillerler NVÜ olarak bilinen bir mekanizma ile nöronal uyarılara yanıt olarak MSS'ye kan sağlar.

NVÜ'yü oluşturan vasküler hücreler (perisitler), glia hücreleri (astrositler) ve nöronlar olmak üzere farklı hücre tipleri, KBB'nin geçirgenliğini, nörovasküler bağlanmayı, hücre-matriks etkileşimlerini, nörotransmitter dönüşümleri, anjiyogenez ve nörogenezin düzenlenmesine katkıda bulunur. NVÜ endotel hücreleri ve endotel hücrelerinin bazal membranını saran perisit hücreleri, astrositler, nöronlar, internöronlar ve ekstraselüler matriksten oluşan KBB'nin fonksiyonel ve anatomik bir yapısı olarak tanımlanmaktadır (Şekil 5) (34).



**Şekil 5.** Kan Beyin Bariyerinin anatomik ve fonksiyonel yapısı (35).

NVÜ beyinde çeşitli rollere sahiptir ancak özellikle 2 süreç daha önemli rol oynamaktadır. Genellikle nörovasküler hiperemi olarak adlandırılan nörovasküler eşleşme (NVC), vasküler intralümenal çaptaki değişiklikler yoluyla yerel kan beslenmesinin nöronal talep ile eşleştirildiği bir mekanizmadır. NVU, nöronları serebral damarlara bağlamak için temel sağlayan sürecin temel itici gücüdür (36).

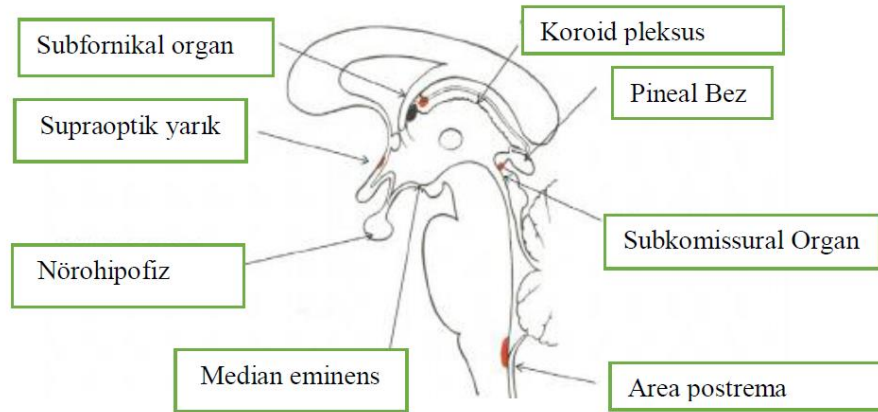


sağlayan ve çevresel etkenlere karşı intraserebellar ortamı koruyan oldukça seçici yapısal ve biyokimyasal bariyer olan kan beyin bariyerini oluşturacak şekilde düzenlenir (37).

KBB, polar maddelerin kandan beyne pasif difüzyonunu sınırlandırarak besinlerin beyin parankimasına taşınmasını, aynı zamanda beyindeki toksik maddelerin ve ksenobiyotiklerin dışarı atılmasını ve immun sistem hücrelerinin göçünü düzenler (2).

#### **2.4.1 Kan Beyin Bariyeri Bulunmayan Bölgeler**

Beyinde KBB'nin bulunmadığı alanlar sirkumventriküler organlar olarak adlandırılmaktadır. Beynin orta hattında 3.ve 4.ventrilüller yanında bulunmaktadır. Sirkumventriküler organları, area postrema (kusma merkezi), pineal bez (melatonin salınımı), alt komissural organ, nörohipofiz (antidiüretik gibi hormonlar), koroid pleksus, subfornikal organ, median eminens ve supraoptik yarık oluşturmaktadır (38). Bu organlar kan dolaşımındaki değişimleri hızla algılar ve bu değişimlere karşı canlıyı korumaktadır (39).



**Şekil 7.** Sirkumventriküler organlar (40).

#### **2.4.2 Kan Beyin Bariyerinin Yapısı**

Beyin kapiller damarları morfolojik olarak periferik organlarda bulunan damarlarla benzerlik gösterse de, beyin damarları işlevsel olarak beyin parankiminde bulunan diğer hücreler ile bağlıdır. KBB, özel endotel hücreleri, astrositler, perisit

hücreleri ve nöronal sonlanmaları içeren kan damarlarından oluşmaktadır. Astrosit hücreleri son ayak denilen uzantılarını, bazal laminanın üzerine konumlandırır ve kısıtlayıcı bir bariyer oluşmasına yardımcı olur. Bir tür mezenkimal hücre olan perisitler, perivasküler boşluğu kaplar ve kapiller duvarı ile astrosit son ayakları arasında yer alırlar. Perisitler damar tonusu, stabilite, onarım ve anjiyogeneizde düzenleyici bir rol oynadığı gibi, astrosit işlevi de düzenler. Son olarak da nöronlar bu yapıya aktif olarak katılırlar (37).

#### ***2.4.2.1 Kan Beyin Bariyerini Oluşturan Hücreler***

##### ***2.4.2.1.1 Endotel Hücreleri***

KBB'de bulunan endotel hücreleri, periferik organlarda bulunan endotel hücrelerine göre, daha kısıtlayıcı bir ortam oluşturmak için farklılık gösterirler. Bu farklılıklar MSS'deki endotel hücreleri kan ve beyin arasındaki iyonların, moleküllerin ve hücrelerin hareketini sınırlandırılmasını sağlamaktadır ve sözü geçen bu farklılıklar aşağıdaki gibi özetlenebilir.

- 1) Transelüler akışı sınırlandırmak için daha az sayıda endositik vezikül içerirler ve çok düşük pinositik aktivite gösterirler,
- 2) Bariyerde bulunan, birbirlerine sıkı bağlantılar ve zonula okludensler ile bağlı olan endotel hücrelerinde pencere bulunmamaktadır,
- 3) Paraselüler akış miktarını kısıtlayan ve sıkı bağlantılardan kaynaklanan yüksek elektrik direnci,
- 4) Mitokondri sayısı periferik mikrodamarların hücrelerinden yaklaşık 5-10 kat daha fazladır. Bu da yüksek metabolik aktiviteyi gösterir.
- 5) Özel taşıma sistemlerine sahiptirler.

Endotel hücreleri, perisitler tarafından üretilen kollajenler, glikoproteinler, lamininler, proteoglikanlar ve diğer proteinleri içeren hücre dışı matriksi olan bazal lamina ile çevrilidirler. Beyin mikrovaskülatürü, KBB bozulmasına bağlı olarak felç ya da inflamasyon olduğu gibi bazal membran modifikasyonlarından çok etkilenir. (2,33,40).

Endotel hücreleri çözünen maddelerin paraselüler akışını sınırlayan sıkı bağlantılar tarafından bir arada tutulurlar. KBB'deki endotel hücreleri periferdekilerle

kıyaslandığında düşük transitoz oranına sahiptir bu da çözünen maddenin vezikül aracılı hücre içi taşınmasını büyük ölçüde kısıtlamaktadır (41).

### **Endotel Hücrelerinin Bağlantıları**

Subselüler seviyede kan beyin bariyerinin yapısal bütünlüğünden sorumlu olan ana komponentler TJ ve adherens bağlantılarıdır (adherens junction-AJ) (37). KBB oluşurken başlangıçta endotel hücreleri sıkı bağlantılara sahip değildir ve sızdıran bir yapıya sahiptir. Daha sonra endotel hücreleri arasında sıkı bağlantı kompleksleri oluşur. Yapısal olarak transmembran proteinleri ve sitoplazmik yardımcı proteinler sıkı bağlantıların yapısına katılır(42).

Sıkı bağlantılar, endotelde en apikaldeki interselüler bağlantı komplekslerini oluştururlar. Kan yolu ile taşınan paraselüler maddelerin difüzyonu ile lipit ve integral membran proteinlerinin lateral difüzyonu için bir bariyer oluştururlar. Ayrıca hücre içi bir sinyallenme platformu oluştururlar.

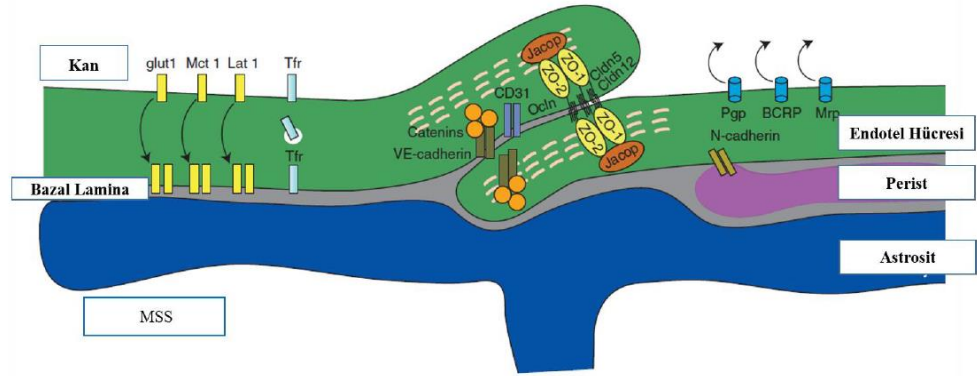
Periferik doku ve organlarda bulunan epitel hücrelerinde olduğu gibi, beyin endotel hücrelerinde de sıkı bağlantılar, integral membran proteinlerinden (okludin, kludin ve junctional adhezyon molekülleri), zonula okludens proteinleri, aktin hücre iskeleti, protein kinaz, küçük GTPaz'lar ve heterodimerik G proteinleri gibi integral membran proteinlerinden oluşur (2).

Vasküler endotelyal kaderin (VE kaderin), adherens birleşimi oluşturan ve hücreler arası adezyona aracılık eden başlıca temel kaderindir. Hem sıkı hem de adherens bağlantılar, endotel geçirgenliğinde anahtar rol oynamaktadır. Sıkı bağlantılar proteinlerin serbest difüzyonlarını önler ve endotel hücreleri arasındaki paraselüler açıklığı kapatır. AJ'ler ise, hücreden hücreye temaslarda önemli rol oynar (35).

Okludin (60 kDa), bir tetraspan integral membran proteindir ve hem epitel hem de MSS endotel hücreleri tarafından eksprese edilmektedir. Epitel hücrelerinde tanımlanan, bariyer için fonksiyonel olarak önemli olduğu gösterilen ilk sıkı bağlantıya özgü proteindir. Tricellulin (marvelD2) ve marvelD3 ile sıkı bağlantı kompleksi ilişkili protein ailesinin (TAMP) bir üyesidir. Okludin sinirsel olmayan dokulardaki endotel hücrelerine kıyasla, MSS endotel hücrelerinde daha fazla bulunmaktadır. Bu da KBB'nin önemli bir bileşeni olduğunu göstermektedir. Yine de okludin eksikliği olan mutant farelerde yapılan çalışmalarda, bu farelerin normal bir

epitel bariyerine ve işleyen bir KBB'ye sahip oldukları gösterilmiştir. Ancak bu farelerde MSS'i kalsifikasyonu gözlenmiş ve okludinin KBB boyunca kalsiyum akışını spesifik olarak düzenlediği düşünülmüştür (2,41).

Klaudinler epitel ve endotel hücrelerinde bulunan sıkı bağlantı komplekslerinde eksprese edilen 20-27 kDa ağırlığında olan membran proteinlerinden oluşan geniş bir ailenin üyesidir. Beyin endotel hücreleri ağırlıklı olarak klaudin-3 ve 5'i eksprese ederken, muhtemelen de klaudin-12'yi de eksprese etmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda klaudin-3 ve 5'in kan beyin bariyerinde sıkı bağlantı kompleksinin oluşumuna ve bütünlüğüne katkısı açıkça ortaya konulmuştur. *In vitro* kanıtlar, klaudinlerin parasellüler bariyerin oluşumu için gerekli olduğunu göstermektedir. Klaudinlerin ekspresyonu sıkı bağlantı komplekslerinin oluşması için yeterlidir. Klaudinlerin bozulması daha önce yapılan çalışmalarda köpek böbrek hücrelerindeki parasellüler bariyer özelliklerini azalttığı gösterilmiştir. Farklı klaudin ailesi üyeleri farklı dokularda farklı üyeler şeklinde eksprese olarak, parasellüler bariyeri desteklemektedir. Örneğin, epidermiste klaudin 1, böbrek epitelinde klaudin 16, MSS miyelin kılıfında klaudin 11 ve PSS miyelin kılıfında ise klaudin 19 eksprese edilmektedir. MSS endotel hücrelerinde ise, en fazla klaudin 5 eksprese olmaktadır. Klaudin-5'ten yoksun fareler üzerinde yapılan çalışmalarda KBB'nin yüksek oranda sızdırdığı bildirilmiştir. Kültüre edilmiş sıçan beyin hücrelerinde klaudin-5'in eksojen ekspresyonunun bariyer özelliklerini güçlendirdiğini gösterirken, Ohtsuki klaudin-5'in genetik olarak silindiği farelerde ve kültüre edilmiş insan beyin endotel hücrelerinde kan beyin bariyerinin bozulduğunu göstermiştir. Klaudin-5'e ek olarak KBB'de klaudin-3 ve klaudin-12'de eksprese edilmektedir (2,41).



**Şekil 8.** KBB moleküllerinin şematik gösterimi (41).

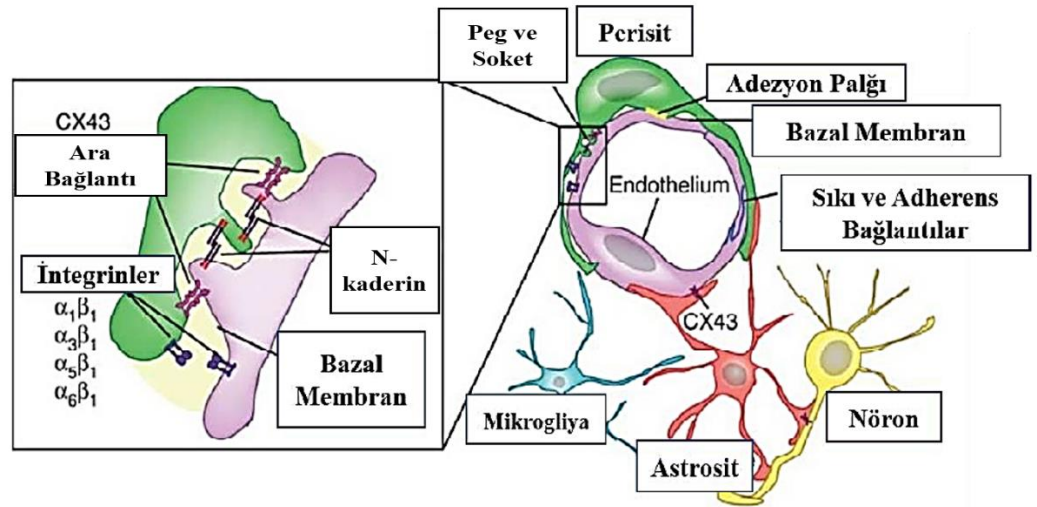
Transmembran adezyon kompleksleri, Zonula Okludens 1-2 (ZO-1, ZO-2), Singulin, Jacop, MAGI'ler ve MPP'ler dahil olmak üzere bir dizi sitoplazmik adaptör aracılığıyla hücre iskeletine bağlanır. Ek olarak, sıkı bağlantılar (Tight Junction- TJ), tüm endotel hücreleri bağlayan ve VE-kaderin ve trombosit endotel hücre adhezyon moleküllerinden (PECAM) oluşan ve kateninler tarafından hücre iskeletine bağlanan bazal AJ'ler ile etkileşime girer. ZO-1 (225 kDa), ZO-2 (160 kDa) ve ZO-1 (130 kDa) gibi birkaç sitoplazmik protein, TJ transmembran proteinleri ile birlikte, endotel hücreleriyle birlikte sıkı bağlantı bütünlüğüne katkı sağlamaktadır. Okludinler C-terminalleri ile ZO-1 proteinine bağlanırlar. Beyin endotel hücrelerinde ZO-1 ve okludens proteinlerinin ekspresyonu oldukça fazladır.

İlginç bir şekilde, kladin 5, kladin 12, ZO-1 ve ZO2 dahil olmak üzere tanımlanan TJ proteinlerinin çoğu, tüm dokularda endotel hücreleri tarafından eksprese ediliyor gibi görünmektedir. Bu nedenle, önemli bir soru, neden diğer dokulardaki endotel hücrelerinin değil, yalnızca MSS endotel hücrelerinin bu sıkı bariyeri oluşturduğudur. MSS endotel hücreleri periferik endotel hücreleri ile karşılaştıran transkripsiyonel analiz, jacop ve MPP7 dahil olmak üzere birkaç sitoplazmik adaptörün ve ayrıca üç hücreli TJ molekülleri, LSR ve marveld2'nin KBB'yi zenginleştirdiğini ve bu moleküllerin bu bariyer oluşumu için kritik olabileceğini düşündürmektedir (34,41).

#### 2.4.2.1.2 Perisit Hücreleri

Perisit hücreleri ilk kez 19. yy'da Rouget tarafından mural hücreleri (Rouget hücreleri) olarak adlandırıldı. Daha sonra Zimmermann, bu hücrelerin konumlarından dolayı, mural hücrelerini perisit olarak yeniden adlandırdı. Perisit hücrelerinin orijinleri uzun zamandır tartışma konusudur. Başlangıçta miyojenik fenotipleri eksprese eden perisitlerin düz kas hücrelerine benzer olduğuna inanılmaktaydı. Özellikle perisit hücrelerinin vimentin ve alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)'den oluşan kasılma iplikçiklerini içermesi ve vazomasyonda görev alması bu fikri desteklemekteydi. Ancak günümüzde perisit hücrelerinin hem mezenşimal kök hücre hem de nöral krest orijinli hücreler olduğuna inanılmaktadır (43).

Perisit hücrelerini tanımlayabilmek için bir dizi antijenik belirteç bulunmaktadır. Perisitler için membran bağlı belirteçler arasında trombosit kaynaklı büyüme faktörü beta (PDGFR- $\beta$ ), nöro/glial antijen-2(NG-2), CD146, alanine aminopeptidaz (CD13) ve endoglin ile birlikte CD90 ve CD105 gibi mezenkimal kök hücre belirteçleri sayılabilmektedir (43).



**Şekil 9.** Perisitlerin ultrastrüktürel özellikleri ve perisit-endotel etkileşimleri (43).

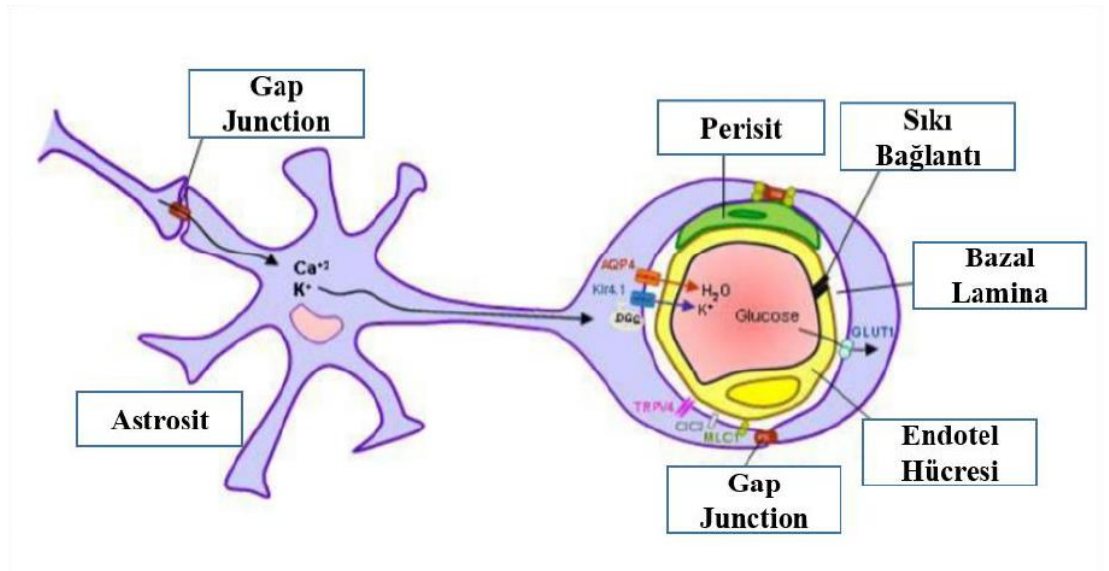
Perisitler, endotel hücrelerinin adlumsal yüzeyinde bulunmaktadır. Vasküler bazal membrana gömülüdürler ve beyin endotel hücrelerine gap junctionlar, peg ve soket düzenlemeler ile fiziksel olarak bağlanırlar. Perisitler anjiyogenezi düzenleyerek ve ekstraselüler matriksi oluşturarak beyin endotel hücrelerini korur ve stabilize

ederler. Perisitler uterusdaki bariyer bariyer fonksiyonları dahil olmak üzere, sıkı bağlantıların gelişimi için gereklidir. MSS'deki perisitler, periferde bulunanlara göre bazı farklılıklar içermektedir. Örneğin farelerde periferik organlarda endotel:perisit oranları 100:1 perisit bulunurken, MSS'de bu durum 4:1 şeklindedir. Bu oran insanlarda, MSS'de 1:1 ya da 1:3 gibiyken kas dokusunda 1:100 şeklindedir (41,44).

Perisit hücrelerinin anjiyogenez, ekstraselüler madde birikimi, yara iyileşmesi, immün sistem hücrelerinin infiltrasyonunun düzenlenmesi ve sinirsel aktiviteye karşı kan akımının düzenlenmesi gibi görevlerinin yanında, gelişim sırasında KBB'nin oluşumunda, düzenlenmesinde ve doğum sonrası yaşamda da KBB'nin devamlılığının sağlanmasında görev almaktadır. (41,44).

#### 2.4.2.1.3 Astrosit Hücreleri

Astrositler beyinde en fazla bulunan hücrelerdir ve nöronların fonksiyonlarını düzenlenmesine yardımcı bir ortam sağlamaktadır. Astrositler ağ benzeri yapıdaki astrosit son ayakları ile endotel hücreleriyle temas eder ve KBB'nin oluşumunda ve düzenlenmesinde rol oynar. Astrosit hücreleri KBB'ye iyon ve hacim düzenleme özelliği sağlayan Aqp-4 ve Kir.4.1K içermektedir. Bu proteinlerin astrositlerdeki varlığı, bazal laminada bir heparan sülfat proteoglikan olan agrin ekspresyonu ile ilişkilidir (44).



Şekil 10. Astrositler ve KBB (45).

Hem protoplazmik hem de fibröz astrositler KBB ile temas eder ve iki yönlü bir iletişim sağlar. KBB, kanda bulunan moleküllerin ve hücrelerin çoğunun beyin parankimine girişini engelleyen ve beynin düzgün çalışması için gereken spesifik mikro ortamı koruyan bir difüzyon bariyeridir. KBB, aralarında sıkı bağlantılar oluşturan ve adluminal taraflarında eşmerkezli bir şekilde perisitler, bazal lamina ve astrosit son ayaklarla çevrili olan beyin kapiller damarlarını kaplayan özel endotel hücrelerinden oluşur. Perikapiller astrosit uç ayakları, glikoz ve amino asitler gibi besin maddelerinin belirli taşıyıcılar aracılığıyla kan dolaşımından girişinin ve atık metabolitlerin çıkışının kontrolünde yer alır. Perikapiller astrosit uç ayakları, distrofin ile ilişkili protein kompleksi tarafından zara sabitlenen ve bu bölgelerdeki su ve K değişimini düzenlemek için Kir4.1 ile işlevsel olarak işbirliği yapan su kanalı Aqp-4 bakımından da zenginleştirilmiştir (45).

#### **2.4.2.1.4 Nöronlar**

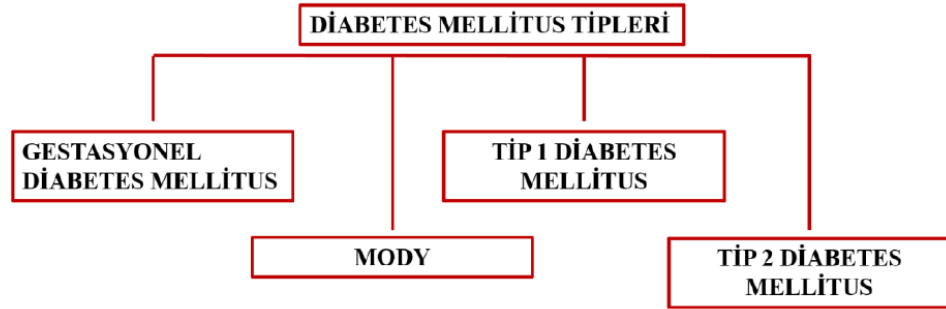
Nöronlar kapiller damarlara yakın kalırlar ve astrosit son ayakları aracılığıyla KBB'yle bağlantı kurmaktadır. Nöronlar ve KBB'deki endotel hücreleri arasında 8-20 µm kadar aralık bulunmaktadır. Endotel hücrelerine olan yakınlık, nöronların, özellikle iyon dengesi açısından, sürekli değişen ortama yanıt vermesini sağlar. Nöronlar, kan akışını ve mikrovasküler geçirgenliği düzenlemede rol oynar, hücre dışı matriks ile etkileşime girer ve anjiyogenezi uyarmak için faktörleri serbest bırakabilir(44).

#### **2.5 Diabetes Mellitus**

Diabetes Mellitus (DM) 21. Yüzyılın en önemli halk sağlığı sorunlarında biridir ve bu nedenle hem sosyal hem de ekonomik yük oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre dünya nüfusunun %10'dan fazlası DM hastasıdır (46). Uluslararası Diyabet Federasyonunun verdiği rakamlar ise, günümüzde 415 milyon kişinin yani 11 kişiden 1'i diyabet hastası ve bu rakamın 2040 yılında 642 milyona çıkacağı düşünülmektedir. Diyabet prevelansı genetik ve kültürel faktörlere bağlı olarak farklı populasyonlarda değişiklik gösterir. Dünya geneline baktığımız zaman, ülkenin ekonomik gelişimi, cinsiyet ve yaş diyabet prevalansı ile bağlantılı faktörlerdir. Diyabet hastalarının yaklaşık %75'i düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşamaktadır (47). DM kalp hastalıkları ve felç gibi kardiyovasküler hastalıklar ile böbrek yetmezliği ve retinopatinin başlıca nedenidir (46).

DM'nin tanımlayıcı özelliği, hipergliseminin varlığıdır. DM'nin en yaygın görülen şekilleri pankreas beta hücreleri hasarına bağlı olarak mutlak insülin eksikliğinin ortaya çıktığı, Tip 1 DM ve insülin direncinin hiperglisemiye yol açtığı Tip 2 DM'dir (47).

Genel olarak diyabet, vakaların %5-10'nunu oluşturan pankreas beta hücrelerin otoimmün aracılı disfonksiyonu olan Tip 1 DM, %90'nını ise yetersiz, insülin salgısı ile kategorize edilen Tip 2 DM oluşturmaktadır. Diyabetin sınıflandırılması genetik alanında son yapılan çalışmalar ile tekrar revize edilmiştir. Dünya genelindeki vakaların %2-5'ini oluşturan gençlerde görülen erişkin tipi diyabet (MODY) ve neonatal diabetes mellitus (NDM) dahil olmak üzere birkaç miyojenik hastalık formunu ortaya çıkarmıştır (48).



**Şekil 11.** Diabetes Mellitus'un sınıflandırılması (48).

İmmün-aracılı ve idiopatik olmak üzere 2 tip Tip1DM vardır. İmmün-aracılı Tip 1 DM'de hücre yıkımı oldukça değişkendir. Özellikle bebekler ve çocuklarda hızlı hücre yıkımı gözlenirken, yetişkinlerde çoğunlukla yavaştır. Bazı hastalarda özellikle çocuklarda hastalığın ilk belirtisi olarak ketoasidoz görülmektedir. Diğerlerinde ise, enfeksiyon ya da başka stres varlığında hızla şiddetli hiperglisemi ya da ketoasidoza dönüşebilen orta düzeyde açlık hiperglisemisi vardır. İdiopatik Tip1DM'nin etiyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Hastaların bazılarında kalıcı insülinemi vardır ve ketoasidoza eğilimlidirler ancak otoimmunitiyi işaret eden herhangi bir kanıt bulunamamıştır.

Tip 2DM'nin oluşmasında birçok farklı neden vardır. Spesifik etiyolojiler bilinmemekle birlikte, pankreas beta hücrelerinde otoimmün yıkım görülmez. Bu tür hastaların birçoğu obezdir ve obezite bir dereceye kadar insülin direncine neden olur.

Ketoasidoz bu tip diyabette nadiren ortaya çıkar ve genellikle ketoasidoz genellikle enfeksiyon gibi başka bir stresin sebebi ile ortaya çıkar. Tip 2DM'de hiperglisemi yavaş yavaş geliştiği için genellikle uzun süre teşhis edilemez. Bununla birlikte bu hastalar mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar gelişmesi bakımından risk altındadır.

GDM, hamilelik sırasında başlayan ya da ilk fark edilen herhangi bir derecede glikoz intoleransı olarak tanımlanmaktadır. Glikoz toleransının bozulması normal olarak hamilelik sırasında, özellikle 3. trimesterde ortaya çıkar (49).

### **2.5.1 Gestasyonel Diabetes Mellitus**

GDM gebelik sırasında anormal glukoz toleransı şeklinde tanımlanmaktadır. GDM'den etkilenen kadınların sayısı dünya çapında artmaktadır ve gebeliklerin yaklaşık olarak %2-14'ünü etkilemektedir. GDM, kadınlarda ve yavrularında ileride Tip 2 DM görülme riski artırmaktadır. Ancak günümüzde hala GDM'nin etiyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Gebelik boyunca insülin duyarlılığında kademeli olarak bir azalma vardır ve insülin direncinin artmış maternal adipozite ve plasentanın hormonal etkileri nedeniyle GDM ile ilişkili oluğu görülmektedir (50).

GDM hem anne hem de yavruları için gebelik riskleri ile ilişkilidir. Obezite ve Tip 2 DM artışıyla birlikte GDM prevalansı son 50 yılda artmıştır. 2014 yılında obez ya da aşırı kilolu hamile kadınların sayısı yaklaşık olarak 40 milyon kadardır. Yavrular için GDM'nin etkisi artmış doğum ağırlığı, neonatal hipoglisemi, neonatal adipozite, sarılık ve doğum travmasıdır (51).

Sağlıklı gebelik sırasında, fetüsün taleplerini desteklemek için annenin vücudu bazı fizyolojik değişikliklere uğrar. Bu değişiklikler kardiyovasküler, ream, hematolojik, solunum ve metabolik sistemlerde adaptasyonları içermektedir. En önemli metabolik adaptasyon ise, insülin duyarlılığıdır. Gebelik boyunca insülin duyarlılığı gebeliğin gereksinimlerine bağlı olarak değişir. Gebeliğin erken dönemlerinde insüline olan duyarlılık artar ve gebeliğin enerji taleplerine hazırlık olarak glikozun yağ depolarına alınımını teşvik eder. Sonuç olarak, kan şekeri hafifçe yükselir ve bu glikoz, fetüsün büyümesini hızlandırmak için kolayca plasenta boyunca taşınır. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar, glukoz homeostazını sürdürmek için gebe kadınların bu değişiklikleri, pankreas  $\beta$ -hücrelerinin hipertrofisi ve hiperplazisi

ve ayrıca glikozla uyarılan insülin sekresyonunun artması yoluyla telafi ettiğini göstermiştir (52).

GDM vakalarının yaklaşık %80'i, gebeliğin normal insülin direncinin kısmen katkı sağladığı kronik insülin direnci arka planında  $\beta$  hücre disfonksiyonu nedeni ile gelişmektedir. Bu nedenle etkilenen kadınlar daha da fazla insülin direncine sahip olma eğilimindedirler. GDM'nin risk faktörleri arasında obezite/aşırı kilo alımı, batı tarzı beslenme, etnik köken, genetik polimorfizmler, ileri anne yaşı, intrauterin ortam, ailede GDM geçmişi ve polikistik over sendromu (PCOS) gibi insülin direnci hastalıklar sayılabilir. Bu risk faktörlerinin her biri doğrudan ya da dolaylı olarak bozulmuş  $\beta$  hücre fonksiyonu ya da insülin direnci ile ilişkilidir (52).

GDM bebek için kısa ve uzun vadeli sonuçlar oluşturmaktadır. Glikoz, aminoasitler ve yağ asitlerinin plasental taşınımındaki artış fetüsün endojen insülin üretimini ve insülin benzeri büyüme faktör-1 (IGF-1)'i uyarır. Bunlar birlikte fetal aşırı büyümeye neden olabilir ve genellikle doğumda makrozomi ile sonuçlanır. Daha önce bahsedildiği gibi, aşırı fetal insülin üretimi, gelişmekte olan pankreas  $\beta$  hücrelerini strese sokarak işlev bozukluğuna ve insülin direncine prenatal dönemde bile neden olabilmektedir. Doğumdan sonra, bu bebekler hipoglisemi riski altındadır; bu, muhtemelen maternal hiperglisemiye (fetal hiperinsülinemi) bağımlılık oluşturmaları nedeniyle, uygun şekilde yönetilmezlerse beyin hasarına neden olabilmektedirler (52).

#### ***2.5.1.1 Gestasyonel Diabetes Mellitus ve Beyin Gelişimi***

Prenatal ortamın yaşamın ilerleyen dönemlerinde hastalık geliştirme riskini artırdığı giderek daha fazla kabul edilmektedir. Çok sayıda çalışma, gebelik sırasında çeşitli stres faktörlerinin nörobilişsel sorunlar da dahil olmak üzere birçok risk ile bağlantılı olduğu tanımlamıştır. GDM gebelik sırasında en fazla görülen metabolik hastalıktır. Hem anne hem de çocuk üzerinde önemli morbiditeye ve uzun vadede komplikasyonlara neden olmaktadır. Son doğum kohort çalışmaları, gebelik sırasında diyabetin otizm spektrum bozukluğu riskini artırdığı ve potansiyel olarak şizofreniye neden olduğu bildirilmiştir. Deneysel GDM hayvan modellerinde de yavruların çok çeşitli nörogelişimsel, davranışsal ve bilişsel anormallikler gösterdiği gözlenmiştir (53).

Daha önce yapılan çalışmalar gebelikte hipergliseminin, yavrularda nörogelişimsel bozukluk riskini artırdığı gösterilmiştir. Nörogelişim üzerinde

gözlenen bu etkilerin şiddeti, hipergliseminin derecesi ile doğru orantılıdır. Gelişim sırasında, embriyonik sinir sistemi yüksek kan şekeri seviyelerine karşı oldukça hassastır. Nörulasyon ve kortikogenez, MSS gelişimi sırasında kritik olan 2 aşamadır. Gebeliğin erken dönemlerinde şiddetli hiperglisemi, embriyonik nöral tüpün kapanmasını etkileyerek, nöral tüp defektleri (NTD) riskini artırmaktadır (54).

Maternal diyabet, insanlarda NTD insidansını en az 11/1000 arttıran risk faktörüdür (bu oran coğrafi bölgelere göre %1,1 ile 4 arasında değişmektedir). NTD'lerine ek olarak, maternal diyabet ayrıca entellektüel zeka, dil, motor aktivite, öğrenme ve psikososyal gelişimindeki bozukluklar ile de ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle de NTD'leri dışında, MSS gelişimi sırasında da defektler ortaya çıkabilir.

Maternal diyabet, nöronal kök hücrelerin proliferasyonunu, migrasyonunu, farklılaşmasını ve hayatta kalmasını etkileyebilmektedir. Bu etkiler sinir gelişimini etkileyen kusurlara ve sonuç olarak merkezi sinir sisteminin çeşitli fonksiyonlarının bozulmasına neden olabilmektedir. Bu rahatsızlıkların türü ve kapsamı, hangi anatomik yapının etkilendiğine ve nöral tüp gelişimi sırasında meydana geldiği zaman penceresine bağlıdır. Bazı çalışmalar, yüksek glikoz seviyelerinin anormal nöronal kök hücrelerin ölümüne, proliferasyona ve hem *in vivo* hem de *in vitro* hücre kaderi seçimine yol açtığını göstermiştir (55).

Daha önce yapılan çalışmalarda, gebelik sırasında diyabet olan annelerin çocuklarında, nörolojik bozukluklar olduğu gösterilmiştir. Örneğin Ornoy'un 2001 yılında yaptığı çalışmada, gebelik diyabeti olan annelerin çocuklarında birçok nörolojik fonksiyonun kontrollere kıyasla daha kötü olduğu bildirilmiştir (56).

GDM'nin yetersiz fetal proglamlama ile ilişkili fetal sinir sistemini etkilediği, doku, organ ve sistemlerin yapısında ve işlevinde değişikliklere neden olduğu bilinmektedir. Farelerde oluşturulan deneysel GDM modelinde maternal diyabetin Shh ve beyin faktör-1 gibi indükleyici sinyallerin ekspresyonunun artırdığı ve bunun sonucunda önbeyin hiperplazisinin arttığı gözlenmiştir (57).

Hipergliseminin mikrovasküler düzeyde neden olduğu komplikasyonlar içinde, düşük perfüzyon oranları, kapiller damarların duvarlarında kalınlaşma, vasküler geçirgenliğin artması ve anormal endotel hücre proliferasyonu sayılabilmektedir (12). GDM hem anne hem de çocukta uzun vadede metabolik hastalık riskine neden olmakla birlikte, gebelik sırasında ortaya çıkan bu maternal diyabet MSS'nin gelişimini de

olumsuz yönde etkilemektedir. GDM’li annelerin ebbekleri 6 aylıkken, sağlıklı annelerin bebekleri ile karşılaştırıldığında daha düşük zihinsel ve psikomotor gelişim düzeyleri göstermektedir (58,59).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Araştırmanın Tipi

Araştırma deneyseldir.

#### 3.2 Araştırmanın Yeri Ve Zamanı

Araştırmanın deneysel ayağı Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Histokimyasal ve immunohistokimyasal değerlendirmeler Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

#### 3.3 Araştırmanın Evreni Ve Örneklem

Araştırmada toplam üç grup oluşturulmuştur. Deney grupları aşağıdaki şekilde düzenlenmiştir:

**Grup 1 (Kontrol Grubu):** Hiçbir şey uygulanmayan dişi fareler katıma alınmış ve gebe farelerin normal doğum süreleri beklenip, yavrular gelişimlerinin değişik zamanlarında sakrifiye edilmiştir.

**Grup 1a (n:7):** Hiçbir şey uygulanmayan gebe farelerden elde edilen yavrular postnatal 0. günde KBB gelişimini incelemek için sakrifiye edilip ve beyin dokuları diseke edilmiştir.

**Grup 1b (n:7):** Hiçbir şey uygulanmayan gebe farelerden elde edilen yavrular postnatal 7. günde KBB gelişimini incelemek için sakrifiye edilip ve beyin dokuları diseke edilmiştir.

**Grup 1c (n:7):** Hiçbir şey uygulanmayan gebe farelerden elde edilen yavrular postnatal 21. günde KBB gelişimini incelemek için sakrifiye edilip ve beyin dokuları diseke edilmiştir.

**Grup 2 (Sham Grubu):** Gebeliklerinin 5. gününde sham gruplarına intraperitoneal olarak streptozotosin (STZ)'nin çözgen maddesi olan sodyum sitrat buffer, (0.1 ml, 0.1 M sitrat, pH 4.5) uygulaması yapılmış ve gebe farelerin normal doğum süreleri beklenip, yavrular gelişimlerinin değişik zamanlarında sakrifiye edilmiştir.

**Grup 2a (n:7):** Sodyum sitrat buffer uygulanan gebe farelerden elde edilen yavrular postnatal 0. günde KBB gelişimini incelemek için sakrifiye edilip ve beyin dokuları diseke edilmiştir.

**Grup 2b (n:7):** Sodyum sitrat buffer uygulanan gebe farelerden elde edilen yavrular postnatal 7. günde KBB gelişimini incelemek için sakrifiye edilip ve beyin dokuları diseke edilmiştir.

**Grup 2c (n:7):** Sodyum sitrat buffer uygulanan gebe farelerden elde edilen yavrular postnatal 21. günde KBB gelişimini incelemek için sakrifiye edilip ve beyin dokuları diseke edilmiştir.

**Grup 3 (GDM Grubu):** Gebeliklerinin 5. gününde GDM gruplarına intraperitoneal olarak sitrat (0.1 ml, 0.1 M sitrat, pH 4.5) içinde çözünmüş olan 40 mg/kg STZ uygulanarak gestasyonel diabetes mellitus modeli oluşturulmuş ve gebe farelerin normal doğum süreleri beklenip, yavrular gelişimlerinin değişik zamanlarında sakrifiye edilmiştir.

**Grup 3a (n:7):** GDM modeli oluşturulan gebe farelerden elde edilen yavrular postnatal 0. günde KBB gelişimini incelemek için sakrifiye edilip ve beyin dokuları diseke edilmiştir.

**Grup 3b (n:7):** GDM modeli oluşturulan gebe farelerden elde edilen yavrular postnatal 7. günde KBB gelişimini incelemek için sakrifiye edilip ve beyin dokuları diseke edilmiştir.

**Grup 3c (n:7):** GDM modeli oluşturulan gebe farelerden elde edilen yavrular postnatal 21. günde KBB gelişimini incelemek için sakrifiye edilip ve beyin dokuları diseke edilmiştir.

### **3.4 Çalışma Materyali**

Çalışmamızda Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edilen C57BL/6 suşu toplam 18 dişi fare kullanılmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı, Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda Wistar suşunun bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu tür ve cins seçilmiştir. Tüm denekler çalışma sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarlarında 12/12 saat karanlık/aydınlık periyodunda, 20–22 °C oda sıcaklığında barındırılmıştır. Denekler dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile beslenmiştir.

### **3.5 Araştırmanın Değişkenleri**

Araştırmada Kontrol P0, P7 ve P21 gruplarına hiçbir uygulama yapılmamıştır. Sham P0, P7 ve P21 gruplarında anne farelere gebeliklerinin 5. gününde

intraperitoneal olarak STZ'nin çözgen maddesi olan sodyum sitrat buffer, (0.1 ml, 0.1 M sitrat, pH 4.5) uygulanmış olup, GDM P:0, P:7 ve P:21 gruplarında anne farelere gebeliklerinin 5. gününde intraperitoneal olarak sitrat (0.1 ml, 0.1 M sitrat, pH 4.5) içinde çözünmüş olan 40 mg/kg STZ uygulanmıştır.

### 3.6 Veri Toplama Araçları

Araştırmada; deneklerden elde edilen dokuların takibinde, boyamalarda ve immünohistokimyasal incelemelerde Tablo 1. deki demirbaşlar ve sarf malzemeleri kullanıldı (Tablo 1).

**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan demirbaş ve sarf malzemeler

| Malzeme Adı          | Markası/Kod                  | Kullanım Amacı        |
|----------------------|------------------------------|-----------------------|
| Etüv                 | Dedeoğlu Etüv                | Histolojik çalışmalar |
| Mikrotom             | LEICA RM 2255 Mikrotom       | Histolojik çalışmalar |
| Distile Su Cihazı    | Direct-Q Millipore Distile   | Histolojik çalışmalar |
| Çeker Ocak           | Özcam Cam                    | Histolojik çalışmalar |
| Su Banyosu           | TermoFin                     | Histolojik çalışmalar |
| Buzdolabı            | Ariston Buzdolabı            | Histolojik çalışmalar |
| Formaldehit          | Merck                        | Dokuların fiksasyonu  |
| Etil Alkol           | Tekkim/TK.200650.02501       | Doku takibi           |
| Aseton               | Tekkim/TK.911013.02501       | Doku takibi           |
| Xylol                | Tekkim/TK.090270.02500       | Doku takibi           |
| Parafin              | Tekkim/TK200661.05004        | Dokuların bloklanması |
| Mikrotom Bıçağı      | Feather/S35                  | İnce kesitler         |
| Hematoksilen         | Bio-optica/05-06002          | HE boyaması           |
| Eosin                | Bio-optica/05-10002          | HE boyaması           |
| Krezil viole         | Sigma/1.05235                | CV boyaması           |
| Hidrojen Peroksit    | Sigma/ H1009-5ML             | İmmunhistokmya        |
| Sitrat               | Sigma/C9999-100ML            | İmmunhistokmya        |
| Aqp-4 Antikor        | BiossUSA/BS-0634R            | İmmunhistokmya        |
| $\alpha$ SMA Antikor | Abcam/ab5694                 | İmmunhistokmya        |
| VE-Kaderin 5 Antikor | BiossUSA/ BS-4310R           | İmmunhistokmya        |
| Claudin 5 Antikor    | ABM/Y409871                  | İmmunhistokmya        |
| Sekonder Antikor     | ScyTek/PAR                   | İmmunhistokmya        |
| DAB Kit              | Thermofisher/34002           | İmmunhistokmya        |
| DAB Substrat         | Sigma/11718096001            | İmmunhistokmya        |
| PBS                  | Bioshop<br>Canada/Pbs404.100 | İmmunhistokmya        |
| Lam                  | Lamtek                       | Preparat hazırlığı    |
| Lamel                | Lamtek/LT1001820             | Preparat hazırlığı    |
| Entellan             | Merck/1.07961.0100           | Preparat hazırlığı    |
| Mikroskop            | Olympus Mikroskop            | Görüntüleme           |

### ***3.6.1 Araştırmada Kullanılan Yöntemler***

Deney sonunda elde edilen doku örneklerine rutin doku takip prosedürü uygulandı, ince kesitleri alınmış, çeşitli histokimyasal ve immünohistokimyasal boya uygulamalarına tabi tutuldu. Araştırmada histokimyasal değişiklikler için hematoksilin-eozin, ve krezil-viyole, immünohistokimyasal olarak endotel hücreleri için anti-CDH 5 (Kaderin-5), perisit hücreleri için anti- $\alpha$  SMA, KBB permeabilitesinin nasıl etkilendiğini anlamak için, anti-klaudin 5 antikorları ile astrosit hücreleri ile BEH'ler arasındaki ilişki incelenecek için anti-Aquaporin-4 (Aqp4) immünohistokimya boyaması yapıldı.

#### ***3.6.1.1 Denek Kan/Glukoz Düzeylerinin Değerlendirilmesi***

Deneklerin deney başında kan/glukoz düzeyleri glukometre ile ölçüldü. Hiperglisemik olmayan denekler çalışmaya dahil edildi. Daha sonra katıma alınan ve gebeliklerinin 5. gününde olan, GDM grubundaki deneklere intraperitoneal olarak sitrat (0.1 ml, 0.1 M sitrat, pH 4.5) içinde çözünmüş olan 40 mg/kg STZ uygulandı. Uygulamayı takip eden 3. günde deneklerin kan/glukoz seviyeleri glukometre ile tekrar ölçüldü. Deney sonunda tüm deneklerin kan/glukoz değerleri ölçülerek not edildi. Grup içi ve gruplar arası farklar istatistiksel olarak değerlendirilip,  $p < 0,05$  olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

#### ***3.6.1.2 Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi***

Deney sonunda (sakrifikasyon öncesi) deneklerin ve beyin dokularının ağırlıkları ölçüldü. Sonuçlar SPSS 20,0 paket programında değerlendirildi. Deneklerin ağırlık verilerinin, gruplar arası karşılaştırılmasında  $p < 0,05$  olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

#### ***3.6.1.3 Deneklerin Menstrüel Sikluslarının Belirlenmesi***

Dişi farelere hergün 6-12 saat aralıklarla vagina smear uygulandı. Vaginal smearla alınan örnekler lama yayıldı. Hazırlanan preparatlar %96'lık, %80'lik, %70'lik azalan alkol serilerinden geçirilip, akarsuda 5 dakika bekletildi. Daha sonra 30 saniye eozinde bekletildi. Eozinden çıkarılan preparatlar %70'lik, %80'lik ve %96'lık artan alkol serilerinden geçirilip havada kurutulduktan sonra, preparatlar incelendi. Vaginal sitolojik veriler Schaberg (1992)'nin döngüsel değişimlerine bağlı olarak elde ettiği bulgular doğrultusunda değerlendirildi.

#### 3.6.1.4 Histokimyasal İncelemeler

Beyin dokuları histokimyasal incelemeler için %10'luk formolde 24–48 saat bekletilerek fiske edildi. Daha sonra fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandı. Dehidratasyon amacıyla sırasıyla %70, %80 ve %96'luk etil alkol serilerinde 20'şer dakika; ardından 4 farklı aseton serisinde 20'şer dakika tutuldu. Şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki farklı ksilene tabi tutuldu. 1'er saatlik 2 kez yumuşak parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular sert parafin bloklar içerisine gömüldü. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 5µ kalınlığında kesitler alındı (Tablo 2).

**Tablo 2.** Doku Takip Protokolü

| İşlem                    | Madde                           | Süre      |
|--------------------------|---------------------------------|-----------|
| Fiksasyon                | %10 Formol                      | 72 saat   |
| Fiksatiften Uzaklaştırma | Akarsu                          | 1 gece    |
| Dehidratasyon            | %70-80-96-100-<br>100'lük alkol | 20'şer dk |
| Post Fiksasyon           | Aseton I-II-III-IV              | 20'şer dk |
| Şeffaflandırma           | Ksilen I-II                     | 30'ar dk  |
| İnfiltrasyon             | Yumuşak Parafin I-II            | 1'er saat |
| Bloklama                 | Sert Parafin                    | Saklama   |

##### 3.6.1.4.1 Hematoksilen-Eosin Boya Protokolü

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde tutuldu. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra dehidratasyon işlemi için 5 değişim azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası

ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absölü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 3).

**Tablo 3.** Hematoksilen-Eosin boya protokolü

| İşlem                   | Madde                                                 | Süre      |
|-------------------------|-------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Deparafinizasyon</b> | 60 °C Etüv                                            | 1 Gece    |
| <b>Deparafinizasyon</b> | Ksilen I (etüvde)                                     | 20 dk     |
| <b>Deparafinizasyon</b> | Ksilen II (oda ısında)                                | 20 dk     |
| <b>Deparafinizasyon</b> | Ksilen III (oda ısında)                               | 20 dk     |
| <b>Rehidratasyon</b>    | %100'lük alkol                                        | 1 dk      |
| <b>Rehidratasyon</b>    | %100'lük, % 96'lık alkol,<br>% 80'lik, % 70'lik alkol | 1'er dk   |
| <b>Yıkama</b>           | Distile su                                            | 1 dk      |
| <b>Boyama</b>           | Hematoksilen                                          | 5 dk      |
| <b>Yıkama</b>           | Akarsu                                                | 5 dk      |
| <b>Boyama</b>           | Eozin                                                 | 15 sn     |
| <b>Yıkama</b>           | %70-80-96-100-100'lük alkol                           | Çalkalama |
| <b>Şeffaflaştırma</b>   | Ksilen I                                              | 20 dk     |
| <b>Şeffaflaştırma</b>   | Ksilen II                                             | 20 dk     |
| <b>Şeffaflaştırma</b>   | Ksilen III                                            | 20 dk     |
| <b>Kapama</b>           | Entellan                                              |           |

#### 3.6.1.4.2 Krezil Viyole Boya Protokolü

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde tutuldu. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra dehidratasyon işlemi için 5 değişim azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 30 dakika krezil viyole ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absölü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 4).

**Tablo 4.** Krezil Viyole boya protokolü.

| İşlem                   | Madde                                                 | Süre      |
|-------------------------|-------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Deparafinizasyon</b> | 60 °C Etüv                                            | 1 Gece    |
| <b>Deparafinizasyon</b> | Ksilen I (etüvde)                                     | 20 dk     |
| <b>Deparafinizasyon</b> | Ksilen II (oda ısında)                                | 20 dk     |
| <b>Deparafinizasyon</b> | Ksilen III (oda ısında)                               | 20 dk     |
| <b>Rehidratasyon</b>    | %100'lük, % 96'lık alkol,<br>% 80'lik, % 70'lik alkol | 1'er dk   |
| <b>Yıkama</b>           | Distile su                                            | 1 dk      |
| <b>Boyama</b>           | Krezil Violet                                         | 30 dk     |
| <b>Yıkama</b>           | %70-80-96-100-100'lük<br>alkol                        | Çalkalama |
| <b>Şeffaflaştırma</b>   | Ksilen I                                              | 20 dk     |
| <b>Şeffaflaştırma</b>   | Ksilen II                                             | 20 dk     |
| <b>Şeffaflaştırma</b>   | Ksilen III                                            | 20 dk     |
| <b>Kapama</b>           | Entellan                                              |           |

### **3.6.1.5 Morfometrik Değerlendirmeler**

#### **3.6.1.5.1 Hematoksilen-Eosin Boyama Değerlendirmesi**

Deney grubundaki her bir denek için prefrontal korteksten ayrı ayrı 5 µm'lik seri kesitler alındı ve histomorfolojik değerlendirme için hematoksilen-eosin boyası ile boyama yapıldı. Beyin dokuları pia mater, subpial aralık, araknoid membran, intra serebellar korteks alanı ve bu alanlarda bulunan kapiller ile nöropil, nöron ve glial hücre değerlendirilmesi yapıldı.

#### **3.6.1.5.2 Beyin Prefrontal Korteks Bölgesinde Nöron Sayımı**

Deneklerin beyin prefrontal kortekslerinden alınan 5 µm'lik seri kesitler stoklandı. Aynı hücreleri saymamak için dört kesit atlanarak yaklaşık 20 µm derinleşerek farklı bir seviyeye ulaşıldı. 1., 5. ve 9. kesitler ve her kesit için rastgele farklı 5'er alan olacak şekilde toplamda 15'er farklı alandan MSS hücre sayımı yapıldı. Tarafsız bir sonuç elde edebilmek için sayımlar kör yöntemle ImageJ yazılımı kullanılarak manuel olarak ölçüldü. Elde edilen hücre sayımlarının her bir denek için ortalaması alındı ve istatistiksel olarak değerlendirildi.

### **3.6.1.6 İmmünohistokimyasal İncelemeler**

#### **3.6.1.6.1 İmmunhistokimya Boyama Protokolü**

Alınan kesitler öncelikle 60°C'lik etüvde 1 gece bekletildi daha sonra şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Azalan alkol serilerinden geçirilip distile suda çalkalandı. Suyu uzaklaştırılan dokuların etrafı pappen ile çizildi. Ardından dokular 15 dakika 37°C de Tripsin ile muamele edildi. 3 kez fosfat tamponlu saline (PBS) ile yıkanan kesitler 10 dk Hidrojen Peroksit ile oda ısısında muamele edildi. Tekrar PBS ile yıkama yapıldı ve 1 saat bloklama solüsyonu (TA125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile bekletildi. Primer antikor fare spesifik anti-CDH 5 (Kaderin-5), anti- α SMA, anti-klaudin 5 ve anti-Aquaporin-4 (Aqp4) ile + 4 °C' de 1 gece bekletildi. Ertesi gün PBS ile yapılan yıkamadan sonra anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidad ikincil antikor (85-9043 Zymed Histostain Kit, San Francisco, USA) ile 30 dakika bekletildi. Yine PBS ile yıkanan kesitler oluşturulan immünohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminabenzidinin (DAB) (Roche, Germany) ile muamele edildi. Distile su ile yıkanan kesitlere mayer's hematoksilen ile artalan boyaması sağlandıktan sonra akarsu

ile yıkandı. Artan alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

#### **3.6.1.6.2 Yarı-sayısal İmmunohistokimyasal Analiz**

Hücrelerdeki Kaderin-5,  $\alpha$  SMA, klaudin 5 ve Aquaporin-4 (Aqp4) moleküllerinin dağılımını belirlemek için anti-VE CDH 5 (VE-Kaderin-5), anti- $\alpha$  SMA, anti-klaudin 5 ve anti-Aquaporin-4 (Aqp4) antikor boyaması yapıldı. Gruplar arası bu moleküllerinin dağılımını belirlemek için, beyin dokusunda prefrontal korteks bölgesinde immün pozitif hücre sayım yapıldı. Karavasilis ve ark.larının 2005 yılında epitel hücrelerinin immünreaktivitesini değerlendirmek için kullandıkları yöntem çalışma grubumuz tarafından geliştirilerek semi-kantitatif/yarı-sayısal immunhistokimyasal skorlama yapıldı. Her gruptaki deneklerden yine 5  $\mu$ m'lik seri kesitler alındı ve farklı damarlarda toplamda 100 hücre sayılarak immünpozitif hücre değerlendirmesi yapıldı. Her bir grup için sayısal değerler elde edildi ve istatistiksel olarak değerlendirildi.

### **3.7 Araştırma Planı**

**Tablo 5.** Araştırmanın Planı ve Takvim

|                                                                      |
|----------------------------------------------------------------------|
| Tez Konusunun Blirlenmesi ve Literatür Araştırması                   |
| Şubat 2018                                                           |
| <b>Etik Kurul ve Yönetim Kurulu Onayı</b>                            |
| Haziran 2018                                                         |
| <b>DeneySEL Materyalin Toplanması ve Dokuların Değerlendirilmesi</b> |
| Ağustos 2020-Eylül 2021                                              |
| <b>Laboratuvar Çalışmaları</b>                                       |
| Eylül 2021-Ocak 2021                                                 |
| <b>Tez Yazma</b>                                                     |
| Ocak 2021-Nisan 2021                                                 |

### **3.8 Verilerin Değerlendirilmesi**

Deney sonunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SPSS 20,0 paket programı kullanıldı. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterildi Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans Analizi testi, grupların ikili karşılaştırmada da Mann-Whitney U testi kullanıldı.  $p<0,05$  olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### **3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları**

Araştırma planlanan doğrultuda ilerlemiş, herhangi bir aksaklıkla karşılaşılmamıştır. Araştırmada herhangi bir sınırlılık durumu ortaya çıkmamıştır.

### **3.10 Etik Kurul Onayı**

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisiplin Laboratuvarı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 26/06/2018 tarihindeki toplantısında 38/2018 protokol numarası ile onaylanmıştır.

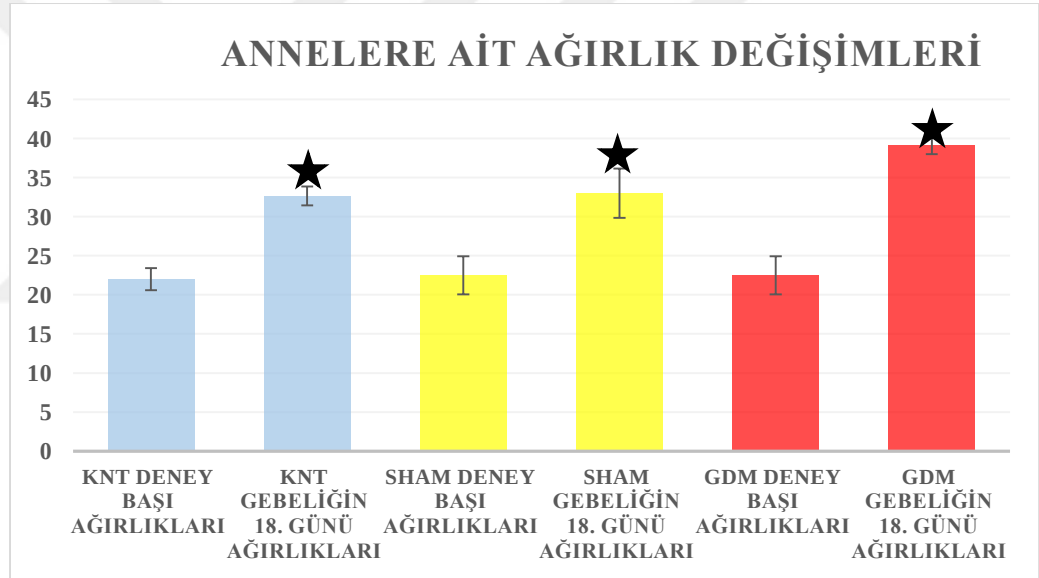


## 4. BULGULAR

### 4.1 Annelerin Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deneyde kullanılan annelerin gebelik öncesi yani deney başlangıç ağırlık ortalamaları; kontrol gruplarında  $22\pm1,414$  gr, sham gruplarında  $22,50\pm2,428$  gr ve GDM gruplarında  $22,50\pm2,428$  gr olarak bulundu. Deneklerin gebeliklerinin 18. günündeki ağırlık ortalamaları ise; kontrol gruplarında  $32,666\pm1,211$  gr, sham gruplarında  $33\pm3,162$  gr ve GDM gruplarında  $39,166\pm1,169$  gr olarak bulundu (Grafik 1).

**Grafik 1.** Deney Gruplarında Annelere Ait Ağırlık Değişimleri



Bu değerler göz önünde bulundurulduğunda, kontrol, sham ve GDM gruplarındaki deneklerde deney başlangıç ve gebeliklerinin 18. günündeki ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ağırlık artışı saptanmıştır (Kontrol  $p=0,26$ , Sham  $p=0,27$  ve GDM  $p=0,27$ ). Sonuçlar SPSS 20,0 paket programında Wilcoxon Sıra Sayıları İşaretler Testi kullanılarak değerlendirildi (Tablo 6).

**Tablo 6.** Deney Gruplarının p Değerleri

| GRUPLAR | p DEĞERLERİ |
|---------|-------------|
| KONTROL | p=0,26      |
| SHAM    | p=0,27      |
| GDM     | p=0,27      |

Daha sonra deneklerin gebeliklerinin 18. günündeki ağırlık değişimleri gruplar arasında karşılaştırıldı. Kontrol ve sham grupları GDM grupları ile karşılaştırıldığında gebeliğin 18. gününde, GDM gruplarındaki denekler diğer gruplara göre daha ağırdılar. Değerler göz önüne alındığında GDM grupları kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak daha ağırdılar (p=0.04). Ancak sham ve GDM grupları arasında ağırlık bakımından istatistiksel olarak fark bulunamamıştır (p=0.06). Sonuçlar SPSS 20,0 paket programında Mann Whitney U Testi kullanılarak değerlendirildi (Tablo 7).

**Tablo 7.** Deney Gruplarının p Değerleri

| GRUPLAR      | p DEĞERLERİ |
|--------------|-------------|
| KONTROL-SHAM | p=1         |
| KONTROL-GDM  | p=0,04      |
| SHAM-GDM     | p=0,006     |

#### 4.2 Annelerin Kan/Glukoz Seviyelerinin Değerlendirilmesi

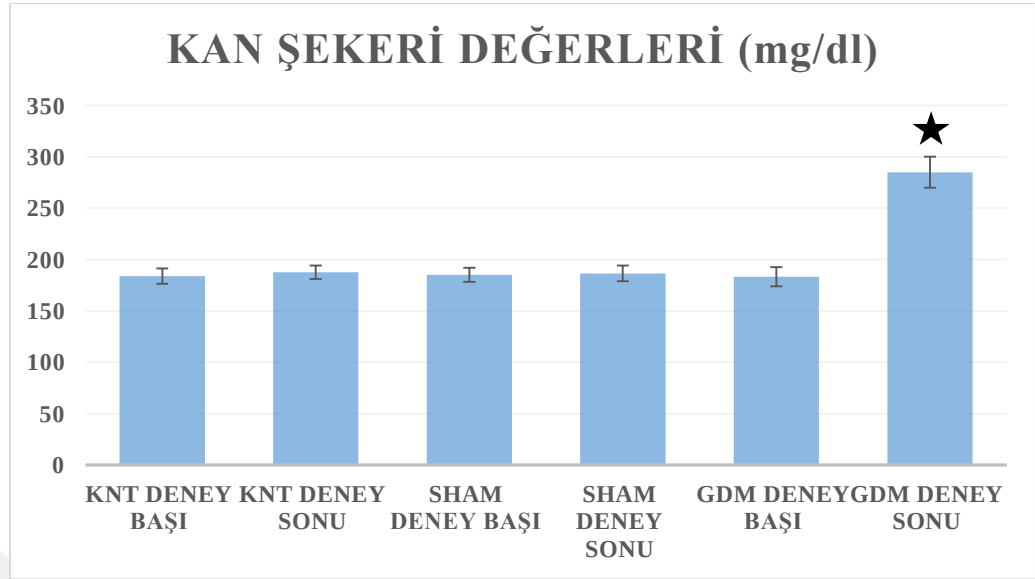
Deneyde kullanılan annelerin deney başlangıç kan/glukoz seviyeleri ortalamaları; kontrol grupları için  $184 \pm 7,48$  mg/dl, sham grupları için  $185,16 \pm 6,96$  mg/dl ve GDM grupları için  $183,16 \pm 9,36$  mg/dl olarak bulundu. Deney bitiş kan/glukoz seviyeleri ise; kontrol grupları için  $187,66 \pm 6,59$  mg/dl, sham grupları için

186,5±7,71 mg/dl ve GDM grupları için 285±15,15 mg/dl olarak bulundu (Grafik 2). Bu değerler göz önünde bulundurulduğunda kontrol ve sham gruplarındaki deneklerde deney başlangıç ve bitiş kan/glukoz seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmadı (p=0,292 ve p=0,893). GDM gruplarında deney başlangıç ve bitiş kan/glukoz seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı (p=0,028). Sonuçlar SPSS 20,0 paket programında Wilcoxon Sıra İşaretler Testi kullanılarak değerlendirildi (Tablo 8).

**Tablo 8.** Deney Gruplarının p Değerleri

| <b>GRUPLAR</b> | <b>p DEĞERLERİ</b> |
|----------------|--------------------|
| KONTROL        | p=0,292            |
| SHAM           | p=0,893            |
| GDM            | p=0,028            |

**Grafik 2.** Deney Gruplarında Annelere Ait Kan Şekeri Değerleri

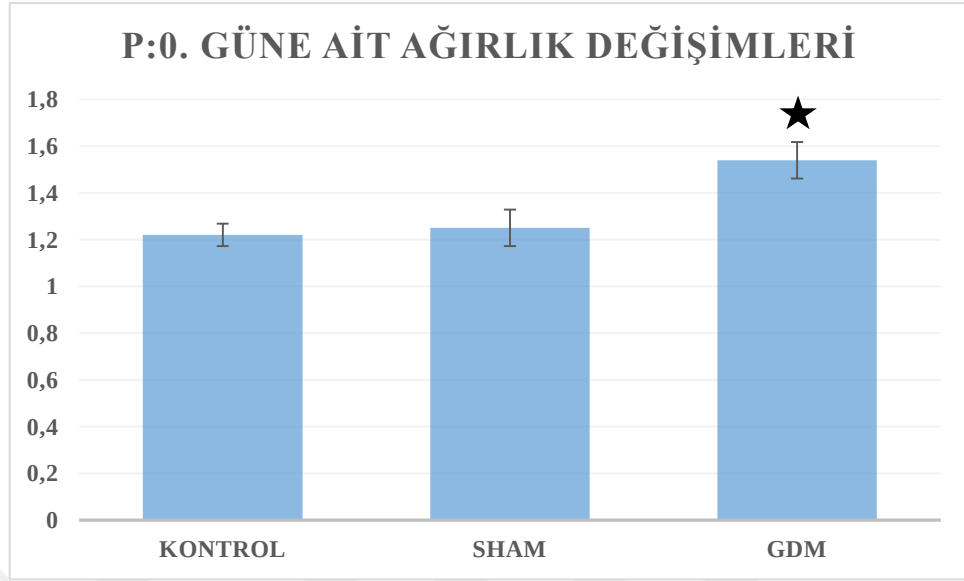


#### 4.3 Yavruların Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deneyde elde edilen P:0, P:7 ve P:21 günlük yavruların ağırlıkları karşılaştırıldı.

P:0 grubunda ağırlıklar ortalama kontrol grubunda 1,22 gr, sham grubunda 1,25 gr, GDM grubunda 1,54 gr olarak bulundu (Grafik 3). P0. günde gruplar arasında ağırlık değişimleri karşılaştırıldığında kontrol ve sham grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunmazken, GDM grubundaki yavruların ağırlık artışı kontrol ve sham grupları ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla  $p=0,01$  ve  $p=0,02$ ) (Tablo 9). Sonuçlar SPSS 20,0 paket programında Mann Whitney U Testi kullanılarak değerlendirildi.

**Grafik 3. P:0 Günlük Yavruların Ağırlık Değerleri**

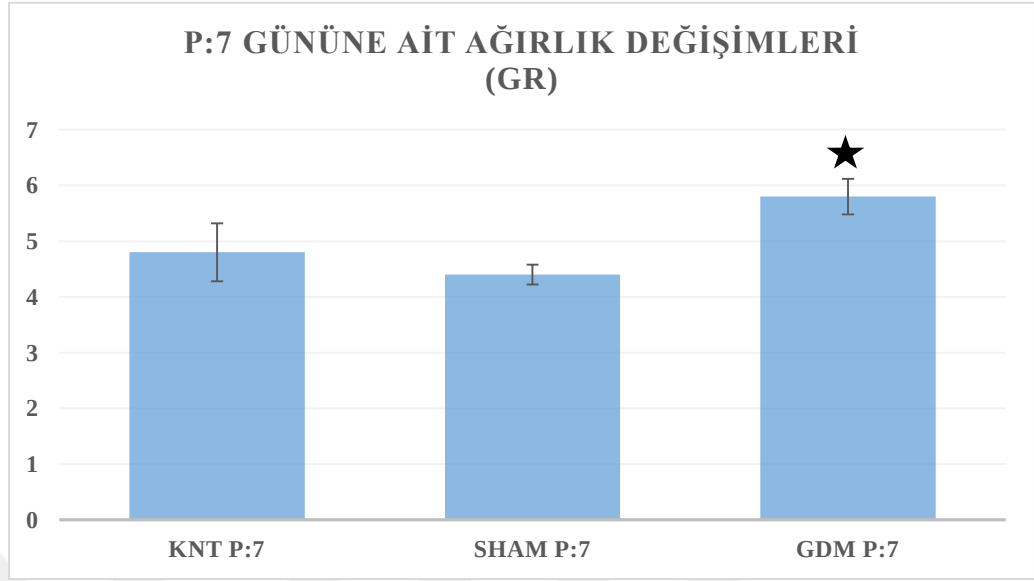


**Tablo 9. Gruplarda p Değerleri**

| GRUPLAR          | p DEĞERLERİ |
|------------------|-------------|
| KNT P:0-SHAM P:0 | p=0,496     |
| KNT P:0-GDM P:0  | p=0,001     |
| SHAM P:0-GDM P:0 | p=0,002     |

P:7 grubunda ağırlıklar ortalama kontrol grubunda 4,8 gr, sham grubunda 5,11 gr, GDM grubunda 5,8 gr olarak bulundu (Grafik 4). P7. günde gruplar arasında ağırlık değişimleri karşılaştırıldığında kontrol ve sham grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunmazken, GDM grubundaki yavruların ağırlık artışı kontrol ve sham grupları ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla p=0,03 ve p=0,02) (Tablo 10). Sonuçlar SPSS 20,0 paket programında Mann Whitney U Testi kullanılarak değerlendirildi.

**Grafik 4. P:7 Günlük Yavruların Ağırlık Değerleri**

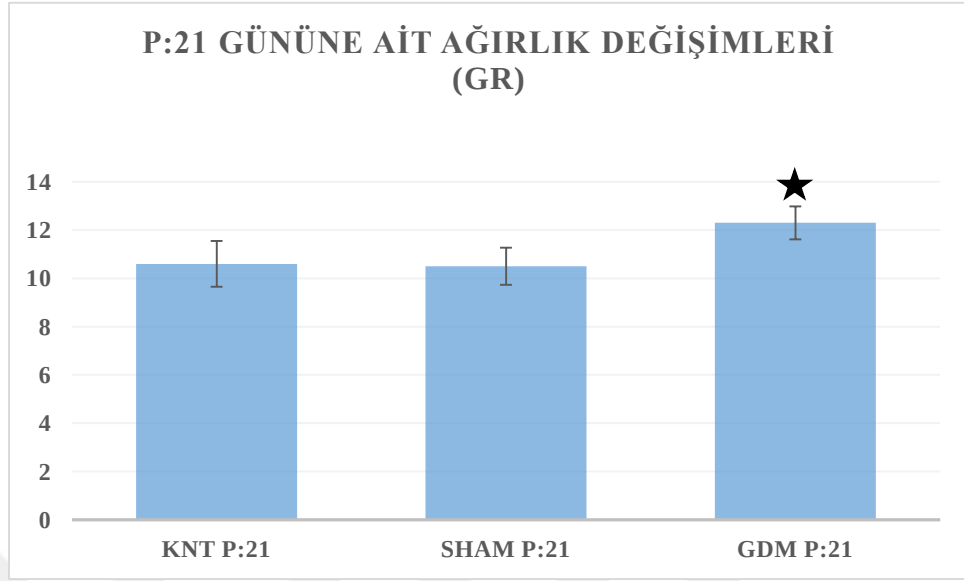


**Tablo 10. Gruplarda p Değerleri**

| GRUPLAR          | p DEĞERLERİ |
|------------------|-------------|
| KNT P:7-SHAM P:7 | p=0,266     |
| KNT P:7-GDM P:7  | p=0,003     |
| SHAM P:7-GDM P:7 | p=0,002     |

P:21 grubunda ağırlıklar ortalama kontrol grubunda 10,62 gr, sham grubunda 10,5 gr, GDM grubunda 12,34 gr olarak bulundu (Grafik 5). P21. günde gruplar arasında ağırlık değişimleri karşılaştırıldığında kontrol ve sham grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunmazken, GDM grubundaki yavruların ağırlık artışı kontrol ve sham grupları ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla p=0,05 ve p=0,04) (Tablo 11). Sonuçlar SPSS 20,0 paket programında Mann Whitney U Testi kullanılarak değerlendirildi.

**Grafik 5. P:21 Günlük Yavruların Ağırlık Değerleri**



**Tablo 11. Gruplarda p Değerleri**

| GRUPLAR              | p DEĞERLERİ |
|----------------------|-------------|
| KNT P:21-SHAM P: 21  | p=0,847     |
| KNT P: 21-GDM P: 21  | p=0,004     |
| SHAM P: 21-GDM P: 21 | p=0,002     |

#### 4.4 Yavruların Kan/Glukoz Seviyelerinin Değerlendirilmesi

Deneyde kontrol, sham ve GDM gruplarından elde edilen P0, P7 ve P21 günlük yavruların kan/glukoz değerleri karşılaştırıldı.

P0 grubunda kan/glukoz seviyeleri ortalamaları; kontrol P:0 grubunda 109,28 mg/dl, P0 sham grubunda 111,28 mg/dl, P0 GDM grubunda 284,71 mg/dl olarak bulundu. P7 grubunda kan/glukoz seviyeleri ortalamaları; kontrol P7 grubunda 108,71 mg/dl, P7 sham grubunda 111,42 mg/dl, P:7 GDM grubunda 188,71 mg/dl olarak bulundu. P21 grubunda kan/glukoz seviyeleri ortalamaları; kontrol P21 grubunda 105,42 mg/dl, P21 sham grubunda 111,42 mg/dl, P:21 GDM grubunda 112,14 mg/dl olarak bulundu (Grafik 6).

Bu değerler göz önüne alındığında;

P0 grubuna ait kontrol ve sham grupları karşılaştırıldığında kan/glukoz değerleri bakımından aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p=0,796$ ). Ancak kontrol P0 ve sham P0 grupları, GDM P0 grubu ile kan/glukoz değerleri bakımından karşılaştırıldığında, GDM P0 grubuna ait deneklerinin kontrol P0 ve sham P0 grubuna ait deneklerine göre kan/glukoz değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artışı görülmüştür (sırasıyla  $p=0,02$  ve  $p=0,02$ ).

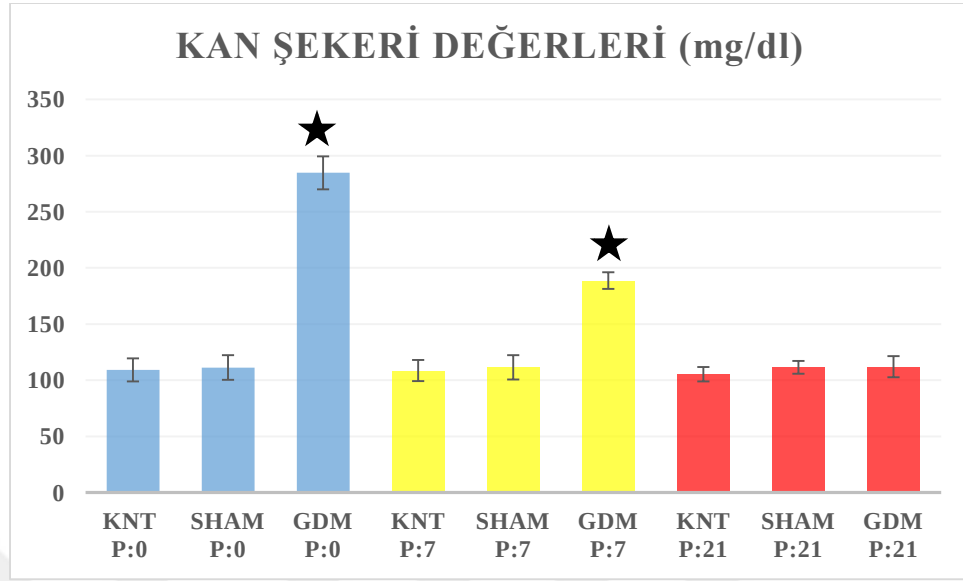
P7 grubuna ait kontrol ve sham grupları karşılaştırıldığında kan/glukoz değerleri bakımından aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p=0,847$ ). Ancak kontrol P7 ve sham P7 grupları, GDM P7 grubu ile kan/glukoz değerleri bakımından karşılaştırıldığında, GDM P7 grubuna ait deneklerinin kontrol P7 ve sham P7 grubuna ait deneklerine göre kan/glukoz değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artışı görülmüştür (sırasıyla  $p=0,02$  ve  $p=0,02$ ).

P21 grubuna ait kontrol, sham ve GDM grupları karşılaştırıldığında kan/glukoz değerleri bakımından aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p=0,171$ ,  $p=0,798$ ). Sonuçlar SPSS 20,0 paket programında Mann Whitney U Testi kullanılarak değerlendirildi (Tablo 12).

**Tablo 12.** Deney gruplarının p Değerleri

| GRUPLAR           | p DEĞERLERİ |
|-------------------|-------------|
| KNT P:0-GDM P:0   | $p=0,02$    |
| SHAM P:0-GDM P:0  | $p=0,02$    |
| KNT P:7-GDM P:7   | $p=0,02$    |
| SHAM P:7-GDM P:7  | $p=0,02$    |
| KNT P:21-GDM P:21 | $p=0,171$   |
| SHAMP:21-GDM P:21 | $p=0,798$   |

**Grafik 6.** Yavrulara Ait Kan Şekeri Değerleri



#### 4.5. Canlı Doğum Sayılarının Değerlendirilmesi

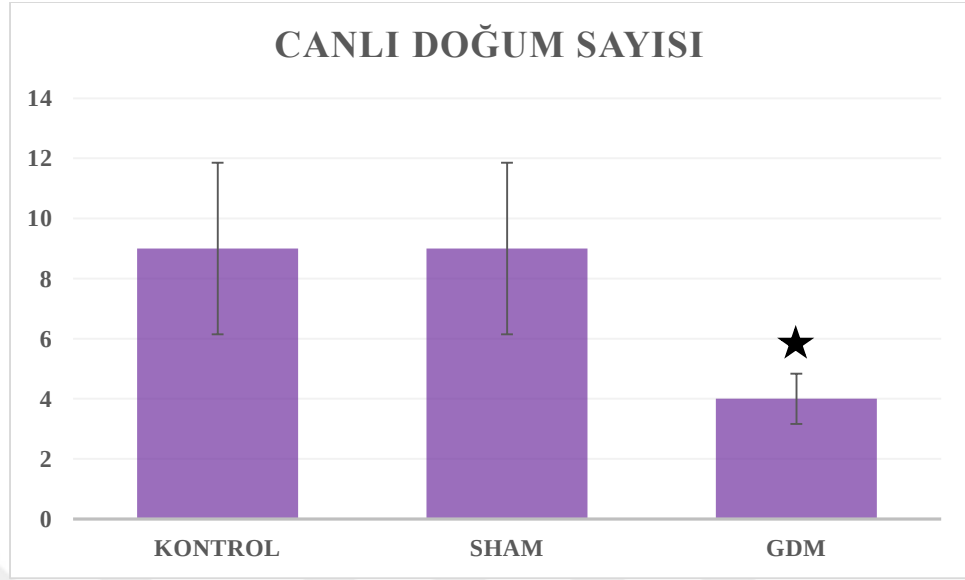
Deneyde kontrol, sham ve GDM gruplarından elde edilen canlı doğum sayıları karşılaştırıldı. Kontrol grubunda bir batında canlı doğum sayısı ortalama 9, sham grubunda bir batında canlı doğum sayısı ortalama 9 ve GDM grubunda bir batında canlı doğum sayısı ortalama 4 yavrudur (Grafik 7).

Bu değerler göz önüne alındığında, bir batındaki canlı doğum sayısı karşılaştırıldığında kontrol ve sham grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken ( $p=1$ ), GDM gruplarından elde edilen bir batındaki canlı doğum sayısı kontrol ve sham grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak sayıca anlamlı azalma gözlenmiştir (sırasıyla  $p=0.04$  ve  $p=0,04$ ) (Tablo 13).

**Tablo 13.** Deney gruplarının p Değerleri

| GRUPLAR  | p DEĞERLERİ |
|----------|-------------|
| KNT-GDM  | $p=0.04$    |
| SHAM-GDM | $p=0,04$    |

**Grafik 7.** Deney Gruplarına Ait Canlı Doğum Sayıları



#### **4.6 Histokimyasal Bulgular**

##### **4.6.1 Hematoksilen-Eosin Boyama Değerlendirmesi**

Çalışmamızda Kontrol, Sham ve GDM gruplarının beyin dokusunun korteks alanına ait histolojik genel özelliklerini değerlendirmek için HE boyama yöntemi uygulandı. Aynı bölgedeki sağlam nöronları değerlendirmek için de KV ile boyama yapıldı.

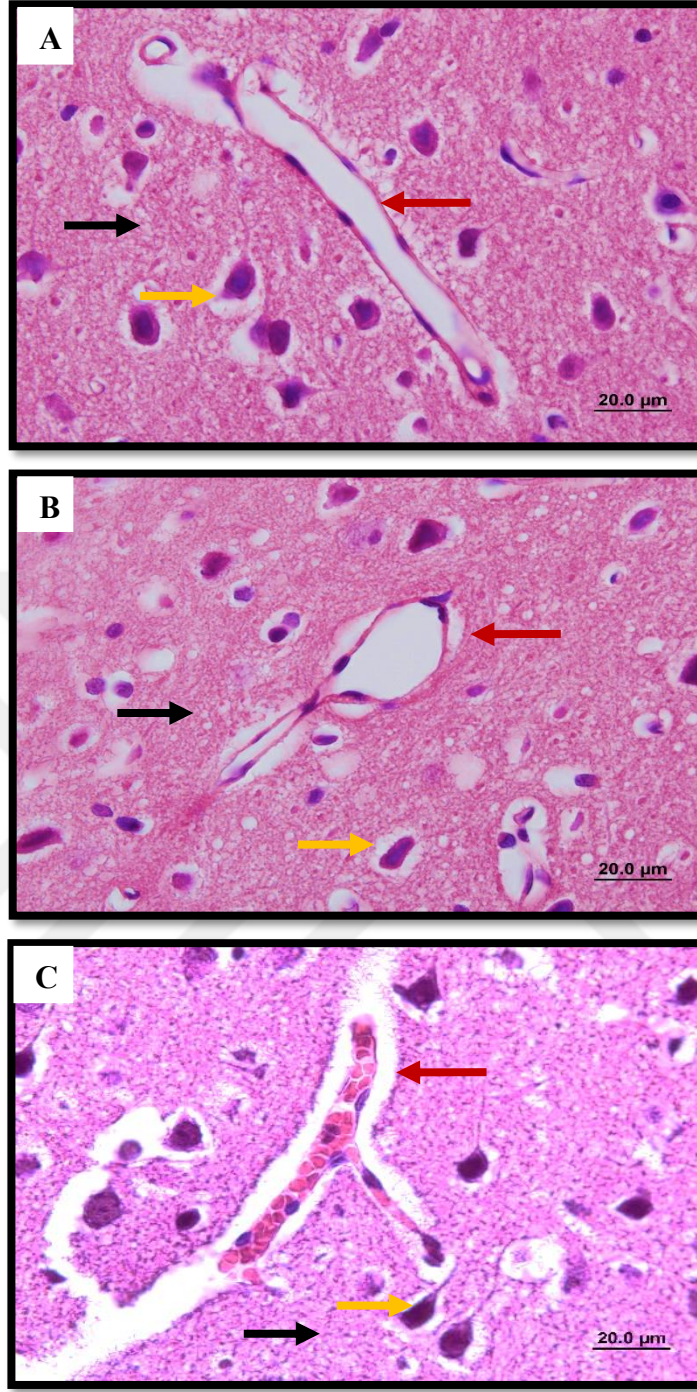
Kontrol gruplarına ait P0, P7 ve P21 gruplarının beyin korteks alanı histolojik olarak olağan görünümlü nöronlar ve nöroglia hücreleri gözlemlendi. Pia mater, subpial aralık, araknoid membran ve intraserebral alanlarda kapiller damar dağılımı normaldi. Bu alanlarda olağan dışı hücreyel infiltrasyona rastlanmadı. Sham gruplarına ait bulgular kontrol gruplarına benzerlik göstermekteydi.

GDM’li annelerden elde edilen P0 günlük deneklerin beyin dokuları küçük büyütmelemlerde incelendiğinde, pia mater, subpial aralık, araknoid membran ve bu bölgelerdeki damarsal yapılar ile nöronal yapıların yine olağan görünümünde olduğu izlendi. Büyük büyütmelemlerde nöron, çekirdek ve çekirdekçiğin mikro yapısında patolojik bir bulguya rastlanmadı. Glial yapı olağandı ve nöropil de genel görünümü desteklemekteydi. İntraserebral alanlardaki kapiller yapı, son derece sınırlı/az olarak

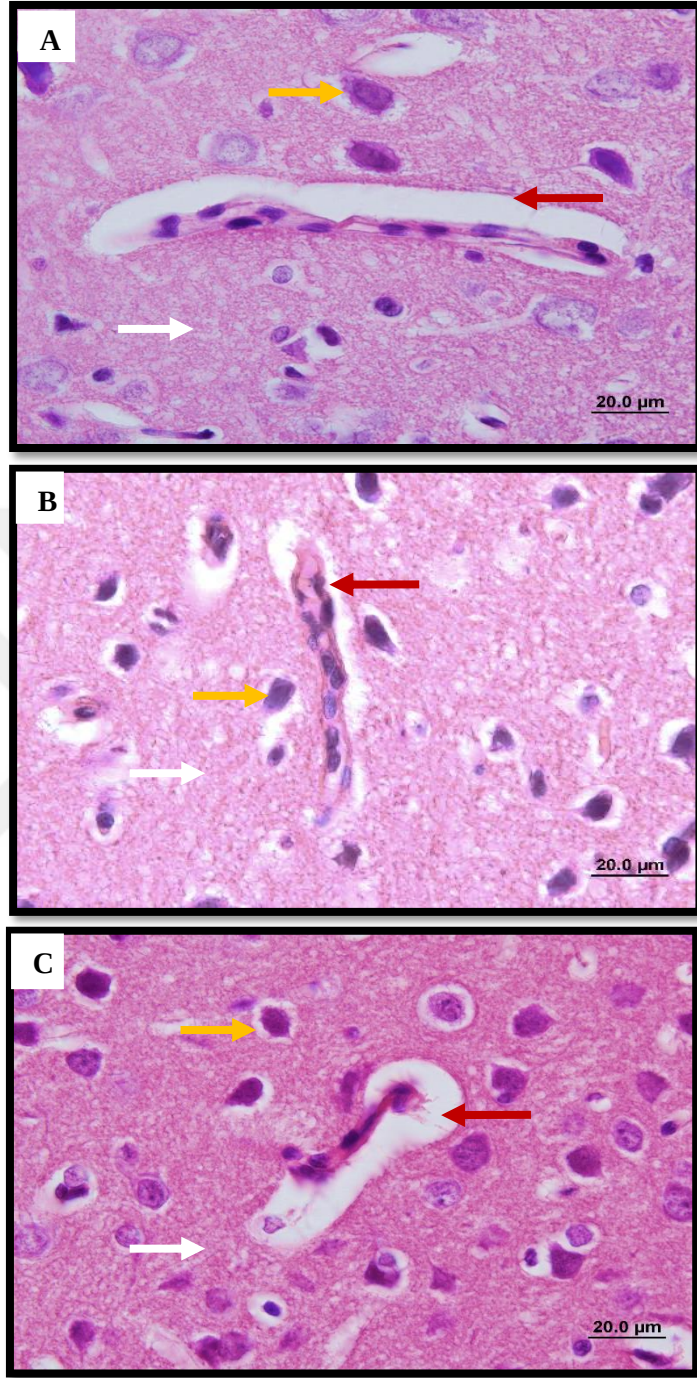
gözlendi. İntraserebral kortikal alanlarda kapiller dağılımı ve çevresindeki ilişki açısından da bir anormallik gözlenmedi.

GDM'li annelerden elde edilen P7 günlük deneklerin beyin dokuları histomorfolojik açıdan değerlendirildiğinde P0 günlük deneklere benzer bulgulara rastlanmıştır. Pia mater, araknoid membran ve subpial aralık normal histomorfoloji göstermekte ve nöron, nöroglial yapılar ve intraserebral kortikal alanlardaki kapiller yapısında patolojik bir bulguya rastlanmadı.

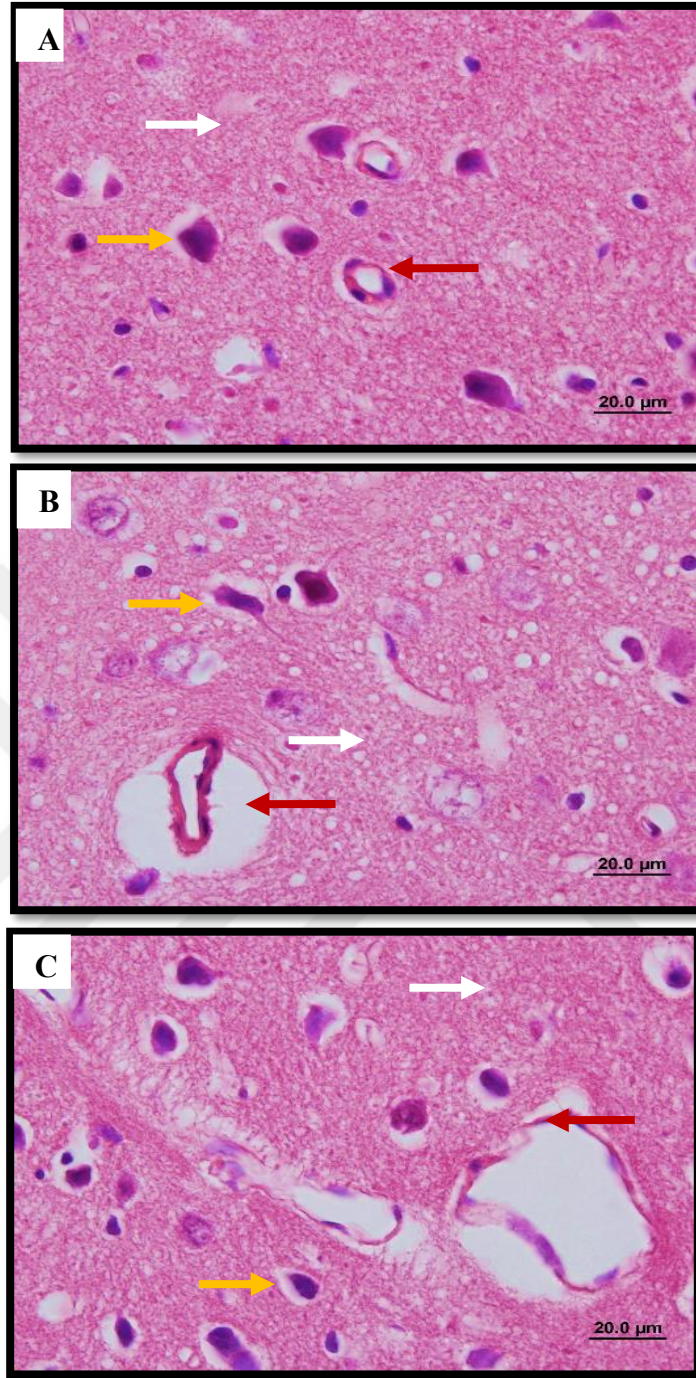
GDM'li annelerden elde edilen P21 günlük deneklerin beyin dokuları değerlendirildiğinde, küçük büyütmelelerde pia mater, subpial aralık, araknoid membran ve çevresel damar yapısı olağan olarak gözlendi. P0 ve P7 gruplarındaki deneklerle karşılaştırıldığında glial hücreler belirgin ve özellikle kortikal piramidal nöronların daha matürdü. İntrakortikal kapiller ağ ise diğer gruplara göre oldukça artmış olarak gözlendi (Şekil 12, 13 ve 14).



**Şekil 12.** Kontrol P0 (A), P7 (B)ve P21 (C) gruplarına ait HE boyaması. 1000X büyütme (Bar 20 µm). Beyin kapilleri (kırmızı ok), nöronlar (sarı ok) ve nöropil (siyah ok).



**Şekil 13.** Sham P0 (A), P7 (B)ve P21 (C) gruplarına ait HE boyaması. 1000X büyütme (Bar 20 µm). Beyin kapilleri (kırmızı ok), nöronlar (sarı ok) ve nöropil (beyaz ok).



**Şekil 14.** GDM P0 (A), P7 (B)ve P21 (C) gruplarına ait HE boyaması. 1000X büyütme (Bar 20 µm). Beyin kapilleri (kırmızı ok), nöronlar (sarı ok) ve nöropil (beyaz ok).

#### ***4.6.2 Krezil Viyole Boyama Değerlendirmesi***

GDM'li annelerden elde edilen P0 günlük deneklerin beyin dokuları küçük büyütmede incelendiğinde kortikal yüzeyel nöronlar birbirine çok yakın ve bu hücrelere yakın komşulukta yoğun glial hücre yerleşimi gözlemlendi.

GDM'li annelerden elde edilen P7 günlük deneklerin beyin dokuları incelendiğinde, korteksin derin tabakalarında matürasyonunu tamamlamaya çalışan nöronlar ve glial hücreler izlendi. İntraserebral kapiller yoğunluğu görece olarak az gözlemlendi.

GDM'li annelerden elde edilen P21 günlük deneklerin beyin dokuları incelendiğinde, nöronlar ve glial hücrelerin mikroyapıları KV boyası, HE boyası bulgularını destekler nitelikteydi (Şekil 15,16 ve 17).

##### ***4.6.2.1. Beyin Prefrontal Korteks Bölgesinde Nöron Sayımı***

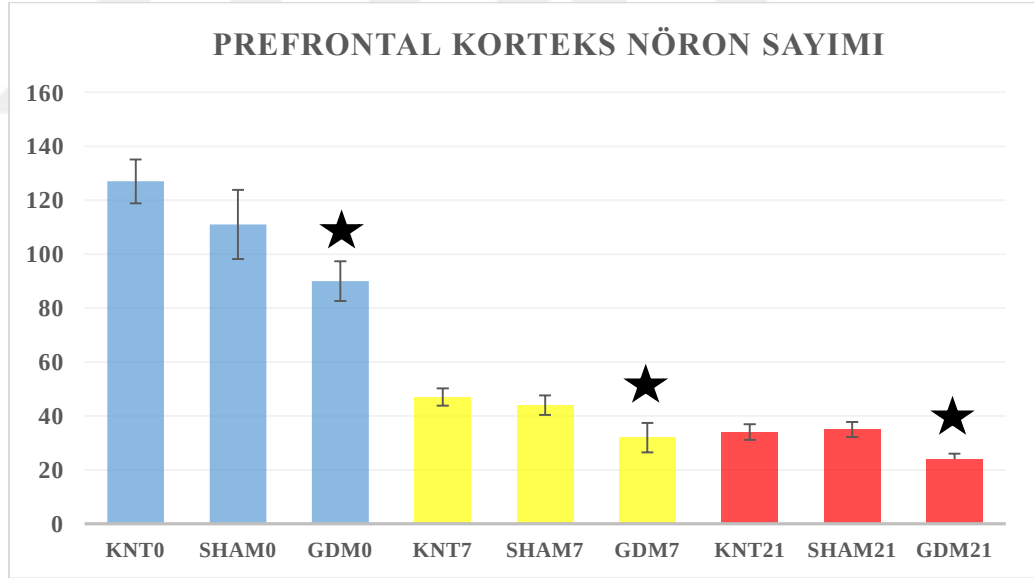
Deneklerin beyin prefrontal kortekslerinden alınan 5 µm'lik seri kesitler stoklandı. Aynı hücreleri saymamak için dört kesit atlanarak yaklaşık 20 µm derinleşerek farklı bir seviyeye ulaşıldı. 1., 5., 9. ve 13. kesitler ve her kesit için rastgele farklı 5'er alan olacak şekilde toplamda 15'er farklı alandan MSS hücre sayımı yapıldı. Tarafsız bir sonuç elde edebilmek için sayımlar kör yöntemle ImageJ yazılımı kullanılarak manuel olarak ölçüldü. Elde edilen hücre sayımlarının her bir denek için ortalaması alındı ve istatistiksel olarak değerlendirildi.

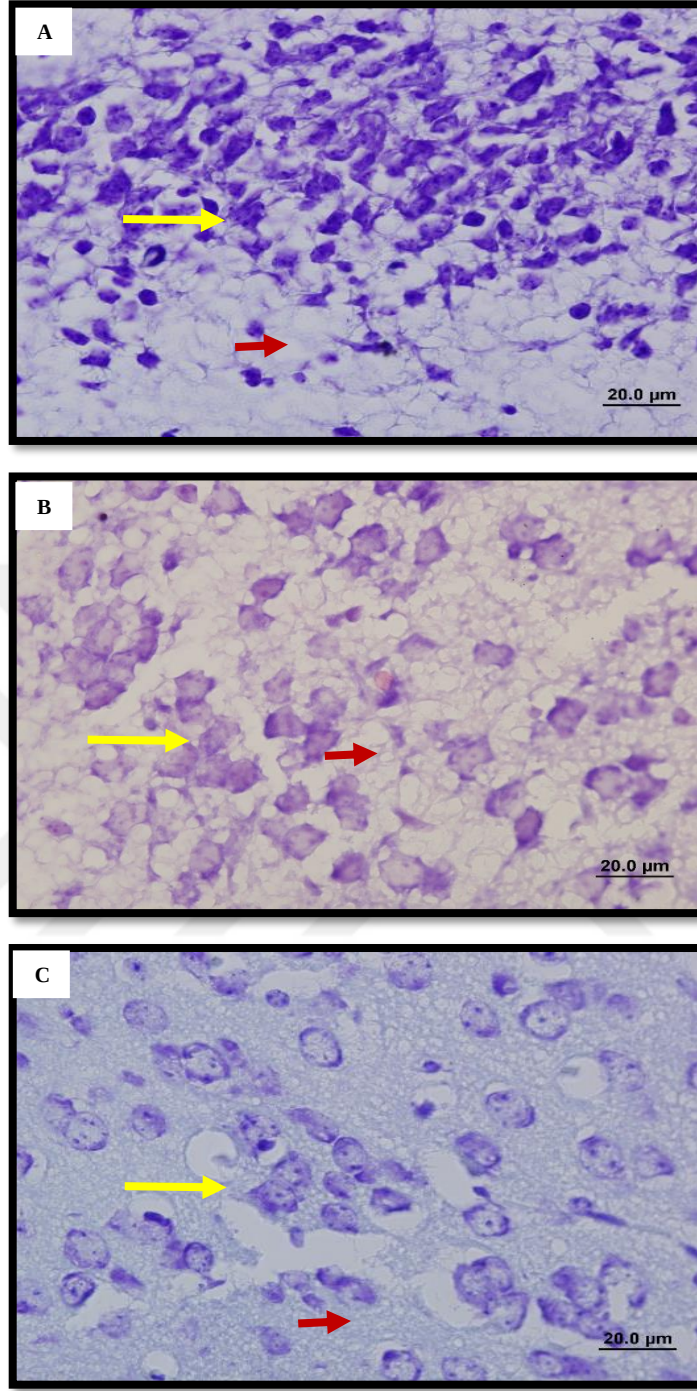
Nöron hücresi sayımı sonucunda Kontrol, Sham ve GDM grupları karşılaştırıldığında; P0, P7 ve P21 günlük deneklerde Kontrol ve Sham grupları arasında farklılık gözlenmezken, Kontrol ve Sham grupları GDM grupları ile karşılaştırıldığında GDM gruplarında hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu görüldü (Grafik 8) (Tablo 14).

**Tablo 14.** Deney gruplarının p Değerleri

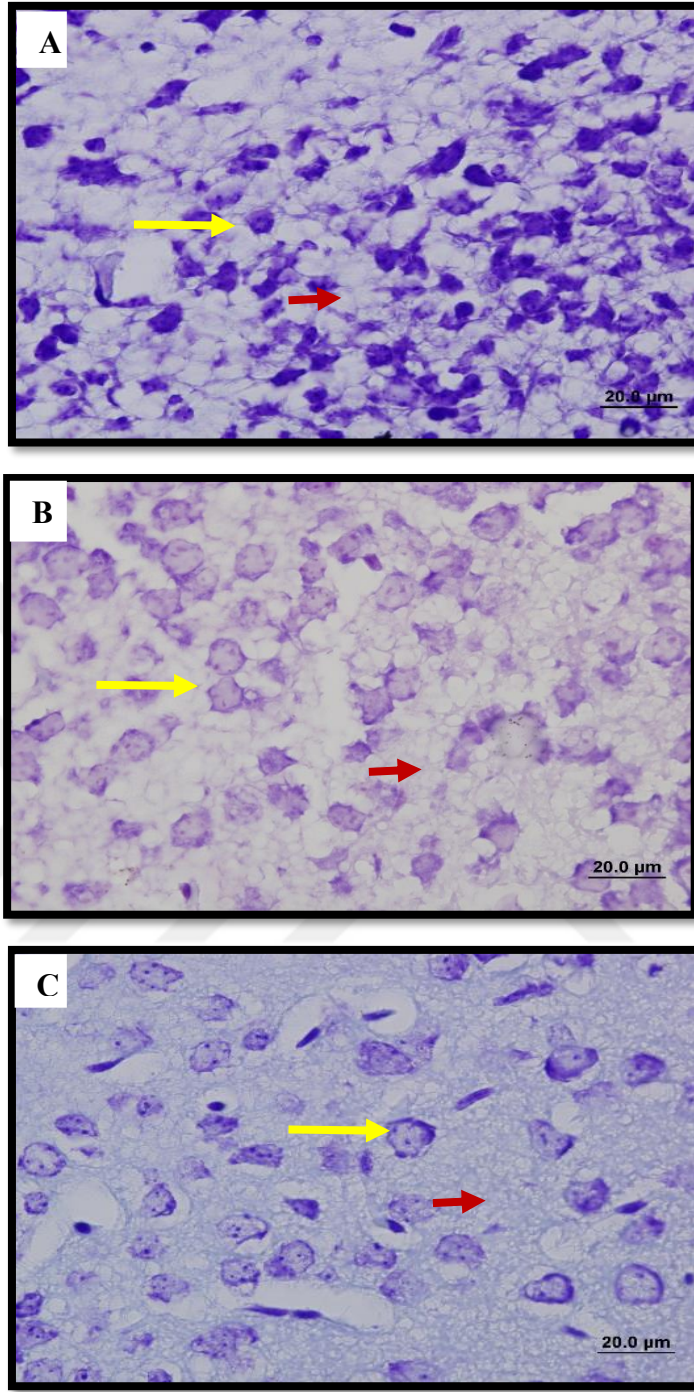
| GRUPLAR           | p DEĞERLERİ |
|-------------------|-------------|
| KNT P:0-GDM P:0   | p=0,02      |
| SHAM P:0-GDM P:0  | p=0,03      |
| KNT P:7-GDM P:7   | p=0,02      |
| SHAM P:7-GDM P:7  | p=0,04      |
| KNT P:21-GDM P:21 | p=0,002     |
| SHAMP:21-GDM P:21 | p=0,002     |

**Grafik 8.** Deney Gruplarına Ait Prefrontal Korteks Hücre Sayımı

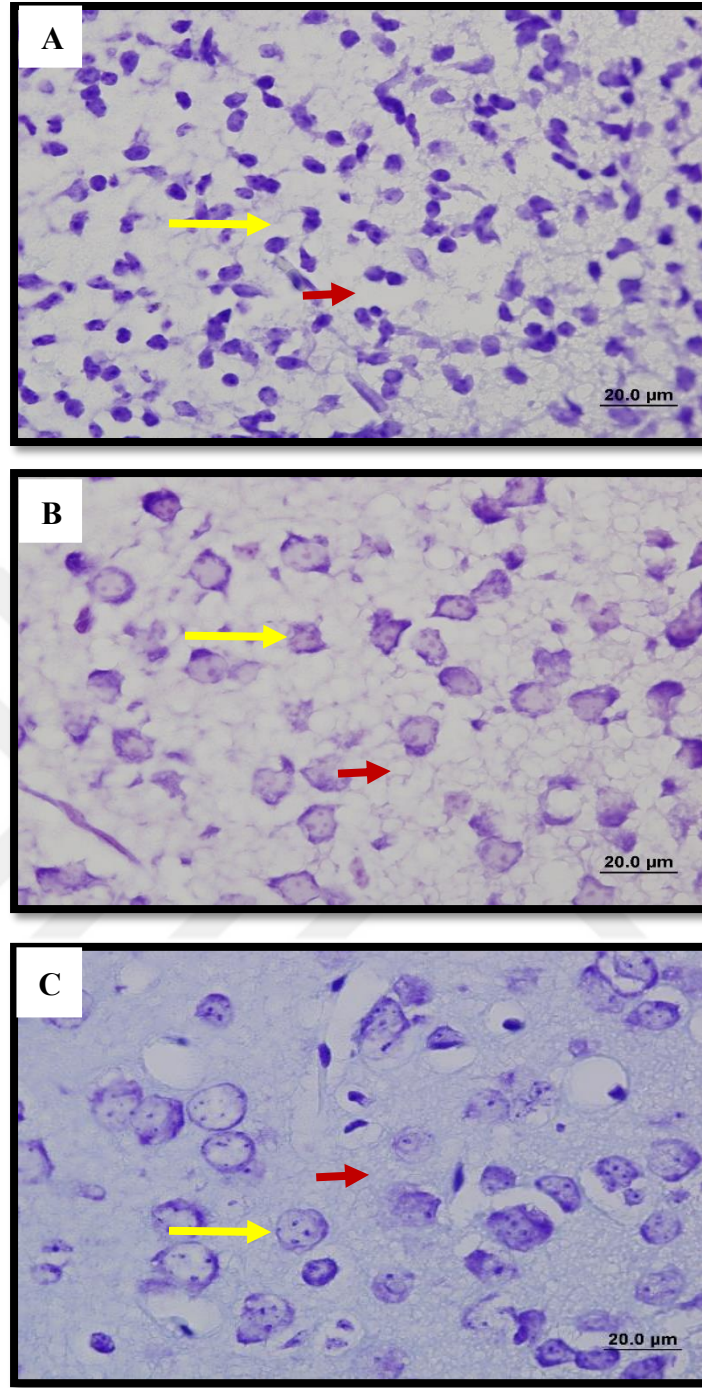




**Şekil 15.** Kontrol P0 (A), P7 (B)ve P21 (C) gruplarına ait KV boyaması. 1000X büyütme (Bar 20 µm). Nöronlar (sarı ok) ve nöropil (kırmızı ok).



**Şekil 16.** Sham P0 (A), P7 (B)ve P21 (C) gruplarına ait KV boyaması. 1000X büyütme (Bar 20 µm). Nöronlar (sarı ok) ve nöropil (kırmızı ok).



**Şekil 17.** GDM P0 (A), P7 (B) ve P21 (C) gruplarına ait KV boyaması. 1000X büyütme (Bar 20  $\mu\text{m}$ ). Nöronlar (sarı ok) ve nöropil (kırmızı ok).

## 4.7 İmmünohistokimyasal Bulgular

### 4.7.1 Anti Klaudin 5 ve Anti VE Kaderin 5 İmmünohistokimya Boyama Değerlendirmesi

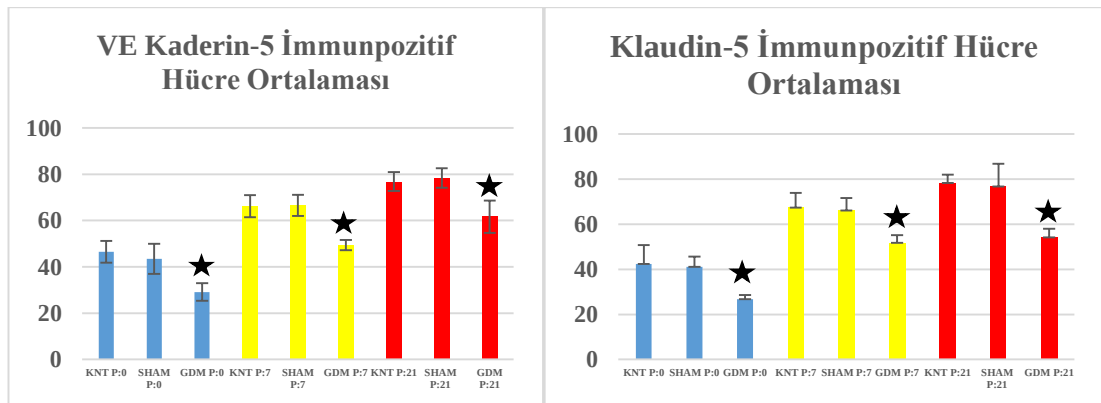
Beyin endotel hücreleri arasında sıkı bağlantı bütünlüğünü incelemek için anti-klaudin 5 ve anti-VE kaderin 5 immünohistokimya boyamaları yapıldı.

GDM'li annelerden elde edilen P0, P7 ve P21 günlük deneklerin beyin dokusundaki immün reaktivite karşılaştırıldığında P0 grubunda beyin çevresi damar yapılarında endotele özgü immün (+) boyama gözlenirken, intraserebral kapillerlerde immün reaktivite göreceli olarak azdı. P7 grubunda beyin yüzeyel kapiller damar endoteli immün pozitif olarak gözlemlendi. Seyrek olarak gözlenmeye başlayan intrakortikal kapiller yapılarda birkaç yerde şüpheli immün pozitif boyanma izlendi. P21 grubu P0 ve P:7 grupları ile karşılaştırıldığında, kitlesel büyümeye eşlik eden vaskülarizasyon artışının doğal sonucu olarak çevresel damarlardaki immün pozitiflik artmıştı. Hemisferler arası sulkus düzeyinde damar endoteli belirgin immün pozitifliği. İntrakortikal küçük kapillerlerde bu (+) bulguya eşlik etmekteydi (Şekil 18, 19, 20, 21, 22 ve 23).

Her gruptaki deneklerden 5 µm'lik seri kesitler alındı ve farklı damarlarda toplamda 100 hücre sayılarak immünpozitif hücre değerlendirildi. Her bir grup için sayısal değerler elde edildi ve istatistiksel olarak değerlendirildi.

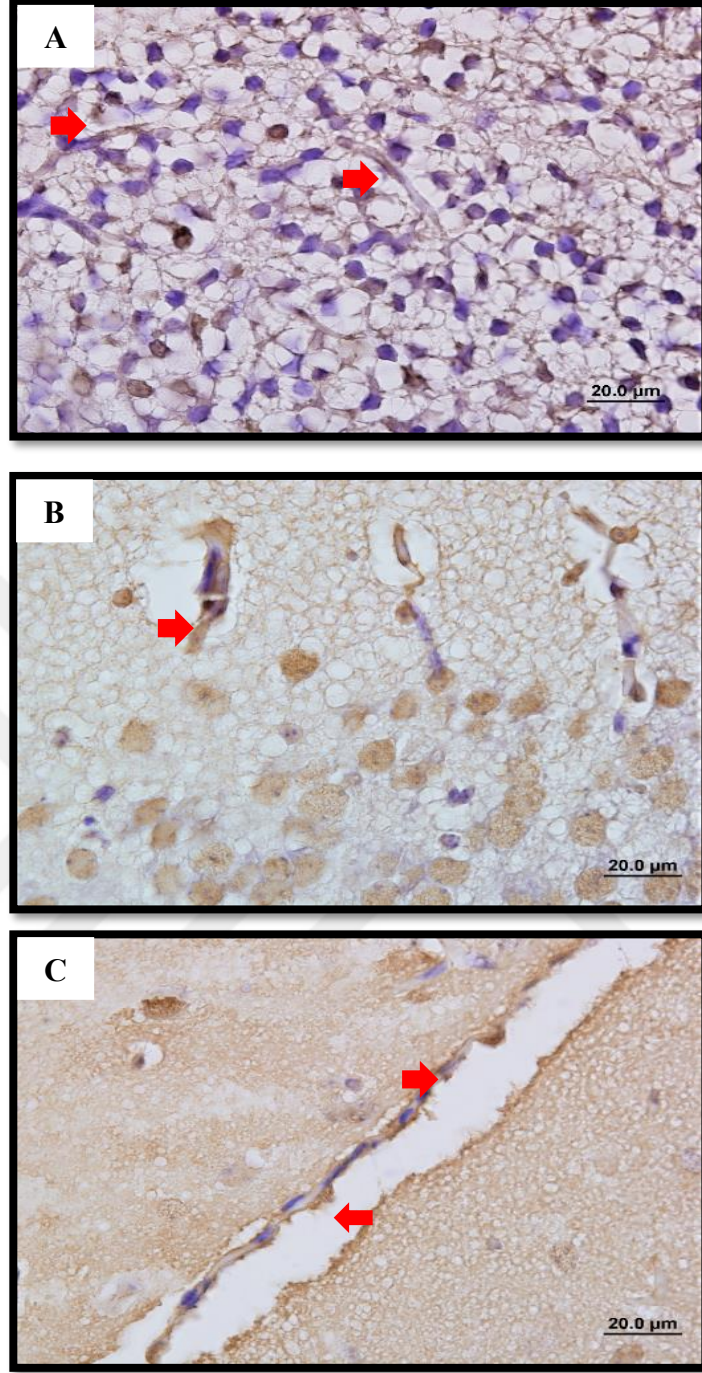
Değerler gözönüne alındığında, GDM P0, P7 ve P21 günlük denekler, Kontrol ve Sham gruplarındakiler ile karşılaştırıldığında GDM gruplarında immünpozitif hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi (Grafik 9) (Tablo 15).

**Grafik 9.** Deney Gruplarına Ait VE-Kaderin 5 ve Klaudin-5 İmmünreaktivitesi

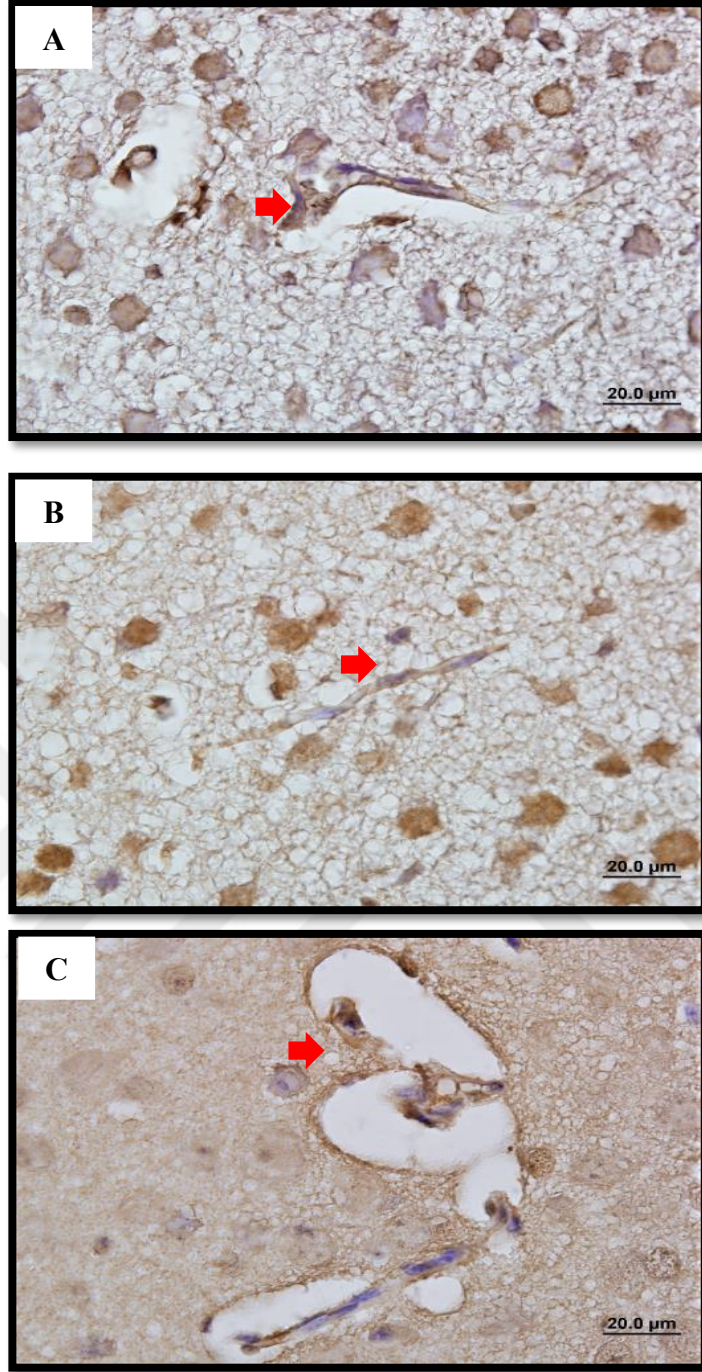


**Tablo 15.** Deney Gruplarının p Değerleri

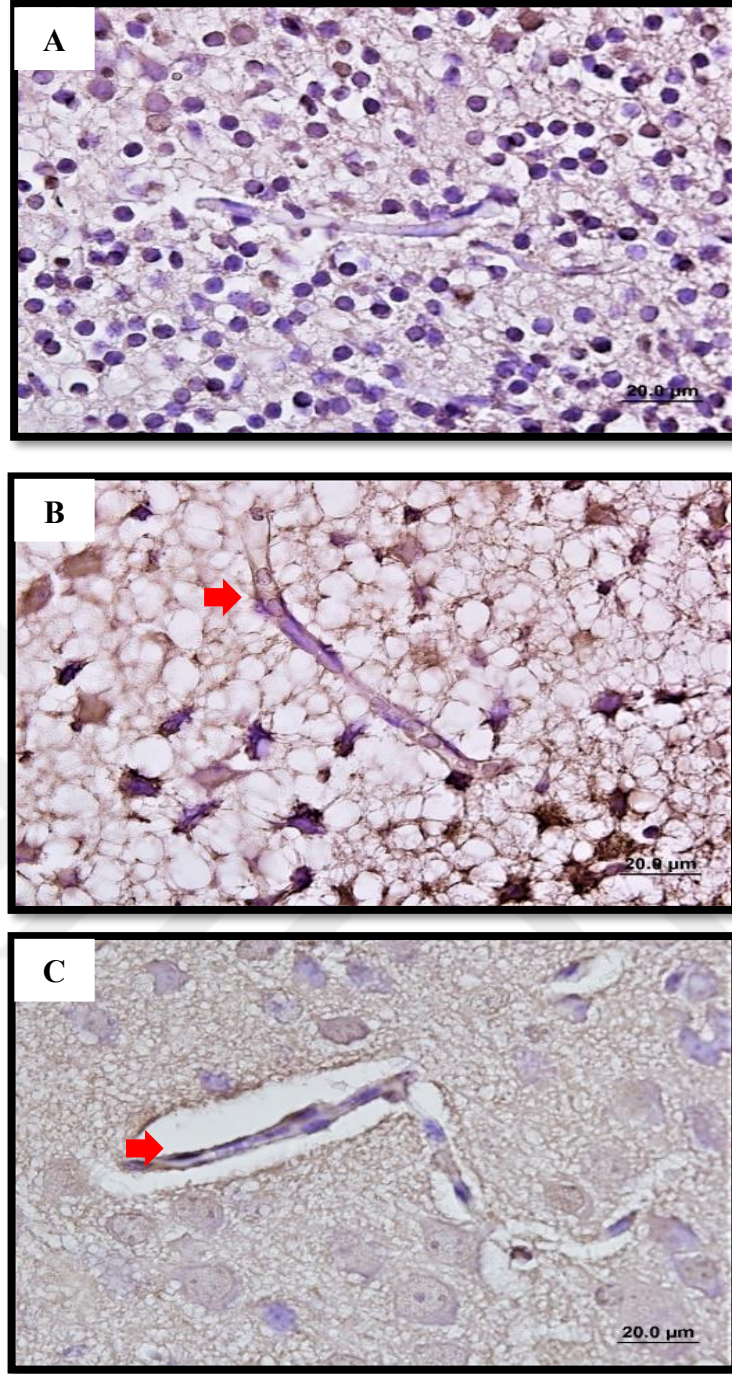
| <b>GRUPLAR</b>    | <b>VE-Kaderin-5<br/>p DEĞERLERİ</b> | <b>Caludin-5 p DEĞERLERİ</b> |
|-------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| KNT P:0-GDM P:0   | p=0,002                             | p=0,006                      |
| SHAM P:0-GDM P:0  | p=0,003                             | p=0,004                      |
| KNT P:7-GDM P:7   | p=0,002                             | p=0,013                      |
| SHAM P:7-GDM P:7  | p=0,002                             | p=0,015                      |
| KNT P:21-GDM P:21 | p=0,002                             | p=0,002                      |
| SHAMP:21-GDM P:21 | p=0,002                             | p=0,002                      |



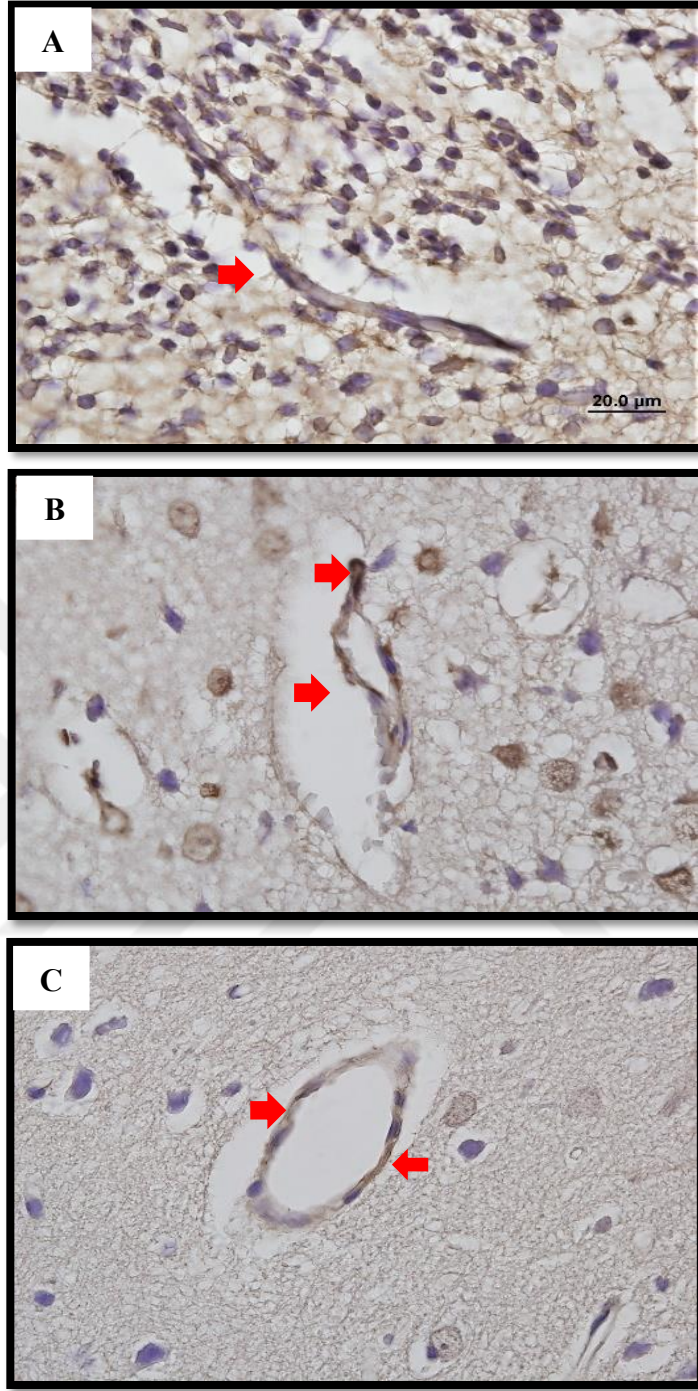
**Şekil 18.** Kontrol P0 (A), P7 (B)ve P21 (C) gruplarına ait Klaudin 5 boyaması. 1000X büyütme (Bar 20 µm). İmmun pozitif hücreler (kırmızı ok).



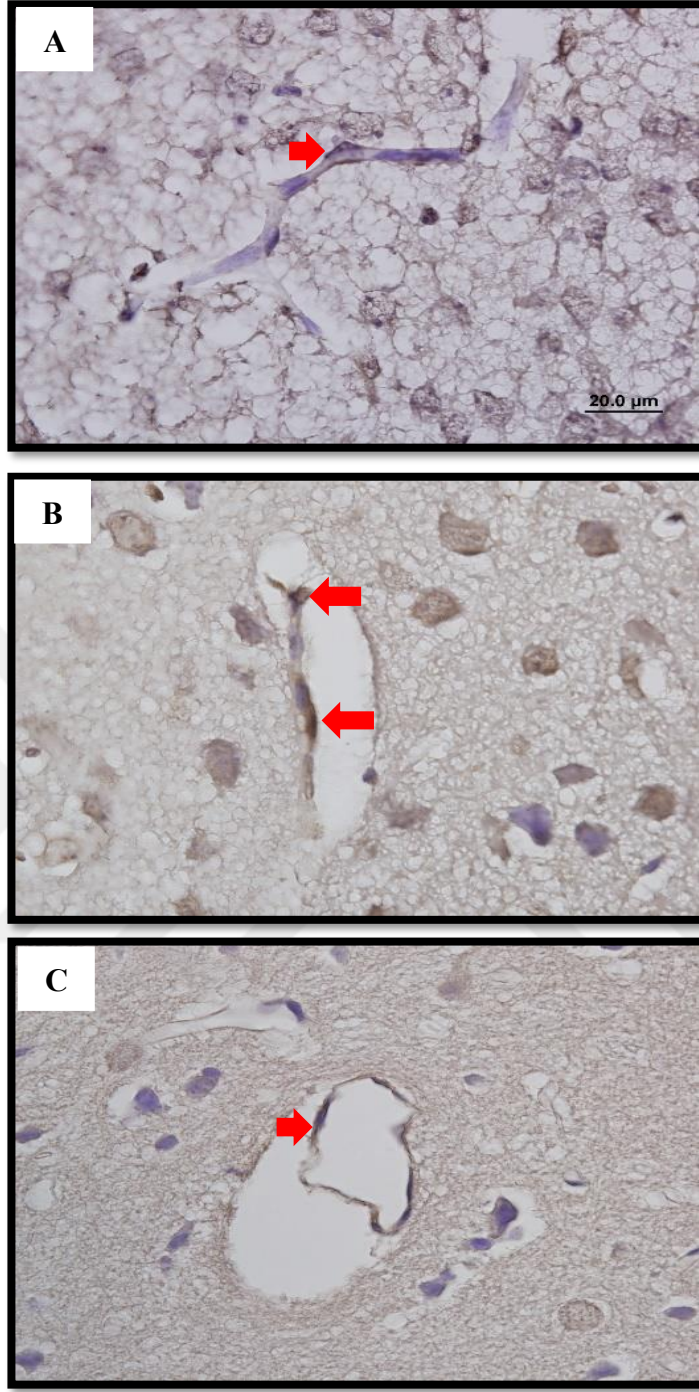
**Şekil 19.** Sham P0 (A), P7 (B)ve P21 (C) gruplarına ait Klaudin 5 boyaması. 1000X büyütme (Bar 20 µm). İmmun pozitif hücreler (kırmızı ok).



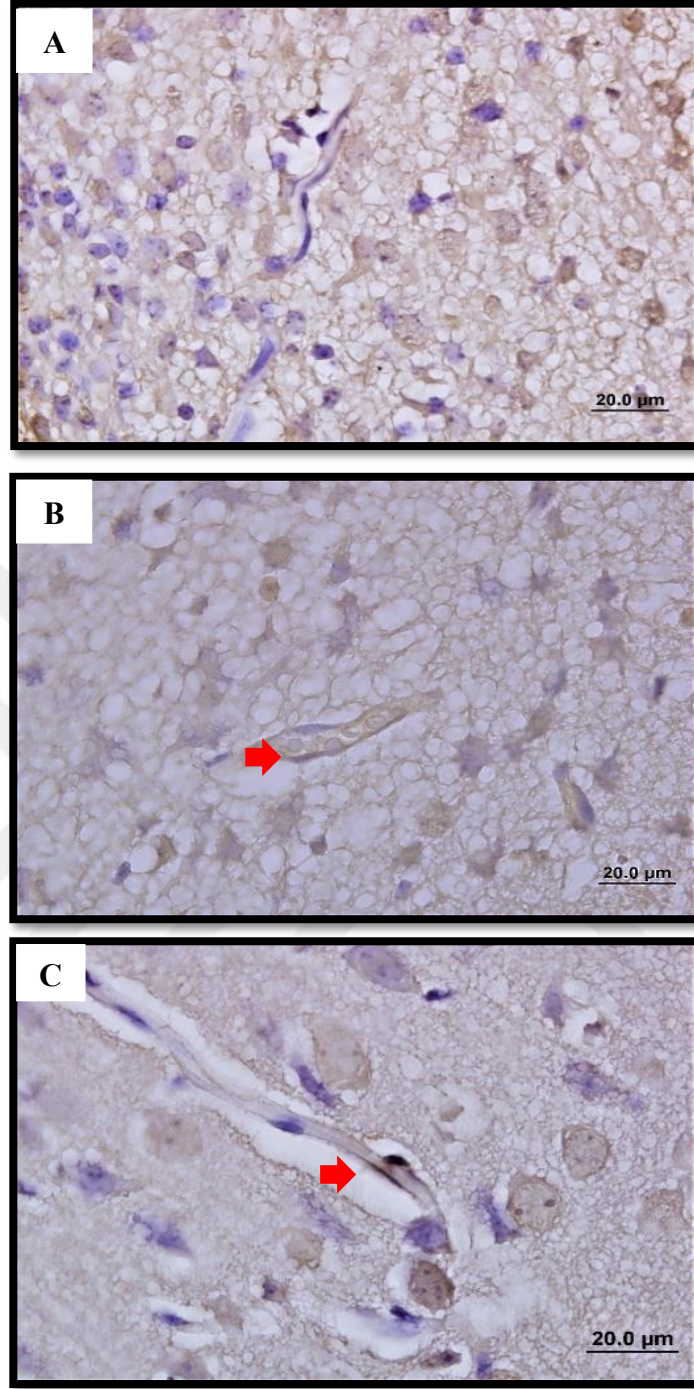
**Şekil 20.** GDM P0 (A), P7 (B)ve P21 (C) gruplarına ait Klaudin 5 boyaması. 1000X büyütme (Bar 20 µm). İmmun pozitif hücreler (kırmızı ok).



**Şekil 21.** Kontrol P0 (A), P7 (B)ve P21 (C) gruplarına ait VE-Kaderin 5 boyaması. 1000X büyütme (Bar 20 µm). İmmun pozitif hücreler (kırmızı ok ).



**Şekil 22.** Sham P0 (A), P7 (B)ve P21 (C) gruplarına ait VE-Kaderin 5 boyaması. 1000X büyütme (Bar 20 µm). İmmun pozitif hücreler (kırmızı ok ).



**Şekil 23.** GDM P0 (A), P7 (B)ve P21 (C) gruplarına ait VE-Kaderin 5 boyaması. 1000X büyütme (Bar 20 µm). İmmun pozitif hücreler (kırmızı ok).

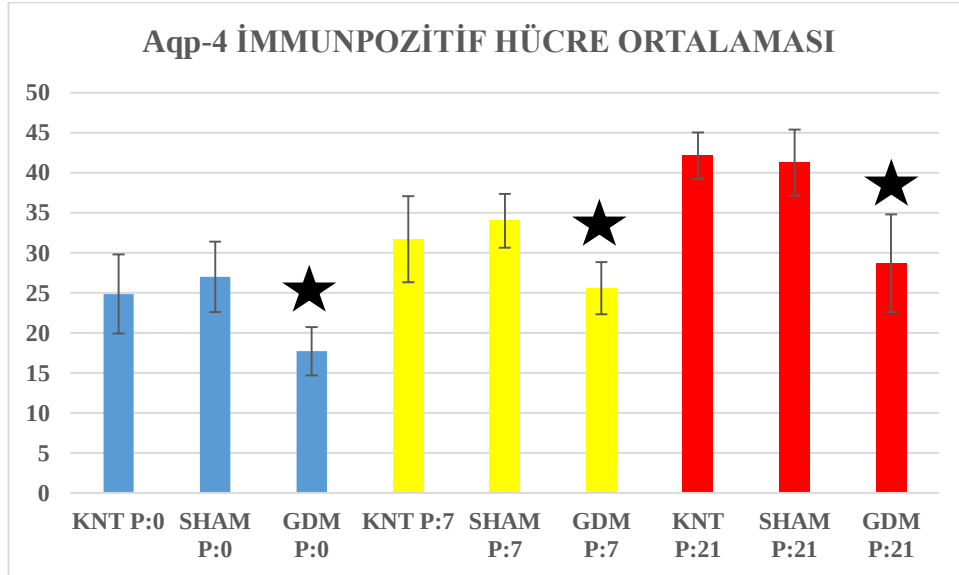
#### 4.7.2. Anti Aquaporin-4 İmmunhistokimya Boyama Değerlendirmesi

KBB'yi oluşturan elemanlardan biri olan astrosit hücreleri son ayaklarını inceleyebilmek için anti-Aqp-4 immün histokimya boyaması yapıldı.

GDM'li annelerden elde edilen P0, P7 ve P21 günlük deneklerin beyin dokusundaki immün reaktivite karşılaştırıldığında P0 grubuna ait beyin dokusunda yüzeysel damarlara uzanan glial çıkıntılar immün pozitif alanlarla yakın gelecekte şekillenen kapillerleri işaret etmekteydi. Benzer olarak intraserebral alanlara sınırlı sayıda kapiller çevresi az sayıda immün pozitif tutulum göstermektedir. P7 grubuna ait beyin dokusunda beklenen büyümeye eşlik eden kapiller artışı immün pozitif alanların artmasına neden olmuştur. P21 grubuna ait beyin dokusunda intraserebral kapiller artışı Aqu-4 immünpozitif alanların artışı ile karakterizedir. Yüzeysel ve derin intraserebral alanlarda kapiller çevresi yoğun immün pozitiflik göstermektedir (Grafik 10) (Tablo 16).

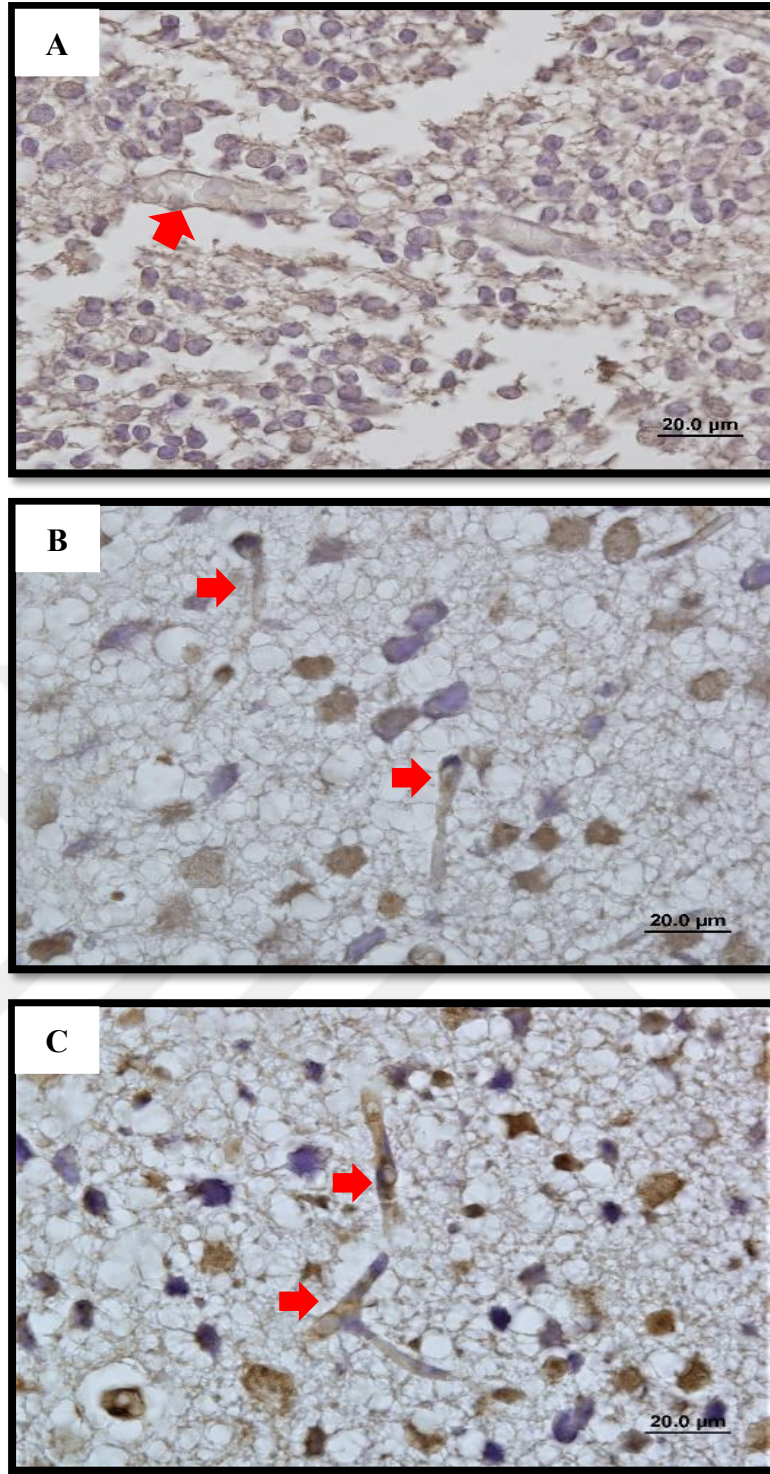
Değerler gözönüne alındığında, GDM P0, P7 ve P21 günlük denekler, Kontrol ve Sham gruplarındakiler ile karşılaştırıldığında GDM gruplarında immünpozitif hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi (Tablo 16 ve Grafik 10).

**Grafik 10.** Deney Gruplarına Ait Aqp-4 İmmünreaktivitesi

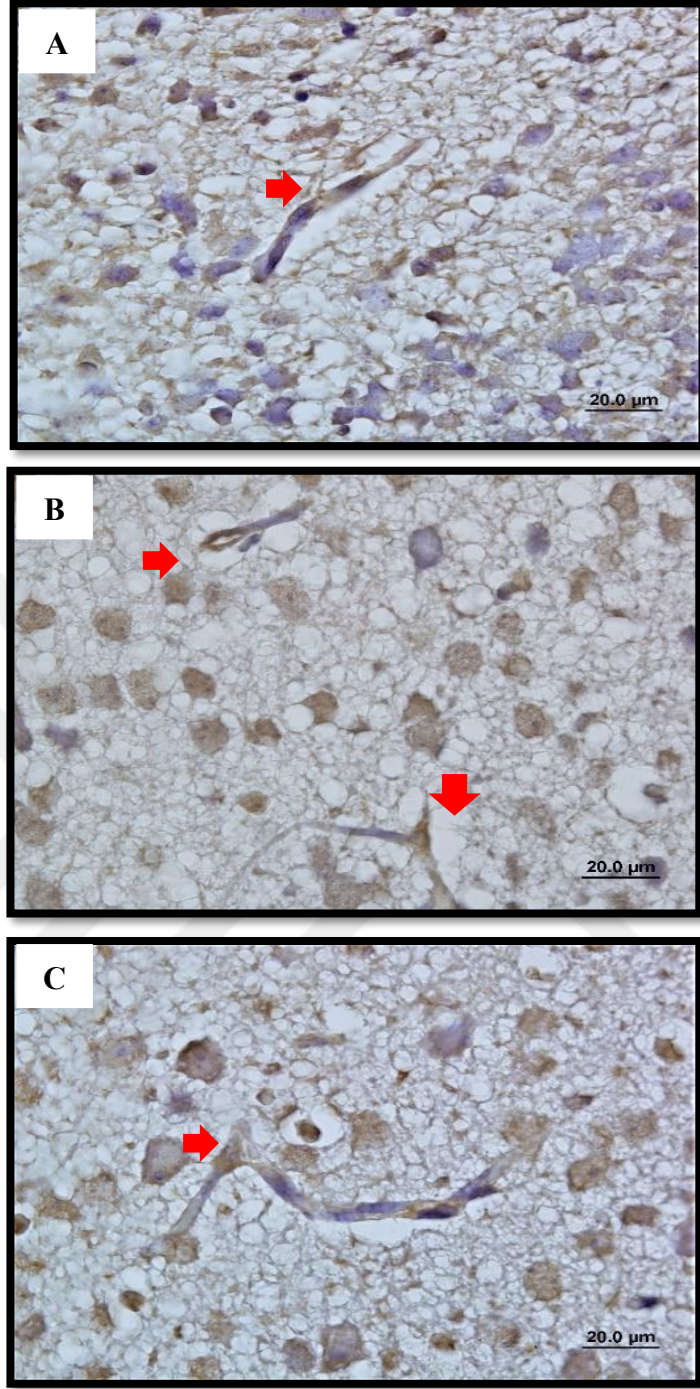


**Tablo 16.** Gruplarda p Değerleri

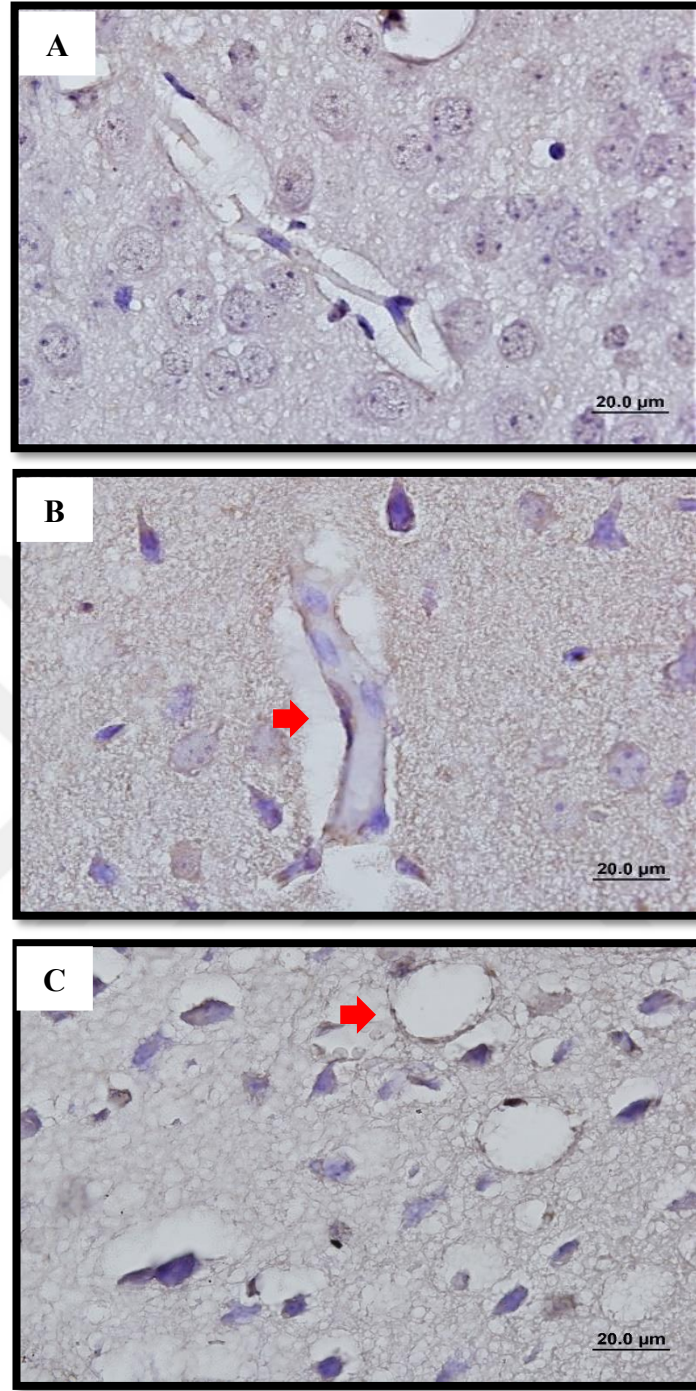
| GRUPLAR           | Aquaporin-4 p DEĞERLERİ |
|-------------------|-------------------------|
| KNT P:0-GDM P:0   | p=0,018                 |
| SHAM P:0-GDM P:0  | p=0,002                 |
| KNT P:7-GDM P:7   | p=0,029                 |
| SHAM P:7-GDM P:7  | p=0,004                 |
| KNT P:21-GDM P:21 | p=0,002                 |
| SHAMP:21-GDM P:21 | p=0,003                 |



**Şekil 24.** Kontrol P0 (A), P7 (B)ve P21 (C) gruplarına ait Aqp-4 boyaması. 1000X büyütme (Bar 20 µm). İmmun pozitif hücreler (kırmızı ok).



**Şekil 25.** Sham P0 (A), P7 (B)ve P21 (C) gruplarına ait Aqp-4 boyaması. 1000X büyütme (Bar 20 µm). İmmun pozitif hücreler (kırmızı ok).



**Şekil 26.** GDM P0 (A), P7 (B)ve P21 (C) gruplarına ait Aqp-4 boyaması. 1000X büyütme (Bar 20 µm). İmmun pozitif hücreler (kırmızı ok).

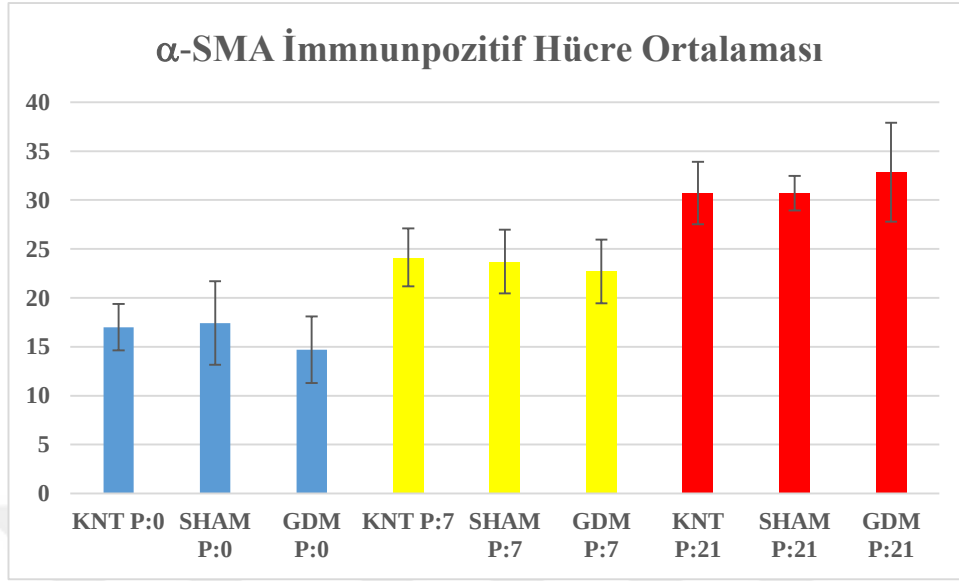
#### **4.7.3 Anti $\alpha$ -SMA İmmunhistokimya Boyama Değerlendirmesi**

KBB'yi oluşturan elemanlardan biri olan perisit hücrelerini inceleyebilmek için anti- $\alpha$  SMA immunhistokimya boyaması yapıldı.

GDM'li annelerden elde edilen P0, P7 ve P21 günlük deneklerin beyin dokusundaki immün reaktivite karşılaştırıldığında P0 grubuna ait beyin dokusunda yoğun ve komşu glial alanlar içinde az sayıda intrakapiller immün pozitif hücrelere rastlandı. İntraserebral alanlarda ise immün pozitif hücrelere rastlanmadı. Beyin dokusu yüzeyel damarlar çevresinde sınırlı sayıda immün pozitif hücreler vardı ve görece olarak daha büyük damarlarda immün pozitiflik artışı göstermekteydi. P7 grubuna ait beyin dokusunda yüzeyel ve sulkus içerisinde damar kesitlerinin çevresinde immün (+) alanlar gözlemlendi. İntraserebral alanlarda kapiller çevresinde immün pozitif hücrelere az sayıda rastlandı. P7 grubuna ait beyin dokusunda intraserebral kapiller çevresinde immün pozitif hücre artışı gözlemlendi. P21 grubuna ait beyin dokusunda anjiyogenezin artışına bağlı olarak  $\alpha$  SMA immün pozitif alanlarında artışı gözlemlendi. Yüzeyel ve derin intraserebral alanlarda kapiller çevresi yoğun immün pozitiflik göstermektedir (Şekil 27, 28 ve 29).

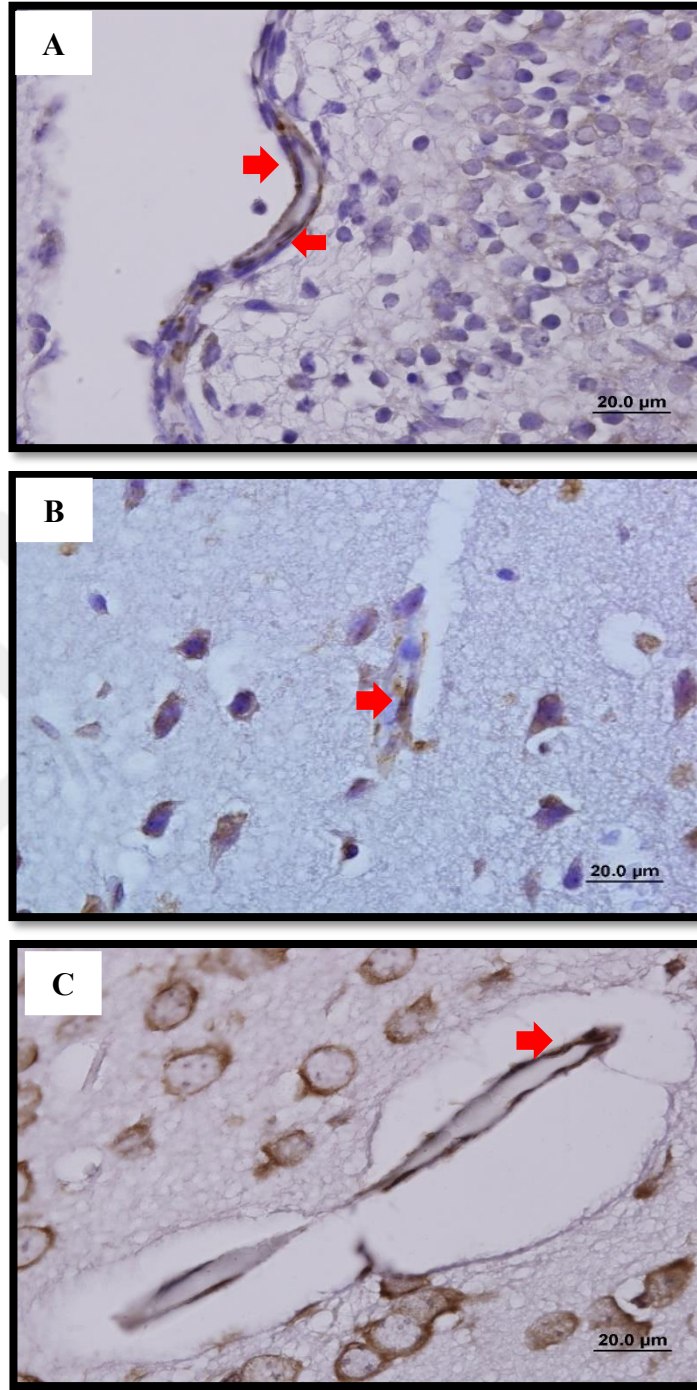
Değerler gözönüne alındığında, GDM P0, P7 ve P21 günlük denekler, Kontrol ve Sham gruplarındakiler ile karşılaştırıldığında GDM gruplarında immünpozitif hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmedi (Grafik 11) (Tablo 17).

**Grafik 11.** Deney Gruplarına Ait  $\alpha$ -SMA İmmunreaktivitesi

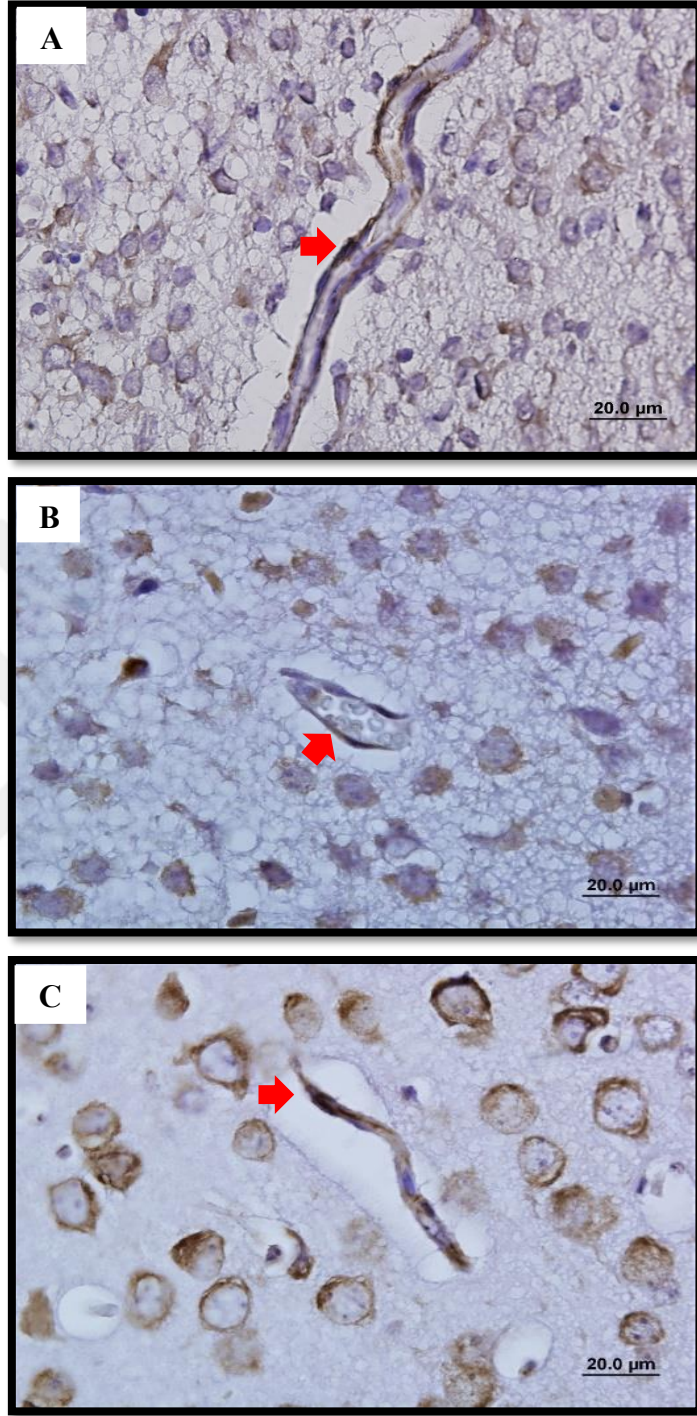


**Tablo 17.** Deney gruplarının p değerleri

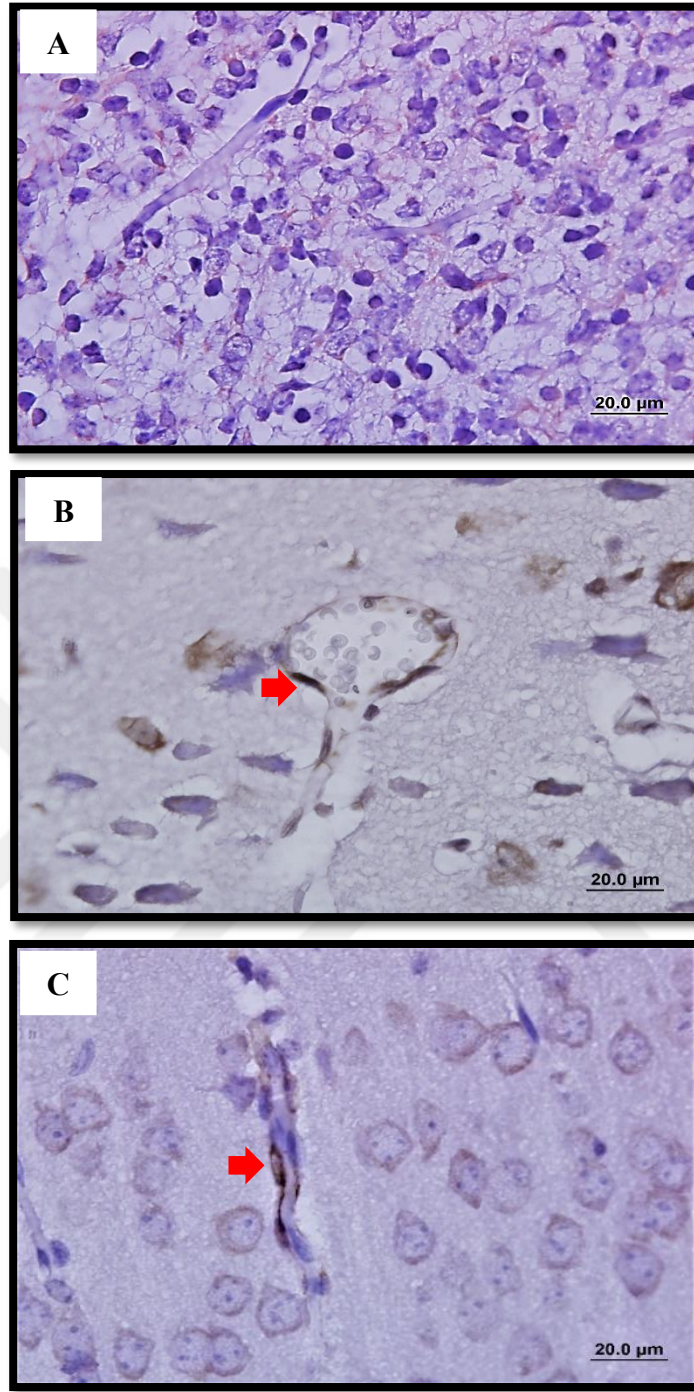
| GRUPLAR           | $\alpha$ -SMA p DEĞERLERİ |
|-------------------|---------------------------|
| KNT P:0-GDM P:0   | p=0,06                    |
| SHAM P:0-GDM P:0  | p=0,22                    |
| KNT P:7-GDM P:7   | p=0,561                   |
| SHAM P:7-GDM P:7  | p=0,606                   |
| KNT P:21-GDM P:21 | p=0,108                   |
| SHAMP:21-GDM P:21 | p=0,148                   |



**Şekil 27.** Kontrol P:0 (A), P7 (B)ve P21 (C) gruplarına ait  $\alpha$ -SMA boyaması. 1000X büyütme (Bar 20  $\mu$ m). İmmun pozitif hücreler (kırmızı ok).



**Şekil 28.** Sham P0 (A), P7 (B)ve P21 (C) gruplarına ait  $\alpha$ -SMA boyaması. 1000X büyütme (Bar 20  $\mu$ m). İmmun pozitif hücreler (kırmızı ok).



**Şekil 29.** GDM P0 (A), P7 (B)ve P21 (C) gruplarına ait  $\alpha$ -SMA boyaması. 1000X büyütme (Bar 20  $\mu$ m). İmmun pozitif hücreler (kırmızı ok).

## 5. TARTIŞMA

Literatür araştırmalarımız sonucunda, postnatal KBB gelişiminde, BEH'leri, bu hücrelere ait sıkı bağlantılar, perisit ve astrosit hücrelerini de kapsayan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda GDM'nin kan beyin bariyeri gelişimi üzerine etkisini araştırmak için deneysel olarak GDM modeli oluşturulmuş C57BL/6 suşu farelerden elde edilen yeni doğan, 7 günlük ve 21 günlük yavru farelerin kan beyin bariyeri gelişimindeki değişiklikler histolojik olarak incelendi.

Literatürde GDM'li deneklerde, ağırlık artışının kontrol gruplarına göre daha fazla olduğu gösterilmiştir. Liu ve arkadaşları 2019 yılında 36 adet C57BL/6 suşu farede deneysel olarak GDM oluşturulmuştur. Deneklerin gebeliklerinin 18.gününde vücut ağırlıklarına bakılmış ve GDM'li grubun, kontrol grubuna göre vücut ağırlıklarının daha fazla olduğunu göstermişlerdir (60).

Feng ve arkadaşlar da 2019 yılında fareler ile yapmış oldukları deneysel GDM modelinde, deneklerin gebeliklerinin 18.gününde vücut ağırlıklarına bakmış ve GDM'li grubun, kontrol grubuna göre vücut ağırlıklarının daha fazla olduğunu göstermişlerdir (61).

Bizim çalışmamızda literatürle uyumlu olarak gebeliklerinin 18. günündeki kontrol ve GDM grupları karşılaştırıldığında GDM'li gruplarda kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı ağırlık artışı gözlemdi. Sham ve GDM'li gruplar karşılaştırıldığında GDM'li gruplarda sham gruplarına göre ağırlık artışı gözlemdi. Ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Daha önce yapılan çalışmalarda STZ'nin sıçan ve fare gibi çeşitli denek türlerinde kan/glukoz seviyelerini artırdığı ve deneysel diyabet modelini oluşturduğu gösterilmiştir. 2021 yılında Zhang ve arkadaşlarının C57BL/6J farelerinde inflamasyon cevabını araştırmak için yaptıkları çalışmada, farelerin gebeliklerinin 6. gününde intraperitoneal olarak 40 mg/kg STZ enjeksiyonu yapılmıştır. Kan/glukoz değeri 11.1 mmol/L (200 mg/dL) üzerinde olan denekler GDM'li kabul edilmiş ve GDM'li deneklerin kontrol gruplarına göre kan/glukoz seviyelerinde artış olduğunu göstermişlerdir (62). Schumacher ve arkadaşlarının 2018 yılında C57BL/6N fareleri ile yaptıkları deneysel diyabet modelinde 60 mg/kg STZ kullanmışlar ve kan/glukoz değeri 300-500 mg/dl arası olan denekleri diyabet kabul etmişlerdir. DM'li deneklerin kontrol gruplarına göre kan/glukoz seviyelerinde artış olduğunu göstermişlerdir (63).

Shankar ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptıkları çalışmada C57BL/6N farelerine 150 mg/kg STZ enjeksiyonu yapmışlar ve kan/glukoz seviyeleri 200 mg/dl'den yüksek olan fareler diyabet kabul edilmiştir. DM'li deneklerin kontrol gruplarına göre kan/glukoz seviyelerinde artış olduğunu göstermişlerdir (64). Shekter ve arkadaşlarının 2020 yılında C57BL/6 farelerle yaptıkları çalışmada, deneklere gebeliklerinin 1. gününde intraperitoneal olarak 120 mg/kg STZ enjeksiyonu yapılmıştır. Kan/glukoz seviyeleri 200 mg/dL'den yüksek çıkan denekler diyabet kabul edilmiştir. GDM'li deneklerin kontrol gruplarına göre kan/glukoz seviyelerinde artış olduğunu göstermişlerdir (65). Xu ve arkadaşlarının 2019 yılında fareler üzerinde yaptıkları çalışmada, farelerin gebeliklerinin 1.gününde 200 mg/kg STZ enjeksiyonu yapılmıştır. Kan/glukoz seviyeleri 260 mg/dl üzerinde olan denekler diyabet kabul edilmiştir. GDM'li deneklerin kontrol gruplarına göre kan/glukoz seviyelerinde artış olduğunu göstermişlerdir (66). Chen ve arkadaşlarının 2019 yılında C57BL/6J fareleri ile yapmış oldukları çalışmada GDM'li gruplara gebeliklerinin 6.gününde 40 mg/kg STZ enjeksiyonu yapmışlar ve kan/glukoz değeri 11.1 mmol/L yani 200 mg/dl'den fazla olan denekler GDM'li kabul edilmiştir. GDM'li deneklerin kontrol gruplarına göre kan/glukoz seviyelerinde artış olduğunu göstermişlerdir (67).

Bizim çalışmamızda da literatürde yapılan çalışmalarla uyumlu olarak GDM gruplarını, kontrol ve sham grupları ile karşılaştırdığımızda kan/glukoz seviyelerinde anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi.

Lu ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptıkları deneysel GDM modelinde, GDM'li annelerden elde edilen yavruların kontrol gruplarına göre ağırlıklarında anlamlı artış olduğu bildirilmiştir (68). Nadif ve arkadaşlarının 2015 yılında farelerle yaptıkları GDM çalışmasında GDM'li annelerden elde edilen yavruların kontrol gruplarına göre ağırlıklarında anlamlı artış olduğu ifade edilmiştir (69).

Bizde çalışmamızda literatürle uyumlu olarak GDM'li gruptan elde edilen yavruların kontrol ve sham gruplarındaki yavrularına göre ağırlıklarında artış olduğunu gözlemlendik.

Xu ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptıkları çalışmada deneklerde STZ ile deneysel GDM modeli oluşturulmuştur. Bu çalışmada GDM'li gruptan elde edilen yeni doğan yavruların kan/glukoz değerlerinin kontrol gruplarına göre yüksek olduğu ifade edilmiştir. Ancak postnatal 14. güne kadar, GDM'li gruptan elde edilen

yavruların kan/glukoz değerlerinin düştüğünü ve kontrol grubu ile aynı seviyeye geldiğini belirtmişlerdir (66).

Bizim de çalışmamızda da yapılan çalışmalarla uyumlu olarak GDM grubundaki annelerden elde edilen postnatal 0 ve 7 günlük yavruların, kontrol ve sham grubundaki annelerden elde edilen postnatal 0 ve 7 günlük yavruların kan/glukoz değerleri karşılaştırıldı. Anlamlı artış olduğu, ancak GDM grubundaki annelerden elde edilen postnatal 21 günlük yavruların kan/glukoz değerleri kontrol ve sham 21 günlük denekler ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi.

Literatürde GDM’li deneklerden elde edilen bir batındaki canlı doğum sayısının, kontrol gruplarından elde edilen bir batındaki canlı doğum sayısına göre daha az olduğu ifade edilmiştir. Feng ve arkadaşlarının 2019 yılında fareler ile yapmış oldukları deneysel GDM modelinde, kontrol grupları ile GDM gruplarından elde edilen canlı doğum oranları karşılaştırılmıştır. Çalışmada GDM’li annelerden elde edilen canlı yavru sayısının, kontrol grubundakilere göre daha düşük olduğu gösterilmiştir (70). Xu ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptıkları çalışmada deneklerde STZ ile GDM indüklenmiştir. Bu çalışmada GDM’li gruptan elde edilen canlı doğum oranının, kontrol grubuna göre daha düşük olduğu gösterilmiştir (66). Jiang ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptıkları deneysel GDM çalışmasında canlı doğum sayıları karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada GDM’li gruptan elde edilen canlı doğum sayısının, kontrol grubuna göre daha düşük olduğu gösterilmiştir (61).

Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak GDM’li gruptaki annelerden elde edilen canlı doğum sayıları, kontrol ve sham gruplarından elde edilen canlı doğum sayılarıyla karşılaştırıldığında GDM’li gruptaki canlı doğum sayılarının, kontrol ve sham gruplarındaki canlı doğum sayılarına göre istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu gözlemlendi. Kontrol ve sham gruplarından elde edilen canlı doğum sayıları arasında istatistiksel olarak fark bulunamadı.

Lofti ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları çalışmada deneklere STZ ile deneysel GDM modeli oluşturulmuş ve GDM’li annelerden elde edilen yavrularda kontrol grubuna göre P0, P7 ve P14 günlük yavruların nöron sayılarında anlamlı azalma olduğunu ifade etmişlerdir (71). Saleh ve arkadaşlarının 2016 yılında sıçanlar ile yaptıkları deneysel GDM modelinde yeni doğan ve 21 günlük yavruların beyin hücre

sayılarını karşılaştırdıklarında, GDM'li annelerden elde edilen yavruların hücre sayılarının, kontrol gruplarına göre anlamlı olarak azaldığını bildirmişlerdir (72).

Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak GDM'li gruplardaki annelerden elde edilen yavruların beyin prefrontal korteks bölgelerinde hücre sayıları karşılaştırıldığında, GDM'li gruplardaki hücre sayılarının, kontrol ve sham gruplarındaki hücre sayılarına göre istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu gözlemlendi. Kontrol ve sham gruplarından elde edilen hücre sayıları arasında istatistiksel olarak fark bulunamadı.

Leach ve arkadaşlarının 2004 yılında maternal diyabetli ve sağlıklı gebelerden elde ettikleri plasentalarda VE-Kaderin-5 immunreaktivitesini incelemişlerdir. Diyabetle komplike olmuş gebeliklerde fetoplasental damarlarda VE-Kaderin-5 ve  $\beta$ -kateninde moleküler düzensizlikler olduğunu ve bunun bariyer bütünlüğünü bozan nedenlerden biri olduğunu ifade etmişlerdir (73).

Huber ve arkadaşlarının 2006 yılında STZ ile maternal diyabet oluşturulan sıçanlarda, yavrularının ortabeyin, bazal ganglia, korteks ve hipokampuslarında KBB geçirgenliği araştırılmıştır. Çalışmacılar maternal diyabetin bu bölgelerde, serebral kapillerdeki KBB geçirgenliğini artırdığını bildirmişlerdir. Ayrıca artan mikrovasküler geçirgenlikte KBB endotel hücre sıkı bağlantı düzenlemesinin araştırılmasına ihtiyaç duyulduğunu ifade etmişlerdir (74).

Bizim çalışmamızda da literatürü destekler nitelikte, maternal diyabetle komplike olmuş gebeliklerden elde edilen P0, P7 ve P21 günlük deneklerin, KBB'yi oluşturan elemanlardan biri olan endotel hücrelerinin sıkı bağlantı komplekslerinden olan VE-Kaderin-5 ve Klaudin-5'in ekspresyonunda azalma olduğu istatistiksel olarak gösterildi. GDM'de postnatal 0, 7 ve 21 günlük farelerde kaludin-5 ekspresyonu ilk kez bizim çalışmamızda gösterilmiştir.

Cohen ve arkadaşlarının 2019 yılında yüksek glikoz ile kültürlenmiş neonatal astrosit hücrelerinde yaptıkları çalışmada, hipergliseminin astrositlerin mitojenik aktivitesini bozduğunu ve bunun diyabette görülen mikroanjiyopatiyi açıklayabileceğini öne sürmüşlerdir (75). Li ve arkadaşlarının 2018 yılında yüksek glikoz ile kültürlenmiş primer astrosit hücrelerinde, hipergliseminin astrosit enerji metabolizmasını ile fenotipini bozduğunu ve astrosit proliferasyonunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir (76).

Bizde çalışmamızda, önceki çalışmalarla uyumlu olarak hipoglisemide KBB’de bulunan astrosit hücrelerinin proliferasyonunun kontrol ve sham grubuna göre azalmış olduğunu bulduk. Ayrıca ilk kez bizim çalışmamızda GDM’de P0, P7 ve P21 günlük yavrularda astrosit hücrelerinin akıbeti incelendi. Çalışmamızın sonucunda, GDM’nin postnatal dönemde astrosit hücrelerinde kontrol grubuna göre sayısal olarak azalması olduğunu gösterdik.

Mae ve arkadaşlarının 2018 yılında hiperglisemik fareler üzerinde yaptıkları çalışmada uzun süreli sistemik hipergliseminin fare KBB’sinde perisit hücre kaybına neden olmadığını bildirmişlerdir (77).

Bizde çalışmamızda, önceki çalışmalarla uyumlu olarak hipoglisemide KBB’de bulunan perisit hücrelerinin proliferasyonunun kontrol ve sham grubuna göre farklı olmadığını gösterdik. Ayrıca ilk kez bizim çalışmamızda GDM’de P0, P7 ve P21 günlük yavrularda KBB’de bulunan perisit hücrelerinin dağılımının sağlıklı yavrularla aynı olduğu gösterildi.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLERİ

Sonuçta, tüm bulgularımız genel bir değerlendirmeye alınırsa literatürle uyumludur. Ek olarak özgün/yeni bulgularımız literatüre katkı yapmaktadır. Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda, maternal diyabetin KBB elemanları olan endotel hücrelerin sıkı bağlantı proteinlerinin ve astrosit son ayaklarındaki endotel hücreleri ile bağlantı kuran Aqp-4 proteininin ifadesini azalttığı gözlemledik. Bunların maternal diyabette KBB gelişimini üzerine olumsuz etkileri olduğunu ve KBB'nin geçirgenliğini artırdığını düşünmekteyiz.

İleri çalışmalarda, araştırmamızda kullandığımız semi-kantitatif değerlendirme yöntemlerinin yanısıra, ultrastrüktürel olarak elektron mikroskopik bulgular ve biyokimyasal parametrelerle de desteklenmesi ile maternal diyabetin KBB gelişimi üzerindeki bilgilere ışık tutacağını düşünmekteyiz.

## 7. KAYNAKLAR

1. Tóvolli RH, Dragano V, Ramalho A, Velloso LA. Development and Function of the Blood-Brain Barrier in the Context of Metabolic Control. *Front Neurosci.* 2017; 11:224-35.
2. Luissint AC, Artus C, Glacial F, Ganeshamoorthy K, Couraud PO. Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS.* 2012; 9 (23):1-12.
3. Tietz S, Engelhardt B. Brain barriers: crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *J. Cell Biol.* 2015; 209 (4):493–506.
4. Keaney J, Campbell M. The dynamic blood–brain barrier. *FEBS J.* 2015; 282: 4067–4079.
5. Trost A, Lange S, Schroedl F, Bruckner D, Motloch KA, Bogner B ve ark. Brain and retinal pericytes: origin, function and role. *Front. Cell. Neurosci.* 2016; 4:20-29.
6. Shepro D, ve Morel M. Pericyte physiology. *FASEB J.* 1993; 7, 1031–1038, Millis S, Cowin J, Kaur P. Pericytes, mesenchymal cell and wound healing process. *Cells,* 2013; 2:621-634
7. Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu H, Wallgard E, Niaudet C ve ark. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature,* 2010; 468(7323): 557–561.
8. Winkler A, Bell R, Zlokovic V. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat. Neurosci.* 2011;14(11): 1398–1405.
9. Cabezas R, Ávila M, Gonzalez J, El-Bachá S, Baez E, Gracia-Segura LM ve ark. Astrocyte modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson’s disease. *Front. Cell. Neurosci.* 2014; 8:211-222.
10. Dave M, Mirabella T, Weatherbee D, Greif M. Pericyte ALK5/TIMP3 Axis Contributes to Endothelial Morphogenesis in the Developing Brain. *Developmental Cell.* 2018;44:1–14.
11. Dong W, Glendining A, Grattan R, Jasoni L. Maternal Obesity in the Mouse Compromises the Blood-Brain Barrier in the Arcuate Nucleus of Offspring. *Endocrinology.* 2016;157:2229-42.
12. Prasad S, Sajja RK, Naik P, Cucullo L. Diabetes Mellitus and Blood-Brain Barrier Dysfunction: An Overview. *J Pharmacovigil.* 2014; 2(2): 125–150.
13. Lewis PM, Dunn MP, McMahon JA, Logan M, Martin JF, Jaques BSt ve ark. Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell.* 2001;105(5): 599-612.
14. Chari NS, McDonnell TJ. The sonic hedgehog signaling network in development and neoplasia. *Adv Anat Pathol.* 2007;14(5): 344-352.
15. The Diabetes Control and Complications Trial Study Group. Pregnancy outcomes in the Diabetes Control and Complications Trial. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;4 (174):1343–1353.
16. Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog signaling. *J Cell Sci.* 2007;120: 3-6.

17. Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Rouse DJ, Spong JY. Williams Obstetrics: Diabetes. 23. Baskı. London, Prentice-Hall International, 2010; 1104-1125.
18. Mitanchez, D, Yzydorczyk, C, Simeoni, U. What Neonatal Complications Should The Pediatrician Be Aware of in Case of Maternal Gestational diabetes? World J. Diabetes, 2015; 6(5): 734–743.
19. Liao D, Ng YK, Tay SS, Ling S, Dheen E. S. Altered gene expression with abnormal patterning of the telencephalon in embryos of diabetic Albino Swiss mice. Diabetologia, 2004; 47(3):523–531.
20. Prasad BV. Examining Biological Foundations of Human Behavior. ABD: IGI Global; 2020.
21. Kuruş M. Histoloji: MSS Histolojisi. Ankara: Akademisyen Kitapevi; 2021.
22. Teissier T, Boulanger E ve Deramecourt V. Normal Ageing Of The Brain: Histological And Biological Aspects. 2020; 176(9): 649-660.
23. Taner D. Fonksiyonel Nöroanatomi. 21. Baskı. Ankara: ODTÜ Yayıncılık; 2002.
24. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 5. Baskı. Ankara :Güneş Kitabevi; 2001.
25. Marshalla J, Masona J. Mouse Vs Man: Organoid Models Of Brain Development & Disease, Brain Research. 2019;1724: 1-5.
26. Budday S ve Kuhl E. Modeling the life cycle of the human brain. Current Opinion in Biomedical Engineering, 2020; 15:16–25.
27. Andrews MG ve Nowakowski. Human Brain Development Through The Lens Of Cerebral Organoid Models, Brain Research, 2019; 15:1725.
28. Kostovic I, Sedmak G ve Judas M. Neural Histology And Neurogenesis Of The Human Fetal And Infant Brain, NeuroImage, 2019;188:743-773.
29. Filas A, Xu G, ve Taber L. Mechanisms of Brain Morphogenesis, Springer, 2013; 337-349.
30. Shiota K. Prenatal Development of the Human Central Nervous System, Normal and Abnormal, Donald School Journal of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. 2015;9(1):61-66.
31. Götz M ve Huttner B.W. The Cell Biology Of Neurogenesis, Nature. 2005; 6:777-785.
32. Shen T, Ji F ve Jiao J. Epigenetics: major regulators of embryonic neurogenesis, Sci. Bull. 2015; 60(20):1734–1743.
33. Mahringer A, Ott M ve Fricker G. The Blood–Brain Barrier: An Introduction to Its Structure and Function, Top Med Chem.2014;10:1–20.
34. Sweeney MD, Zhao Z, Montagne A, Nelson AR, Zlokovic BV. Blood-Brain Barrier: From Physiology To Disease And Back, American Physiological Society. 2018; 99: 21–78.
35. Yu X, Ji C, Shao A. Neurovascular Unit Dysfunction and Neurodegenerative Disorders. Frontiers in Neuroscience. 2020; 14: 334-41.

36. Bel AH, Miller SL, Melendez MC, Malhotra A. The Neurovascular Unit: Effects of Brain Insults During the Perinatal Period. *Frontiers in Neuroscience*. 2020; 13:1452-1472.
37. Tajés M, Fernandez E.R, Jiang XW, Marato MB, Guivernau B, Pichot ve ark. The blood-brain barrier: Structure, function and therapeutic approaches to cross it, *Mol Membr Biol*. 2014; 31(5):152–167.
38. Schulz M ve Engelhardt B.The circumventricular organs participate in the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cerebrospinal Fluid Research*. 2005; 2(8):1-14.
39. Weiss N, Miller F, Cazaubon S ve Couraud PO. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1788(4):842-857.
40. Szathmari A, Champier J, Egea JF, Jouvet A, Mottolese C, Montangec MF ve ark. Anatomical, molecular and pathological consideration of the circumventricular organs. *Neurochirurgie*. 2015; 61: 90-100.
41. Daneman R ve Prat A. The Blood –Brain Barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(1): 1-23.
42. Liu WY, Wang ZB, Zhang LC, Wei1 X ve Li L. Tight Junction in Blood-Brain Barrier: An Overview of Structure, Regulation, and Regulator Substances. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2012; 18(8): 609–615.
43. Zhang ZS, Zhou HN, He SS, Xue MY, Li T ve Liu LM. Research advances in pericyte function and their roles in diseases. *Chinese Journal of Traumatology*. 2020; 23(2):89-95.
44. Rhea ME ve Banks WA. Role of the Blood-Brain Barrier in Central Nervous System Insulin Resistance. *Neurosci*. 2019; 13:521.
45. Lanciotti A, Brignone MS, Bertini E, Petrucci TC, Aloisi F ve Ambrosini E. Astrocytes: emerging stars in leukodystrophy pathogenesis *Translational Neuroscience*. 2013;4(2):144-164.
46. Zhang S, Cai Y, Meng C, Ding X, Huang J, Luo X ve ark. The role of the microbiome in diabetes mellitus. *Diabetes Research and clinical practice*. 2021;172:1-11.
47. Krynytska I ve Marushchak M. The Indices Of Nitric Oxide System In Rats With Carrageenan-Induced Enterocolitis Combined With Diabetes Mellitus. *Rom J Diabetes Nutr Metab Dis*. 2018;25(3):283-288.48.
- 48.Schmidt AN. Highlighting Diabetes Mellitus The Epidemic Continues. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2018;1(38):1-8.
49. Vana DR, Adapa D, Prasad V, Choudhury A, Ahuja G. Diabetes mellitus types: Key genetic determinants and risk assessment. *Genetics and Molecular Research*. 2019;18(2): 1-28.
50. American Diabete Association. Diagnosis And Classification Of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2005;28(1): 37-42.

51. Feng Y, Feng Q, Qu H, Song X, Hu J, Xu X ve ark. Stress adaptation is associated with insulin resistance in women with gestational diabetes mellitus. *Nutrition and Diabetes*. 2020;10(4): 1-4.
52. Mahajan A, Donovan LE, Vallee E, Yamamoto JM. Evidenced-Based Nutrition for Gestational Diabetes Mellitus. *Current Diabetes Reports*. 2019;19(10): 94-104.
53. Plows JF, Stanley JL, Baker PN, Reynolds MC ve Vickers MH. The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus *Int. J. Mol. Sci*. 2018;19(11): 1-21.
54. Money KM, Barke TL, Serezani A, Gannon M, Garbett KA, Aronoff DM ve ark. Gestational diabetes exacerbates maternal immune activation effects in the developing brain. *Molecular Psychiatry*. 2018; 23(9):1920–1928.
55. Ji S, Zhou W, Li X, Liu S, Wang F, Li X ve ark. Maternal hyperglycemia disturbs neocortical neurogenesis via epigenetic regulation in C57BL/6J mice. *Cell Death & Disease*. 2019;10:211-224.
56. Solís K.H, Méndez L.I, López G, Diaz NF, Portillo W, Ocampo MN ve ark. The Histamine H1 Receptor Participates in the Increased Dorsal Telencephalic Neurogenesis in Embryos from Diabetic Rats, *Front. Neurosci*. 2017;11:676-690.
57. He X.J, Dai R.X, Tian C. Neurodevelopmental outcome at 1 year in offspring of women with gestational diabetes mellitus, *Gynecological Endocrinology*. 2020;37(1):88-92.
58. Romeroa ML, Solís KH, Cruz-Reséndiz MS, Pérez JE, Díaz NF, Herrera HF ve ark. Central nervous system development-related microRNAs levels increase in the serum of gestational diabetic women during the first trimester of pregnancy. *Neuroscience Research*. 2018;130:8–22.
59. Devarshi P, Grant RW, Ikonte CJ ve Mitmesser SH. Maternal Omega-3 Nutrition, Placental Transfer and Fetal Brain Development in Gestational Diabetes and Preeclampsia. *Nutrients*. 2019; 11(5):1-12.
60. Liu Z, Yu X, Tong C ve Qi H. Renal dysfunction in a Mouse mode of GDM is prevented by metformin through MAPKs. 2019;19(5); 4491-4499.
61. Jiang Yk, Xin KY, Ge HA, Kong FJ ve Zhao G. Upregulation Of Renal GLUT2 And SGLT2 Is Involved In High-Fat Diet-Induced Gestational Diabetes In Mice Diabetes. *Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 2019;12;2095-2105.
62. Zhang H, Luan S, Xiao X, Lin L, Zhao X, ve Liu X. Silenced microRNA-222 suppresses inflammatory response in gestational diabetes mellitus mice by promoting CXCR4. *Life Sciences*. 2021; 266:1-26.
63. Schumacher D, Morgenstern J, Oguchi Y, Volk N, Kopf S, Groener J.K ve ark. Compensatory Mechanisms For Methylglyoxal detoxification In Experimental & Clinical Diabetes. *Molecular Metabolism*. 2018; 18:143-152.
64. Shankar K, Gupta D, Mani B.K, Findley B.G, Lawrence Ş.O, Metzger N.P ve ark. Ghrelin Protects Against Insulin-Induced Hypoglycemia in a Mouse Model of Type 1 Diabetes Mellitus. *Frontiers in Endocrinology*. 2020;11(606):1-11.

65. Shekler K, Hamshaw Y, Sirhan W, Getselter D, Srikanth K.D, Malka A ve ark. Gestational diabetes induces behavioral and brain gene transcription dysregulation in adult offspring. *Translational Psychiatry*. 2020;10(412):1-12.
66. Xu J, Huang J, Pan Q, Du M, Li Z ve Dong H. Gestational diabetes promotes germ cell cCyst breakdown and primordial follicle formation in newborn mice via the AKT signaling pathway. *Plos One*. 2019;14(4):1-13.
67. Chen SH, Liu XN ve Peng Y. MicroRNA-351 eases insulin resistance and liver gluconeogenesis via the PI3K/AKT pathway by inhibiting FLOT2 in mice of gestational diabetes mellitus. *J Cell Mol Med*. 2019;23(9):5895–5906.
68. Lu X, Wu F, Jiang M, Sun X ve Tian G. Curcumin ameliorates gestational diabetes in mice partly through activating AMPK. *Pharmaceutical Biology*. 2019;57(1):025-254.
69. Nadif R, Dilworth MR, Sibley CP, Baker PN, Davidge ST, Gibson JM ve ark. The Maternal Environment Programs Postnatal Weight Gain and Glucose Tolerance of Male Offspring, but Placental and Fetal Growth Are Determined by Fetal Genotype in the *Leprdb/+* Model of Gestational Diabetes. *Endocrinology*. 2015;156(1):360-366.
70. Feng W, Wang Y, Guo N, Huang P ve Mi Y. Effects of Astaxanthin on Inflammation and Insulin Resistance in a Mouse Model of Gestational Diabetes Mellitus. *Dose-Response: An International Journal*. 2020:1-11.
71. Lotfi N, Hami J, Hosseini M, Haghir D, Haghir H. Diabetes during pregnancy enhanced neuronal death in the hippocampus of rat offspring. *Int. J. Devl Neuroscience*. 2016;51; 28–35.
72. Saleh M, Hassan S, Mahmoud F ve Shenouda M. The effect of the maternal induced diabetes on the postnatal development of the dorsomedial nucleus in hypothalamus of the albino rat. 2016;4(1);98-103.
73. Leach L, Gray C, Staton S, Babawale MO, Gruchy A ve Foster C. Vascular endothelial kaderin and  $\beta$ -catenin in human fetoplacental vessels of pregnancies complicated by Type 1 diabetes: associations with angiogenesis and perturbed barrier function. *Daibetologia*. 2004;47;695–709.
74. Huber JD, Vangilder LR Ve Houser KA. Streptozotocin-Induced Diabetes Progressively Increases Blood-Brain Barrier Permeability In Specific Brain Regions In Rats *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291;2660-2668.
75. Cohen S, Liu Q, Wright M, Garvin J, Rarick K ve Harder D. High glucose conditioned neonatal astrocytes results in impaired mitogenic activity in cerebral microvessel endothelial cells in co-culture. *Heliyon*. 2019;5;1795-1802.
76. Li W, Choudhury GR, Winters A, Prah j, Lin W ve ark. Hyperglycemia Alters Astrocyte Metabolism and Inhibits Astrocyte Proliferation. *Aging and Diaseas*. 2018;9(4);674-684.
77. Mae MA, Li T, Bertuzzi G, Raschperger E, Vanlandewijck M, He L ve ark. Prolonged Systemic Hyperglycemia Does Not Cause Pericyte Loss And Permeability At The Mouse Bloodbrain Barrier. *Scientific Reports*. 2018;8;17462-17472.

## **8. EKLER**

Ek-1 Etik Kurul Raporu

Ek-2 ARBİS Öz Geçmişı



Gündem No/Toplantı No/Yıl : 04/12/2018  
Toplantı Tarihi : 26 Haziran 2018

Sayın, Prof.Dr.Bekir Uğur ERGÜR  
DEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

35/2018 Protokol No'lu: yürütücüsü olduğunuz "Kan Beyin Bariyeri Gelişiminin Gestasyonel Diabetes Mellitus'da İncelenmesi" isimli, PINAR AKOKAY, SERAP C. MICİLİ, FUNDA TUZUN, HASAN ÖZKAN'ın araştırıcı olduğu, 252 adet C57BL talep edilen projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir. Ancak hayvan sayısı gözönüne alındığında laboratuvarın rutin üretiminde olmayan bir sayıyı aynı anda talebin karşılanması açısından laboratuvar ile görüşülmesi gerekmektedir.  
Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu  
Başkanı

Prof.Dr.Ali Nizca'n GOKMEN  
Başkan Vekili

Prof.Dr.Safiye AKTAŞ  
Üye

Prof.Dr. Hatice Nur OLSUN  
Üye(Topl.Katılmadı)

Prof.Dr.Gülşün OKTAY  
Üye

Prof.Dr.Özcan KIRKIM  
Üye

Prof.Dr.Türkay ERTAY  
Üye

Prof.Dr.Pembe UYGUN MESKİNOĞLU  
Danışman

Prof.Dr.Nergis DÜRMÜŞ

Prof.Dr.Zekiye Sultan ALTUN  
Üye

Doç.Dr.Nermin Nüket GOÇMEN MAS  
Üye

Doç.Dr.Orhan KALEMCİ  
Üye (Topl.Katılmadı)

Zehra KINAM  
Üye

Vet.Hekim Adnan SERPEN

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin başvuru formunda bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

Sayın, Prof. Dr. Güven ERBİL  
DEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

35/2018 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Kan Beyin Bariyeri Gelişiminin Gestasyonel Diabetes Mellitus'da İncelenmesi" isimli, PINAR AKOKAY, SERAP C. MİÇLİ, FUNDA TUZUN, HASAN ÖZKAN'ın araştırmacı olduğu, 252 adet C57BL talep edilen projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilen projede; gönderilen belgeler incelenerek, Prof. Dr. Bekir Uğur ERGÜR'ün yerine proje yürütücüsü olarak Prof. Dr. Güven ERBİL'in yürütücü olarak atanması uygun bulunmuştur.  
Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof. Dr. Özman YILMAZ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu  
Başkanı

Prof. Dr. Ali Necati GÖKMEN  
Başkan Vekili

Prof. Dr. Safiye AKTAŞ  
Üye

Prof. Dr. Hatice NUR OLGUN  
Üye

Prof. Dr. Zekiye Sultan ALTUN  
Üye

Prof. Dr. Günay KIRKIM  
Üye (Topl. Katılamadı)

Prof. Dr. Nergiz DURMUŞ

Prof. Dr. Pembe UYGUN KESKİNOĞLU  
Danışman

Prof. Dr. Gümüşe ÇAPA KAYA  
Üye

Prof. Dr. Semra KOÇTÜRK  
Üye (Topl. Katılamadı)

Prof. Dr. Çetin PEKÇETİN  
Üye (Topl. Katılamadı)

Doç. Dr. Sefa KURT  
Üye (Topl. Katılamadı)

Zehra KINAM  
Üye

Vet. Hekim Adnan SERPEN  
Üye

Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde bold karaktere kullanılarak yapılması  
incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

# PINAR AKOKAY

E-Posta Adresi :  
Telefon (İş) :  
Telefon (Cep) :  
Adres :

## Öğrenim Bilgisi

|                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Doktora<br>2014                       | <b>DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ</b><br>TIP FAKÜLTESİ/TEMEL TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ/HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI<br><br>Tez adı: Kan Beyin Bariyeri Gelişiminin Gestasyonel Diabetes Mellitus'xxda İncelenmesi Tez Danışmanı:(BEKİR UĞUR ERGÜR)                              |
| Yüksek Lisans<br>2011<br>5/Şubat/2014 | <b>DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ</b><br>TIP FAKÜLTESİ/TEMEL TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ/HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI<br><br>Tez adı: Diyabetik sıçanlarda uPAR ve vitronektin moleküllerinin endometriyumdaki dağılımlarının incelenmesi (2014) Tez Danışmanı:(BEKİR UĞUR ERGÜR) |
| Lisans<br>2006<br>24/Haziran/2010     | <b>AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ</b><br>FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ/BİYOLOJİ BÖLÜMÜ/BİYOLOJİ PR.                                                                                                                                                                                      |

## Görevler

|                           |                                                                                                                                                                              |
|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ÖĞRETİM GÖREVLİSİ<br>2018 | <b>İZMİR KAVRAM MESLEK YÜKSEKOKULU/İZMİR KAVRAM MESLEK YÜKSEKOKULU/TIBBİ HİZMETLER VE TEKNİKLER BÖLÜMÜ/TIBBİ LABORATUVAR TEKNİKLERİ PR. (TAM BURLU) (Program Başkanlığı)</b> |
|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

## Projelerde Yaptığı Görevler:

1. "Başı Yarası Gelişimini Önlemede Çay Ağacı Yağı İle Zenginleştirilmiş Cilt Nemlendiricisinin, Saf Gliserin İle Karşılaştırılması", Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Yürütücü:ALAN NURTEN,Araştırmacı:BÜYÜKÇOBAN SİBEL,Araştırmacı:TUNA ORAN NAZAN,Danışman:ERGÜR BEKİR UĞUR,Araştırmacı:AKOKAY PINAR, , 15/04/2019 (Devam Ediyor)  
Hidrojel tabanlı Yapı İskeleleri Kullanarak Kıkırdak Doku Defektleri Onarımının in vitro ve in vivo Olarak Değerlendirilmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı:kara aylin,Araştırmacı:TANIK MURAT,Araştırmacı:ERGÜR BEKİR UĞUR,Araştırmacı:baysan gizem,Araştırmacı:ÇEÇEN BERİVAN,Araştırmacı:ZİYLAN AYLİN,Araştırmacı:AKOKAY PINAR,Yürütücü:HAVİTÇIOĞLU HASAN, , 19/12/2016 (Devam Ediyor)

## İdari Görevler

|                         |                                                                                                                                                         |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Program Başkanı<br>2018 | <b>İZMİR KAVRAM MESLEK YÜKSEKOKULU/İZMİR KAVRAM MESLEK YÜKSEKOKULU/TIBBİ HİZMETLER VE TEKNİKLER BÖLÜMÜ/TIBBİ LABORATUVAR TEKNİKLERİ PR. (TAM BURLU)</b> |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

## Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler

1. Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği, Üye , 2018

## Dersler \*

|                                                | Öğrenim Dili | Ders Saati |
|------------------------------------------------|--------------|------------|
| <b>2019-2020</b>                               |              |            |
| <b>Önlisans</b>                                |              |            |
| PATOLOJİ                                       | Türkçe       | 2          |
| Özel Histokimya                                | Türkçe       | 3          |
| histoloji                                      | Türkçe       | 3          |
| Yönlendirilmiş Çalışma                         | Türkçe       | 2          |
| Patoloji                                       | Türkçe       | 1          |
| <b>2018-2019</b>                               |              |            |
| <b>Önlisans</b>                                |              |            |
| Tıbbi Cihaz Güvenliği                          | Türkçe       | 2          |
| Histokimya Teknikleri I                        | Türkçe       | 8          |
| Histoloji                                      | Türkçe       | 3          |
| Patoloji                                       | Türkçe       | 2          |
| Histokimya ve Laboratuvar Uygulamalarına Giriş | Türkçe       | 4          |
| Genel Biyoloji                                 | Türkçe       | 12         |

## Eserler

### Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. GENÇPINAR TUĞRA, AKKAYA GÖKMEN, BİLEN ÇAĞATAY, AKOKAY PINAR, YILMAZ OSMAN, METİN SADIK KIVANÇ (2020). Efficiency of Minimized Circuits of a Heart Roller Pump on Systemic Inflammatory Response Syndrome and Multiorgan Effects in a Rat Model. The Heart Surgery Forum, 23(2), 187-192. (Yayın No: 6247981)
2. ARICI MUALLA AYLİN, ŞAHİN AYNUR, ÇAVDAR ZAHİDE, ERGÜR BEKİR UĞUR, URAL CEMRE, AKOKAY PINAR, KALKAN ŞULE, TUNÇOK YEŞİM (2019). Effects of resveratrol on alpha-amanitin-induced nephrotoxicity in BALB/c mice. Human Experimental Toxicology, 96032711988827, Doi: 10.1177/0960327119888271 (Yayın No: 5639785)
3. ARICI MUALLA AYLİN, ŞAHİN AYNUR, ÇAVDAR ZAHİDE, ERGÜR BEKİR UĞUR, URAL CEMRE, AKOKAY PINAR, KALKAN ŞULE, TUNÇOK YEŞİM (2019). Effects of resveratrol on alpha-amanitin-induced nephrotoxicity in BALB/c mice.. HUMAN EXPERIMENTAL TOXICOLOGY, Doi: doi: 10.1177/0960327119888271. (Yayın No: 5741368)
4. GENÇPINAR TUĞRA, AKKAYA GÖKMEN, BİLEN ÇAĞATAY, AKOKAY PINAR, YILMAZ OSMAN, ÇATALYÜREK HÜSEYİN HÜDAİ (2018). Effects of carbon dioxide insufflation on anastomosis remodeling at a carotid artery site in rabbits. Polish Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 15(3), 170-175., Doi: 10.5114/kitp.2018.78441 (Yayın No: 6089006)
5. GENÇPINAR TUĞRA, BİLEN ÇAĞATAY, ÖZKAN BERKE, UĞURLU ŞEVKET BARAN, AKOKAY PINAR, YILMAZ OSMAN, ERGÜR BEKİR UĞUR (2017). The effect of bemiparin on neointimal hyperplasia and endothelial cell proliferation in a rabbit carotid artery model. Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi (Yayın No: 5159993)
6. AKKAYA GÖKMEN, BİLEN ÇAĞATAY, GENÇPINAR TUĞRA, AKOKAY PINAR, UĞURLU ŞEVKET BARAN (2017). Effects of rivaroxaban on intimal hyperplasia and smooth muscle cell proliferation at the carotid artery anastomosis site in rabbits. The Anatolian Journal of Cardiology, 18(4), 261-265., Doi: 10.14744/AnatolJCardiol.2017.7898 (Yayın No: 6089130)
7. AKAN M, ÖZBİLGİN ŞULE, BOZTAŞ NİLAY, ÇELİK A, ÖZKARDEŞLER SEVDA, ERGÜR BEKİR UĞUR, GÜNELİ ENSARİ, ŞİŞMAN ALİRİZA, AKOKAY PINAR, MESERİ DALAK RECİ (2016). Effect of

#### Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

- magnesium sulfate on renal ischemia-reperfusion injury in streptozotocin-induced diabetic rats. European Review for Medical and Pharmacological Sciences (Yayın No: 5160019)
8. ERGÜR BEKİR UĞUR, CİLAKEK MIÇILI SERAP, YILMAZ OSMAN, AKOKAY PINAR (2015). The effects of  $\alpha$ -lipoic acid on aortic injury and hypertension in the rat remnant kidney (5/6 nephrectomy) model. Anatolian Journal of Cardiology (Yayın No: 5002818)
  9. CİLAKEK MIÇILI SERAP, GÖKER ASLI, SAYIN OYA, AKOKAY PINAR, ERGÜR BEKİR UĞUR (2013). Lipoic acid decreases peritoneal adhesion formation in a rat uterine scar model. J Turk Ger Gynecol Assoc. (Yayın No: 5002968)
  10. CİLAKEK MIÇILI SERAP, GÖKER ASLI, SAYIN OYA, AKOKAY PINAR, ERGÜR BEKİR UĞUR (2013). The effect of lipoic acid on wound healing in a full thickness uterine injury model in rats. JOURNAL OF MOLECULAR HISTOLOGY, 44(3), 339-345. (Yayın No: 4400131)

#### B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler :

1. GÜVEN HÜLYA, KALKAN ŞULE, ARICI MUALLA AYLİN, AKAN PINAR, ERGÜR BEKİR UĞUR, Güner Özge, GÜR SOY DORUK ÖZLEM, Aktürk Gözde, AKOKAY PINAR (2019). Protective effects of Hypericum perforatum-Nigella sativa oil and Nigella sativa oil pretreatment on amatoxin induced hepatotoxicity in mice. International Hippocrates Congress on Medical and Health Sciences, 1(1), 1-57. (Tam Metin Bildiri/Poster)(Yayın No:5436152)

#### Diğer Yayınlar

1. ARICI MUALLA AYLİN, ŞAHİN AYNUR, ÇAVDAR ZAHİDE, ERGÜR BEKİR UĞUR, URAL CEMRE, AKOKAY PINAR, KALKAN ŞULE, TUNÇOK YEŞİM (2018). The Effectiveness of Silibinin and Resveratrol in Preventing Alpha-Amanitin-Induced Nephrotoxicity. FEBS Open Bio (Uluslararası) (Hakemli) (MAKALE Özet) (Yayın No: 4748377)