



T.C.

SAĞLIK BAKANLIĞI

TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU

İSTANBUL FATİH BÖLGESİ KAMU HASTANELERİ BİRLİĞİ

GENEL SEKRETERLİĞİ

S.B.Ü. İSTANBUL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

TIBBİ BİYOKİMYA BÖLÜMÜ

Eğitim Sorumlusu: Doç. Dr. Hale ARAL

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hale ARAL

**YAŞA BAĞLI MAKULA DEJENERASYONLU  
OLGULARDA PROKOAGÜLAN AKTİVİTEYE SAHİP  
OLAN MİKRO VEZİKÜL (MPs) FONKSİYONEL  
DÜZEYLERİNİN BİYOBELİRTEÇ OLARAK KLİNİK  
ÖNEMİ**

Dr. Şehide BAZ

TIBBİ BİYOKİMYA UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2017

## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim ve tezi hazırlama süresince bana destek olan, bilgileriyle, deneyimleriyle beni yönlendiren, değerli tez danışmanım ve tıbbi biyokimya eğitim sorumlusu Doç. Dr. Hale Aral'a,

Uzmanlık eğitimim süresince mesleki eğitimime değerli katkıları olan tıbbi biyokimya idari sorumlusu ve eğitim görevlisi Doç. Dr. Berrin Berçik İnal'a,

Bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Şişli Hamidiye Etfal Hastanesi tıbbi biyokimya eğitim sorumlusu Doç. Dr. Erdiñ Serin'e,

Yine uzmanlık eğitimimin 1 yıllık süresi boyunca bilgi ve tecrübelerini bize aktaran Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi tıbbi biyokimya eğitim ve idari sorumlusu Doç. Dr. Macit Koldaş'a,

Hastalarımın toplanması için sürekli işbirliği içinde olan hastanemiz göz kliniğinde başasistan Dr. Özen Ayrancı Osmanbaşıoğlu'na, başasistan Dr. Sezin Erdoğan Özkul'a asistanlığım süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım uzmanlarımız Uzm. Dr. Çiğdem Topkaya, Uzm. Dr. Derya Sönmez, Uzm. Dr. Bağnu Orhan, Uzm. Dr. Hümerya Emre'ye teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma, uzmanlık eğitimi boyunca yanımda olan canım arkadaşım Uzm. Dr. Zeynep Korkmaz'a ve Ast. Dr. Hilal Mercan'a

Tüm destekleri için biricik eşim Dr. Ökkeş Baz'a ve canım aileme teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>TABLolar LİSTESİ</b> .....	<b>v</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>KISALTMALAR</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>x</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. DİYABETES MELLİTUS (DM).....	3
2.1.1. Etiyoloji ve Patogenez .....	4
2.1.2. Diyabetik Retinopatide Epidemiyoloji .....	6
2.1.3. Diyabetik Retinopatide Klinik Sınıflama .....	6
2.1.4. Diyabetik Maküla Ödemi.....	6
2.1.5. Diyabetik Maküla Ödemi Tedavi .....	7
2.2. YAŞA BAĞLI MAKÜLA DEJENERASYONU .....	7
2.2.1. Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu Risk Faktörleri .....	7
2.2.2. Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu Histopatolojisi .....	8
2.2.3. Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonunda Klinik.....	10
2.2.4. Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu Sınıflaması .....	10
2.2.4.1. Kuru Tip (Non-neovasküler) Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu .....	10
2.2.4.2. Yaş Tip (Neovasküler) Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu.....	11

2.2.5.	Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonunda Tedavi.....	11
2.2.5.1.	Anti-VGEF Antikorlar.....	11
2.3.	MİKRO VEZİKÜLLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ .....	12
2.3.1.	Shear Stress ve MPs.....	15
2.3.2.	Tissue Factor ve MPs.....	15
2.3.3.	MPs'ın klinik tanımlanması ve ölçüm yöntemleri.....	16
2.3.4.	MPs RNA türlerini taşır.....	17
2.3.5.	MPs'ın koagülasyondaki rolü .....	18
2.3.6.	MPs ve tromboz .....	19
2.3.7.	MPs ve vasküler inflamasyon .....	20
2.3.8.	MPs ve endotel disfonksiyonu .....	21
2.3.9.	MPs ve anjiyogenik etkileri .....	22
2.3.10.	MPs ve aterotromboz .....	22
2.3.11.	MPs ve diyabetik makrovasküler komplikasyonlar .....	23
2.3.12.	MPs ve mikrovasküler diabetik komplikasyonlar .....	25
2.3.12.1.	MPs ve diyabetik retinopati.....	25
<b>3.</b>	<b>MATERYAL VE METOD .....</b>	<b>27</b>
3.1.	MPs ölçümü .....	29
3.2.	İstatistiksel Analiz.....	33
<b>4.</b>	<b>SONUÇLAR.....</b>	<b>34</b>
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA.....</b>	<b>44</b>
<b>6.</b>	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>50</b>
<b>7.</b>	<b>EK-1.....</b>	<b>56</b>

## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1. Gruplar arasında demografik bulguların, kan basıncı değerlerinin ve sigara/alkol tüketiminin karşılaştırılması.....	35
Tablo 2. Gruplar arasında, laboratuvar bulgularının karşılaştırılması .....	37
Tablo 3. Gruplarda, MPs parametreleri (lag time, ETP, Peak, ttPeak, startTail) ile diğer demografik ve laboratuvar parametreleri arasında saptanan anlamlı korelasyonlar.....	41
Tablo 4. Gruplarda, MPs parametrelerine (lag time, ETP, Peak, ttPeak, startTail) yaşın olası karıştırıcı etkisinin araştırıldığı ANCOVA analiz sonuçları.....	42
Tablo 5. Hasta gruplarında, göz kliniği ölçümleri ile diğer tüm demografik ve laboratuvar bulguları (MPs parametreleri dahil) arasında saptanan istatistiksel anlamlı korelasyonlar.....	43

## ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1. Endotel kaynaklı mikroparçacıklar (EDMP) için fonksiyonel moleküller hedef antijenleri oluşturur..... 13
- Şekil 2. Fosfotidilserinin (PS) transmembran göçüyle, membran hücre-içi tarafından hücre-dışı tarafa geçişi..... 14
- Şekil 3. Tip 2 diyabette görülen ateroskleroz ve trombozda mikroparçacıkların (MPs) rolü..... 26
- Şekil 4. CAT cihazında elde edilen örnek ‘trombogram eğrisi’ ..... 31
- Şekil 5. Mikroplakta ölçüm kuyucuğu ve kalibrasyon kuyucuğuna uygun pipetlemeleri takiben gelişen reaksiyona bağlı Calibrated Automated Thrombography (CAT) cihazında elde edilen çıktılar (eğrilerin), özel bir yazılım programı sayesinde değerlendirilerek elde edilen sayısal verilerden trombin oluşum testi (TGT) parametrelerinin tanımlanması (40)..... 32
- Şekil 6-7-8. MPs parametrelerine (lag time, ttPeak ve startTail) ait Box-Plot çizimleri; ortanca (25.persentil–75.persentil). ..... 39
- Şekil 9-10: MPs parametrelerine (Peak ve ETP) ait bar grafikleri (ortalama±SE) ..... 40

## KISALTMALAR

<b>MPs</b>	: Mikro veziküller, mikropaçacıklar (microparticles)
<b>cDNA</b>	: Komplementer DNA
<b>gDNA</b>	: Genomik DNA
<b>ssDNA</b>	: Tek zincirli DNA
<b>PDMPs</b>	: Trombosit kaynaklı MPs
<b>MDMPs</b>	: Monosit kaynaklı MPs
<b>NDMPs</b>	: Nötrofil kaynaklı MPs
<b>LDMPs</b>	: Lenfosit kaynaklı MPs
<b>EDMPs</b>	: Endotel hücre kaynaklı MPs
<b>PPL</b>	: Prokoagülan fosfolipidler
<b>TF</b>	: Tissue Factor
<b>PPP</b>	: Trombositten fakir plazma
<b>YBMD</b>	: Yaşa bağlı makula dejenerasyonu
<b>RPE</b>	: Retina pigment epiteli
<b>BLD</b>	: Bazal laminar depozitler
<b>KNVM</b>	: Koroidal neovasküler membran
<b>VEGF</b>	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
<b>PDGF</b>	: Platelet kaynaklı büyüme faktörü
<b>TGF</b>	: Dönüştürücü büyüme faktörü
<b>INF<math>\alpha</math></b>	: Alfa interferon,
<b>PEKF</b>	: Pigment epitel kökenli faktör
<b>DM</b>	: Diyabetes mellitus
<b>ETDRS</b>	: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study

<b>NPDR</b>	: Hafif nonproliferatif diabetik retinopati
<b>IGF-1</b>	: İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
<b>IGF-2</b>	: İnsülin benzeri büyüme faktörü 2
<b>FGF</b>	: Fibroblast büyüme faktörü
<b>tip 2 DM</b>	: İnsüline bağımlı olmayan tip 2 DM
<b>tip 1 DM</b>	: İnsüline bağımlı tip 1 DM
<b>IRMA</b>	: İntraretinal mikrovasküler anormallikler
<b>HT</b>	: Hipertansiyon
<b>GP Ib/IX</b>	: Platelet membran glukoprotein Ib/IX
<b>GP IIb/IIIa</b>	: Platelet membran glukoprotein IIb/IIIa
<b>SMC</b>	: Düz kas hücreleri
<b>LC-MS</b>	: Tandem kütle spektrometrisiyle birleştirilmiş sıvı kromatografisi
<b>PS</b>	: Fosfatidilserin
<b>TNF</b>	: Tümör nekroz faktörü
<b>TFPI</b>	: Doku faktörü yol inhibitörü
<b>FSS</b>	: İleri ışık saçılımı (akan hücre ölçer yöntemlerinden)
<b>ELISA</b>	: Enzim bağılı immunosorbent assay
<b>F</b>	: Faktör
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>PSGL-1</b>	: P-selektin glikoprotein ligandı-1
<b>HUVEC</b>	: İnsan umbilikal ven endotel hücre yüzeyi
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>KAH</b>	: Koroner arter hastalığı
<b>NO</b>	: Nitrik oksit



<b>NOX</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz
<b>AGE</b>	: İleri glikasyon son ürünleri
<b>MCP -1</b>	: Monosit chemoattractant proteini 1
<b>CRP</b>	: C-reaktif protein
<b>BCVA</b>	: En iyi düzeltilmiş görme keskinliği
<b>logMAR</b>	: Logarithm of the minimum angle of resolution or recognition
<b>OKT</b>	: Optik kohorens tomografi
<b>CMT</b>	: Merkezi maküla kalınlığı
<b>TGT</b>	: Trombin oluşum testi (thrombin generation test)
<b>CAT</b>	: Calibrated Automated Thrombografi cihazı
<b>ttPeak</b>	: Time to trombin Peak
<b>ETP</b>	: Endojen trombin potansiyeli
<b>BMI</b>	: Beden kitle indeksi
<b>SKB</b>	: Sistolik kan basıncı
<b>DKB</b>	: Diastolik kan basıncı
<b>SVO</b>	: Serebrovasküler olay
<b>İKH</b>	: İskemik kalp hastalığı
<b>HT</b>	: Hipertansiyon

## ÖZET

Mikro Vezikül (Microparçacıklar: MPs), hücre aktivasyonu veya apoptoz sırasında hücre membranından ekzositozla oluşan, prokoagülan özelliği bulunan, küçük membran vezikülleridir.

Yaş tip yaşa bağlı makula dejenerasyonunda (YBMD) neovaskülarizasyon görülür ve göz-içi anti-Vascular Endothelial Growth Factor (anti-VEGF) tedavi vasküler büyümede supresyona neden olmaktadır. İçinde bulunduğumuz laboratuvar koşullarında, yaş tip YBMD olgularda plazma MPs fonksiyonel düzeylerinin biyobelirteç olarak klinik değerinin araştırılmasını amaçladık.

Göz hastalıkları polikliniklerinde izlenmekte olan hastalar çalışmaya alınmıştır. Hastalık ve ilaç/sigara/hastalık öyküsü, demografik bilgiler, bel çevresi, boy-ağırlık, kan basıncı ölçümleri ve göz kliniği ölçümleri kaydedilmiştir. Plateletten fakir plazma (PPP) örnekleri -80°C’de hemen dondurulmuştur.

Tüm olgular 4 gruba ayrılarak incelenmiştir; grup-1 (kontrol grubu): diyabetik olmayan sağlıklı bireyler (N=37); grup-2: diyabetik retinopati tanısı almış hastalar (N=40); grup-3: kuru tip yaşa bağlı makula dejenerasyonu tanısı almış hastalar (N=41); grup-4: yaş tip yaşa bağlı makula dejenerasyonu tanısı almış hastalar (N=40).

Rutin biyokimya testlerine ilaveten, mikroparçacıklar trombin oluşum yöntemiyle Calibrated Automated Thrombography (Stago Diagnostics, Fransa) cihazında fonksiyonel olarak belirlenmiştir.

Günümüzde, trombin oluşumunun değerlendirilmesi çeşitli hemostatik bozukluklar için tarama, tanı ve tedavi takibinde çok yararlı bir araç olarak görülmektedir. Elde edilen ‘trombogram eğrisi’ zaman içerisinde oluşan thrombin miktarını gösterir, bu sayede çok sayıda yararlı parametreler sağlanır, biz bunlardan beşini değerlendirdik; *lag time* (dakika), *endojen thrombin potansiyeli (ETP)* olarak bilinen eğrinin altında kalan alan (nmol/L•dakika), *Peak yüksekliği* (nmol/L), tepe yüksekliğine gelme süresi olan *ttPeak* (dakika), eğrinin tamamlandığı süre *startTail* (dakika).

Çalışmamızda, diyabetiklerde BMI değerleri, kontrol olgulardan daha yüksek ve ETP değerleri daha düşük bulundu. Hastaların obezite derecesi veya diyabet durumu (yaşı) buna yol açmış olabilir. DM hastalarda görülen hiperaktif platelet fenotipine yol açan çok sayıda mekanizma bulunmaktadır.

Yaş tip YBMD olgularında, inflamasyon zemininde MPs fonksiyonel düzeylerini ölçtük ve TGT parametrelerinden üçü (ETP, Peak, statTail) ile serum CRP değerleri arasında korelasyon görüldü. Yine yaş tip YBMD olgularında göz kliniği ölçüm parametreleri ile MPs parametreleri arasında ilişki bulundu. MPs fonksiyonel düzeyleri için kritik değerlerin belirlenmesinde ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar kelimeler:** trombin oluşum testi; mikroparçacıklar; mikro veziküller; anjiogenezis; neovaskülarizasyon; yaşa bağlı makula dejenerasyonu; diyabetik retinopati

## ABSTRACT

Micro vesicles (Microparticles: MPs) with procoagulant properties are small membrane vesicles composed by exocytosis during cell activation or apoptosis.

Neovascularization is seen in wet type age-related macula degeneration (AMD), and intraocular anti-Vascular Endothelial Growth Factor (anti-VEGF) therapy is used to suppress vascular growth. We aimed to investigate whether determination of plasma MPs functional levels have any clinical value as a biomarker for neovascularization in wet type AMD, in our laboratory conditions.

Patients followed up at our ophthalmology out-patient clinics were included our study. Data including drug/smoking/illness history, demographic information, waist circumference, height-weight, blood pressure measurements and ophthalmic measurements were all recorded. Platelet poor plasma (PPP) samples were stored immediately at -80°C.

All the cases were investigated in four different groups; group 1 (control group): non-diabetic healthy individuals (N=37); group 2: patients diagnosed diabetic retinopathy (N=40); group 3: patients diagnosed dry type AMD (N=41); group 4: patients diagnosed wet type AMD (N=40).

In addition to the routine biochemistry tests, microparticles have been detected functionally using thrombin generation method at Calibrated Automated Thrombography (Stago Diagnostics, France).

The assessment of thrombin generation is currently regarded as a useful tool for screening, diagnosis, and therapeutic monitoring of a variety of hemostatic disorders. The resulting 'thrombogram curve' expresses the amount of thrombin generated over time, and also provides several useful parameters, we used five of them; *the lag time* (minute), and the area under the curve (nmol/L•minute), which is conventionally referred to as *endogenous thrombin potential (ETP)*, *the Peak height* (nmol/L), the time to peak: *ttPeak* (minute), the time of the completion of the curve *startTail* (minute).

In our study, diabetics had significantly higher BMI values than controls and less ETP values than controls. The differences in the degree of obesity or diabetic status (age)

of patients would be causative factors. Several mechanisms are involved in the hyperreactive platelet phenotype characterizing DM patients.

We measured MPs functional levels under inflammatory status, and found significant correlation between three TGT parameters of ETP, Peak, statTail and serum C-reactive protein levels in wet type AMD. There was also correlation between the ophtalmological parameters and MPs parameters in wet type AMD. Further investigations are needed to estimate critical values of MPs functional levels.

**Key words:** thrombin generation test; microparticles; micro vesicles; angiogenesis; neovascularization; age related macula degeneration; diabetic retinopathy

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mikro Vezikül (Mikroparçacıklar: MPs), hücre aktivasyonu veya apoptozla hücre membranının dışarı doğru oluşturduğu baloncukların (ekzositotik tomurcuklanma) membrandan ayrılmasıyla oluşan küçük membran vezikülleridir. MPs çekirdeksiz olup, lipid, protein RNA, cDNA (komplementer), gDNA (genomik), ssDNA (tek zincirli) taşıyabilmektedir; adeta hücreler arası kargo aracı gibi görev yapmaktadırlar (1).

Dolaşımdaki MPs genellikle trombosit kaynaklıdır (PDMPs), ancak eritrosit, lökosit (monosit kaynaklı MPs: MDMPs; nörofil kaynaklı MPs: NDMPs; lenfosit kaynaklı MPs: LDMPs), endotel hücrelerden (EDMPs), düz kas hücresi ve kanser hücrelerinden de salınabilir. Başta fosfolipidlerin olmak üzere yüzeylerinde taşıdıkları negatif prokoagülan fosfolipidler (PPL) ve doku faktörü (Tissue Factor - TF) nedeniyle prokoagülan aktivite gösterirler. MPs birim yüzey alanı, aktive edilmiş trombosit birim yüzey alanına göre 50 ila 100 katı daha yüksek prokoagülan özellik taşımaktadır. MPs vasküler fonksiyonu etkiler, vasküler hemostazda yer alan biyolojik yanıtlara yol açar (trombotik hastalıklar, inflamasyon, hücre aktivasyonu ve fonksiyon bozukluğu, angiogenezis, hücre taşıma) (2).

Diyabetik retinopati olgularında, akan hücre ölçer (flow cytometry) ile yapılan çalışmalarda MDMPs ve PDMPs varlığı gösterilmiştir. Diyabetiklerde yapılan diğer bir çalışmada, MPs varlığı ve artışı vasküler komplikasyonlarla ilişkilendirilmiş ve biyobelirteç olarak kullanılması önerilmiştir. Ancak, MPs'ın elektron mikroskopi ile görüntülediği bir diğer çalışmada, membran yüzey antijenleriyle MPs belirlemeye dayalı akan hücre ölçer yöntemiyle bu veziküllerin sadece %1'nin saptanabildiği belirtilmiştir (3).

Son yıllardaki araştırmalara göre; MPs, vasküler tromboz, vasküler inflamasyon, anjiyogenez, plak parçalanması ve diğer patolojik süreçlere arabuluculuk ederek, diyabetik vasküler komplikasyonun gelişmesine katkıda bulunabilmektedirler. Dahası, MPs aynı zamanda diyabetik komplikasyonlarda yeni bir terapötik hedef olabilir. Bu bağlamda, ilgili vasküler komplikasyonların tanı, prognoz ve tedavi yanıtının değerlendirilmesinde MPs'ın potansiyel biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir.

Yaş tip yaşa bağlı makula dejenerasyonunda (YBMD) neovaskülarizasyon görülür ve göz-içi anti-Vascular Endothelial Growth Factor (anti-VEGF) tedavi vasküler büyümede supresyona sebep olarak etki gösterir. Vasküler hemostazda yer alan biyolojik yanıtı yol açan MPs fonksiyonel düzeylerinin, yaş tip YBMD olgularda neovaskülarizasyonla ilişkisinin gösterilmesinde biyobelirteç olarak klinik önemine dair yapılmış çalışmaya literatürde rastlamadık.

Çalışmamızda, trombositten fakir plazma (PPP) rneklerin eldesi/saklanması ve kullandığımız reaktiflerle ilgili olarak mevcut laboratuvar koşullarında elde edilecek trombin oluşum test parametreleriyle ölçülecek plazma MPs prokoglan fonksiyonel düzeylerinin (aktivitenin), neovasklariasyon görülen yaş tip YBMD olgularda klinik değerinin araştırılmasını amaçladık. Bu amaçla, kontrol grupları olarak sağlıklı bireyler, diyabetik retinopatili olgular ve kuru tip YBMD olguları seçilerek, tüm olguların demografik, antropometrik, göz kliniği ölçümleri ve laboratuvar bulguları kıyaslandı.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. DİYABETES MELLİTUS (DM)

Diyabetes Mellitus (DM) tüm dünyada en sık rastlanan endokrin hastalıktır. Endojen insülinin mutlak veya göreceli yetersizliği veya periferik etkisizliği sonucu ortaya çıkar. Kronik hiperglisemi, karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklar, kapiller membran değişiklikleri ve hızlanmış ateroskleroz ile seyreden bir sendromdur (4).

Diyabetes Mellitus hastalığının değişik toplumlarda görülme sıklığının %1-2 olduğu belirtilmektedir. Diyabetik retinopati ciddiyetini göstermede en iyi belirteç hastalığın süresidir (diyabet yaşıdır). Beş yıldan az süreli tip 1 DM'da retinopati sıklığı nadirdir; buna karşın, 5-10 yıl tip 1 DM olanların %27'sinde, 10 yılı aşanların %71-90'ında diabet retinopatisi mevcut olup, 20-30 yıl sonra insidans %95'e yükselir ve bu hastaların %30-50'sinde proliferatif diyabetik retinopati (PDR) gelişir (5).

Diyabetik retinopati, "Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS)" çalışmalarında, yapılan tedavilere rağmen görme keskinliği kaybı sebebi olmayı sürdürmektedir. Özellikle makülopati, diyabetiklerde görme keskinliği azalmasının en sık nedenidir. Diyabete bağlı makülopatiler içinde de en sık görme keskinliği kaybı sebebini 'diyabetik maküla ödemi' oluşturur. Retinopatinin ciddiyetine bağlı olarak maküla ödemi sıklığı da artmaktadır. Hafif nonproliferatif diyabetik retinopati (NPDR)'de %3, orta/ciddi NPDR'de %38, PDR'de %71 oranında maküla ödemi bildirilmiştir. Diyabetik maküla ödemi tedavisi üzerindeki çalışmalar 1970-1990 yılları arasında laser tedavisi ve aldoz redüktaz inhibitörleri üzerinde yoğunlaşmıştır ve son yıllarda triamsinolon asetonidin



intravitreal uygulamasının diffüz maküla ödemi üzerindeki etkinliği üzerine çalışmalar hızla artmıştır (6).

### **2.1.1. Etiyoloji ve Patogenez**

Diyabetiklerde, özellikle insuline ihtiyaç duymadan glukozu alabilen dokularda (vezikula seminalis, sinir dokusu, lens ve kornea) aldoz redüktaz aktivitesi artmıştır. Bu dokularda sorbitol ve galaktitol hücre duvarından diffüze olamadığı için hücre içinde birikmeye başlar, böylece ozmotik kuvvetler ve elektrolit dengesizlikleri ile hücre şişmeye başlar, bu olayın doğal sonucu olarak hücre duvarı zarar görür. Bu mekanizma deneysel diyabetik hayvanlardaki kataraktlarda, gerçek diyabet kataraktında ve galaktozemili çocuklardaki kataraktan da sorumludur (6).

Yapılmış bir çalışmada, yüksek glukoz içeren ortamdaki endotel hücrelerinin normalden daha fazla bazal membran materyali sekrete ettikleri bulunmuştur (7). Retinal kapillerlerin hücre iskeletini endotel hücreler ve perisitler oluşturur. Aldoz redüktaz retina perisitlerinde, schwann hücrelerinde de bol miktarda bulunmaktadır. Damar duvarının yapısal bütünlüğünü sağlayan perisitler, kapiller endotel hücreleri ile birlikte iki hücre arasındaki sıkı bağlantıları, kan-retina bariyerini oluşturur. Kontraktiliteleri dolayısıyla da perisitler kapillerlerin çaplarına da etki ederler. Sağlıklı damarlarda her bir endotel hücrelerine karşılık bir perisit bulunur (8).

Bir çalışmada perisit ve endotel hücrelerinin direkt temasının endotel hücre proliferasyonunu engellemekte önemli bir faktör olduğu ileri sürülmüştür (9). Diyabetik hastalarda perisit hücrelerindeki dejenerasyon, fonksiyon bozukluğu, endotel hücrelerinden bazal membran materyali aşırı sekresyonu sonucu damar duvarlarında zayıflıklar, anormal dilatasyonlar, anormal hücre proliferasyonları oluşur. Kapiller lümenler eritrosit agregasyonları ve trombüs ile tıkanır (8). Defektli oksijen transportu sonucu oluşan hipoksi ve kronik hiperglisemi, perisit ve endotel hücrelerinin otonom regülasyon mekanizmasını da etkileyerek olayı kısır döngü haline getirmektedir. Kötü kontrollü diyabetiklerde 2-3 difosfoglisirik asit seviyesi düşmekte, glikolize hemoglobin artmakta ve bu iki faktör hemoglobinden dokuya oksijen geçişini azaltmaktadır. Bunun dışında eritrositlerin

vizkozite özelliğinin artması, deforme olabilme özelliğinin azalması hipoksiyi daha da derin hale getirir (10).

Retinal kan akımı lokal doku ihtiyacına göre, oto regülatuar bir mekanizma ile ayarlanmaktadır. Bir takım deneyler hipergliseminin retinal kan akımını arttırdığını göstermiştir (11). Doku hipoksisi durumunda vasküler yatakta dilatasyon olur ve kompensasyon mekanizmaları retina kan akımını artırır.

Hipoksik retinanın cevabı iki türlü olur; birinci cevap, beslenemeyen alanları kanlandırmak için normalde bulunmayan kollaterallerin damarlar oluşturması, ikinci cevap ise hipoksik retinadan açığa çıkan maddelerin yeni damar oluşumunu (neovaskülarizasyonu) başlatmasıdır (11).

Neovaskülarizasyon ile proliferasyon aşamasına geçilmiş olur. Neovaskülarizasyon mekanizması tam olarak anlaşılmış değildir. Patogenezden sorumlu faktörler retina damarlarından, retina pigment epitelinden ve retinanın kendisinden salınır. Anjiogenezis VEGF, platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) ve anjiotensin tarafından uyarılmakta, alfa interferon ( $INF\alpha$ ), anjiostatin ve endostatin tarafından baskılanmaktadır. VEGF, PDR'nin gelişiminde önemli rolü olan bir büyüme faktörüdür ve diyabette retina perfüzyon bozukluğuna katkıda bulunur. VEGF'nin retina perisit ve endotel hücrelerinde spesifik bağlanma reseptörleri bulunur. Bu reseptörlerin inhibisyonu neovaskülarizasyonu baskılar. Deneysel olarak VEGF'nin vitreus içine verilmesi retinada iskemi ve mikroanjiyopati oluşturmaktadır. Erken diyabetik retinopati evresinde VEGF sentezi artmakta, fotokoagülasyon sonrası bazal düzeye geri dönmektedir. VEGF'den başka PDR patogenezinde rol oynayan PDGF, retina pigment epiteli (RPE) hücre ve glial hücre göçü ve proliferasyonunu uyararak mikrovasküler yapıda anjiogenezise katkıda bulunur. Yapılan araştırmalarda PDR'li hastaların vitreusunda VEGF, NPDR'li hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (12). Diğerleri İnsülin benzeri Büyüme Faktörü I (IGF-II), İnsülin benzeri Büyüme Faktörü II (IGF-II) ve Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)'dür.

### **2.1.2. Diyabetik Retinopatide Epidemiyoloji**

Toplumlara göre değişmekle birlikte ortalama %1-2 sıklıkta görülmektedir. Diyabet hastalarının büyük çoğunluğu insüline bağımlı olmayan tip (DM tip 2) olup, popülasyonun %85-90'ını oluştururken %10-15'ini de insüline bağımlı tip (DM tip 1) oluşturur. Tip 1 DM'a genellikle 40 yaşı altında tanı konur. Bu popülasyon daha ciddi oküler komplikasyon geliştirme eğilimindedir. Her ne kadar tip 2 DM'lı hastalar komplikasyon açısından şanslı olsalar da uzun süreli hastalık, komplikasyonu kaçınılmaz kılmaktadır. Klinik tedaviler, ciddi vizyon kayıplarını minimize etmeyi, hastaların yaşam kalitelerini korumalarını sağlamayı amaçlamaktadır (13).

### **2.1.3. Diyabetik Retinopatide Klinik Sınıflama**

1976 yılında Airlie House Sempozyumu ile diyabetik retinopatinin ilk sınıflaması yapıldı. Buna göre diyabetik retinopati zemin (background) ve proliferatif olmak üzere 2 kısma ayrılıyordu. ETDRS grubuna göre ise diyabetik retinopati aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır (13);

NPDRP; hafif NPDR; orta NPDR; orta-hafif NPDR, ciddi NPDR, çok ciddi NPDR.

PDR; başlangıç PDR (erken), yüksek riskli, ileri PDR, involüsyonel PDR.

### **2.1.4. Diyabetik Maküla Ödemi**

Perisitlerin kaybı, mikroanevrizmaların gelişimi, bazal membran kalınlaşması ve preterminal kapiller arteriollerin tıkanması şeklinde gelişen patofizyolojik basamaklar, sonuçta kan retina engelini yıkımına ve damar geçirgenliğinde artışa neden olmaktadır. Artmış damar geçirgenliğine bağlı olarak yüksek miktarda su tutan mukopolisakkaritler ve lipoproteinler hücreler arası boşluğa geçerek retinal kalınlaşmaya yol açmaktadırlar. Ayrıca iskemi sonucunda gelişen hücresel harabiyet, sitotoksik etki ile maküla ödeme katkıda bulunmaktadır (14,15). Birçok sistemik ve lokal faktörler diyabetik maküla ödemi gelişimini ve seyrini etkileyebilmektedir. Sistemik faktörlerin başında diyabetin yaşı ve kontrol derecesi (hemogloblin A1c gibi) ve hipertansiyon gelmektedir. Total ve düşük yoğunluklu kolesterol düzeylerinde artma özellikle sert eksuda gelişimi ile ilişkili bulunmuştur. Gebelik, özellikle hipertansiyon ve proteinüri ile birlikte ise, yaygın kapiller

beslenme bozukluğunun eşlik ettiği maküla ödemeine yol açabilmektedir (16). Gebeliğin yol açtığı maküla ödemi, sıklıkla gebeliğin sonlarına doğru veya doğumdan sonra kendiliğinden kaybolabilmektedir. Maküla ödemi patogeneğinde etkili lokal faktörlerin başında vitreomaküler çekintiler ve arka hiyaloidin kalınlaşması gelmektedir (17). Maküla ödemi başlıca fokal ve diffüz olarak iki şekilde görülmekle birlikte, sıklıkla kombinasyon şeklinde ortaya çıkmaktadır.

### **2.1.5. Diyabetik Maküla Ödemi Tedavi**

Diyabetik maküla ödemi tedavisinde fokal/grid lazer, intravitreal kortikosteroidler ve intravitreal anti-VEGF tedavi yaklaşımları kullanılmaktadır. Diyabetik maküla ödemi etyolojisi tam aydınlatılmamış olmakla beraber, patogeneğinde en sık sorumlu tutulan VEGF'lere yönelik anti-VEGF tedavi en sık kullanılan tedavidir. Anti-VEGF ajanlardan ranibizumab ve bevacizumab, bütün VEGF-A izoformlarını bağlayan antikorlardır. Son zamanlarda klinik kullanıma giren aflibersept rekombinant bir proteindir ve tüm VEGF formalarını ve parçalarını bağlar (18,19).

## **2.2. YAŞA BAĞLI MAKÜLA DEJENERASYONU**

YBMD, gelişmiş toplumlarda kalıcı görme kaybının en sık nedenidir. Topluma dayalı yapılan çalışmalarda YBMD prevalansı değişiklik göstermektedir (20). Tüm çalışmalarda YBMD prevalansı yaşla birlikte artış göstermektedir.

### **2.2.1. Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu Risk Faktörleri**

YBMD'da bilinen tek kesin risk faktörü yaştır ve ilerleyen yaşla birlikte YBMD riski artmaktadır. Kopenag Göz Kliniği tarafından yapılan çalışmada YBMD prevalansı 60-64 yaş arasında % 2,3, 65-69 yaş arasında % 5,9, 70-74 yaş arasında % 12,1, 75-80 yaş arasında % 27,3'tür. YBMD, çeşitli ırklarda değişiklik göstermektedir. Bazı toplumlarda coğrafik atrofi daha sık görülürken, bazı toplumlarda neovasküler YBMD daha sık görülmektedir ve bu değişikliğin nedeni tam olarak bilinmemektedir (21).

Kadınlarda, 75 yaş ve üzerinde erkeklere oranla erken YBMD'nin iki kat, geç YBMD'nin yedi kat daha fazla görüldüğü bilinmektedir. Menopoz sonrasında kadınlarda

östrojen hormonunun koruyucu etkisinin ortadan kalkmasının YBMD gelişiminde etkili olduğu düşünülmektedir (22).

Yapılan klinik çalışmalarda beyaz ırkta zencilere oranla neovasküler YBMD daha sık görülmektedir (23). Bu durum, zencilerdeki melanin pigmentinin, serbest radikalleri temizleme etkisi veya pigment epitelini, Bruch membranını, koroidi ve dış retinayı predispozan faktörlere karşı koruyucu etkisi ile açıklanmaktadır.

Yapılan çalışmalar, sigara kullanımının YBMD'nin herhangi bir formu için tartışmasız bir risk faktörü olduğuna işaret etmektedir. Risk faktörleri içinde engellenebilir olanların arasındadır (24). YBMD ile sigara arasında içilen paket yıla bağımlı olan bir ilişki mevcuttur. Sigara içimini bıraktıktan sonra risk giderek azalır (25).

### **2.2.2. Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu Histopatolojisi**

Artan yaşla birlikte RPE'nin bazal yüzeyinin altında materyal birikimi sonucu bruch membranında kalınlaşma görülür (26). Koroid, bruch membranı ve RPE'de minimal semptomlarla ortaya çıkan değişiklikler normal yaşlanmanın belirtisidir fakat YBMD'de bu yapılarda santral görme kaybı şeklinde kendini gösteren özgül patolojiler izlenir.

YBMD'de ilk morfolojik bulgu RPE altında anormal ekstraselüler madde birikimidir. Bazal *laminar* depozitler (BLD; içeriği: granüler elektron-yoğun maddeler, pıhtılaşmış membranlar ve fibröz kollajenler) ve bazı çalışmalarda bazal *lineer* depozitler, RPE'nin hücre plasma membranı ve onun bazal membranı arasında birikmeye başlar. Bu depozitler oftalmoskopik olarak izlenemezler ancak retinanın fonksiyon bozukluğuna ve geç fazda anjiografik değişikliklere neden olurlar. Bazal laminar ve lineer madde birikimi yumuşak 'druzen' gelişimine neden olur. Druzen, YBMD'nin ikinci bulgusu olup oftalmoskopik muayenede ilk kanıttır (27). Yumuşak druzen, histolojik olarak Bruch membranının iç kısmının anormal kalınlaşmasına karşılık gelir. Klinik olarak yumuşak druzen, RPE'nin altında lokalize sınırları belirgin olmayan, sert druzenden daha büyük (>63µm), sarı-gri renkte lezyonlardır. Yumuşak druzen RPE seröz dekolmanına neden olabilir ve koroid neovasküler membran (KNVM) gelişiminde rol oynar (28).

Neovasküler doku ve diskiform skarlar, eksudatif ya da yaş tip YBMD'nin bulgularıdır. KNVM'nin büyümesi etyolojik nedenlerden bağımsız olarak makülanın dış nükleer tabakasında ve RPE'de anjiogenik büyüme faktörlerinin artması ile ilişkilidir (29). Hastalığın gelişim sürecinde en büyük risk faktörünün yaşlanma olduğu bilinmektedir ancak neovasküler YBMD'nin patogenezi henüz tam açıklanamamıştır. Histopatolojik çalışmalarda YBMD'de KNVM yakınında koroidde iskemi alanları görülmüştür, buna cevap olarak geride kalan RPE hücreleri KNVM büyümesine yol açan birçok madde üretmektedir (30). KNVM baskın olarak koryokapillaristen kaynaklanır ve bruch membranının iç kısmındaki hücreler aralıklardan RPE altı ve retina altı alanlara yürür (26). KNVM gelişiminde BLD ve bazal lineer depozit birikimi sorumlu tutulmuştur. Biriken depozit ve lipidler, RPE'den köken alan büyüme hormonunun Bruch membranına doğru geçişine neden olurlar. Bu uyarılma sırasında yeni damar oluşumunu tetikleyici VEGF ve yeni damar oluşumunu inhibe edici Pigmet Epitel Kökenli Faktör (PEKF) olayla ilişkilidirler (31).

Anjiogenezin başlangıcında, kapiller duvar endotel hücreleri arasında oluşan boşluklar ve endotel hücrelerinde pencereler, kapillerler plazma proteinlerine ve fibrinojene geçirgen hale gelirler. Fibrinojen pıhtılaşması fibrin oluşumuna neden olmakta ve yeni büyüyen damarlara destek matriks olarak görev yapmaktadır. Sonrasında vasküler yatak içinde endotel hücreler proliferer olur ve lümen formasyonu oluşur. İnce duvarlı, perisitten fakir gelişen kapillerler, yeni membran oluşturmaya başlar (32).

Bruch membranında yaşa bağlı değişikliklerin gelişimi sırasında koroid kan akımında değişiklikler, oksijen difüzyonunda azalma ve iskemi görülmektedir. Druzenin üzerindeki RPE'de iskemi görülmesi VEGF salınımını tetiklemekte ve KNVM formasyonuna neden olmaktadır. Gelişen neovaskülarizasyonda tek etkenin iskemi olmadığı, gelişen dokunun histopatolojisi incelendiğinde lenfosit, makrofaj, yabancı cisim dev hücreleri gibi inflamatuvar hücrelerin bulunduğu gösterilmiştir. YBMD'de görülen KNVM'nin histopatolojisinde granülasyon dokusuna benzer veya yara iyileşmesine benzer görünüm olmaktadır (33).

### **2.2.3. Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonunda Klinik**

Hastaların başvuru anındaki semptomları sıklıkla görme keskinliğinde azalma, santral skotom ve metamorfopsidir. Daha az görülen bulgular ise kontrast duyarlılıkta azalma, renkli görmeye azalma, fotopsi ve artmış kamaşma duyarlılığıdır. Neovasküler YBMD'nin erken tanısında düzenli göz kontrolleri ve Amsler grid kartının kullanımı önemlidir. Çizgilerde düzensizlik ve eğrilme, çizgilerin renklerinde değişiklikler veya merkezdeki noktaya odaklayamama gibi bulgular neovasküler YBMD düşündürülen bulgular olabilir.

### **2.2.4. Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu Sınıflaması**

1. Non-neovasküler: Atrofik form (kuru tip) YBMD'li olguların %80-90'ı ve ağır görme kayıplı olguların % 10'unu oluşturur.
2. Neovasküler: Koroid neovaskülarizasyon (yaş tip) YBMD'li olguların % 10' u ve ağır görme kayıplı olguların % 90'ını oluşturur.

#### **2.2.4.1. Kuru Tip (Non-neovasküler) Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu**

YBMD'nin erken bulgusu olarak kabul edilen druzen çok sayıda, sarı renkli, hafif kabarık, değişik büyüklükteki birikintilerdir. Beaver Dam çalışmasında 43-86 yaş arasındaki populasyonun % 95,5'inin en az bir gözünde bir veya daha fazla druzen olduğu görülmüştür. Bütün yaş gruplarında en çok görülen druzen tipi sert druzendir. Yumuşak druzen 43-54 yaş arasında % 1,9, 75 yaş üzerinde % 24 olarak görülmüştür. Druzen zamanla beyazlaşabilir, kenarları keskinleşebilir, pigment birikebilir, kalsifiye olabilir veya gerileyebilir, yerinde incelmış RPE veya coğrafik atrofi alanları ortaya çıkabilir (34). Kuru tip YBMD'de ana patoloji fotoreseptör ve koroid arasına yerleşmiş olan filamenter epitelyal hücre tabakasından oluşan RPE'de görülen fonksiyon kaybıdır. RPE, lipidden zengin olan fotoreseptör dış segment geri dönüşümünde önemli rol almaktadır. RPE hücrelerinin normal fizyolojik gücünün azalması sitotoksik boyutlarda lipofusin, lipidden zengin pigment granüllerinin oluşmasına sebep olmaktadır. Kuru tip YBMD'de görme kaybı ve hastalık ilerlemesi yaş tipe göre daha yavaştır.

#### **2.2.4.2. Yaş Tip (Neovasküler) Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu**

Neovasküler YBMD, anormal kan damarları, RPE'nin seröz veya hemorajik dekolmanı, lipid sızıntıları ve diskiform skar oluşumu ile karakterizedir. Koroid kaynaklı anormal kan damarlarının bruch membranını geçerek nörosensoriyel retina altında ve içerisinde gelişmesi KNVM olarak tanımlanmakta ve YBMD ile ilişkili görme kayıplarının hemen hemen % 90'ından sorumlu tutulmaktadır. Koryokapillaristen kaynaklanan, KNVM'ye ait besleyici damar Bruch membranını geçtiğinde neovasküler ağ RPE'nin altında veya üzerinde yatay planda yayılmaktadır. Bu yeni damarlar ve bunlara eşlik eden fibroblastlar, fibrovasküler bir kompleks oluşturur ve semptomlar oluşur (35). Oftalmoskopik olarak gri-yeşil subretinal kabarıklık, subretinal hemoraji ve lipid KNVM oluşumuna işaret eder.

#### **2.2.5. Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonunda Tedavi**

Kuru tip YBMD için halen etkinliği kanıtlanmış bir tedavi bulunmamaktadır. YBMD'nin önlenmesi ve ilerlemesinin yavaşlatılması için risk faktörleri de göz önüne bulundurularak; sağlıklı bir yaşam biçimi sürdürmek, sigarasız yaşam, düzenli egzersiz, kilo/tansiyon/kolesterol kontrolü, diyetle yağı ve şekeri azaltıp, sebze/ceviz/meyve tüketimiyle birlikte haftada 1-2 kez balık alımı önerilmelidir. Ancak erken evre YBMD saptandığında 10 mg/gün lutein ve 500-1000 mg/gün omega-3 alımı uygun görülürken, bir gözde ileri evre YBMD varlığında yoğun antioksidan desteği gündeme gelebilir (35).

Yaş tip YBMD tedavisi için günümüzde gittikçe artan tedavi seçeneklerine karşın, henüz hastalığın tam tedavisi bulunamamıştır. Günümüzde en popüler tedavi seçeneği göz içi uygulanan anti-VEGF enjeksiyonlardır.

##### **2.2.5.1. Anti-VEGF Antikorlar**

*Bevacuzimab*, insan VEGF-A'nın tüm izoformlarını nötralize etmek için tasarlanmış ve fare epitoplarnın insana uyarlanması ile fareden VEGF'e karşı elde edilmiş monoklonal antikordur (IgG). *Bevacuzimab*, yaş tip YBMD olgularında önce sistemik olarak kullanılmış ve faydaları görülmüştür. Sonraki dönemde intravitreal uygulanmaya

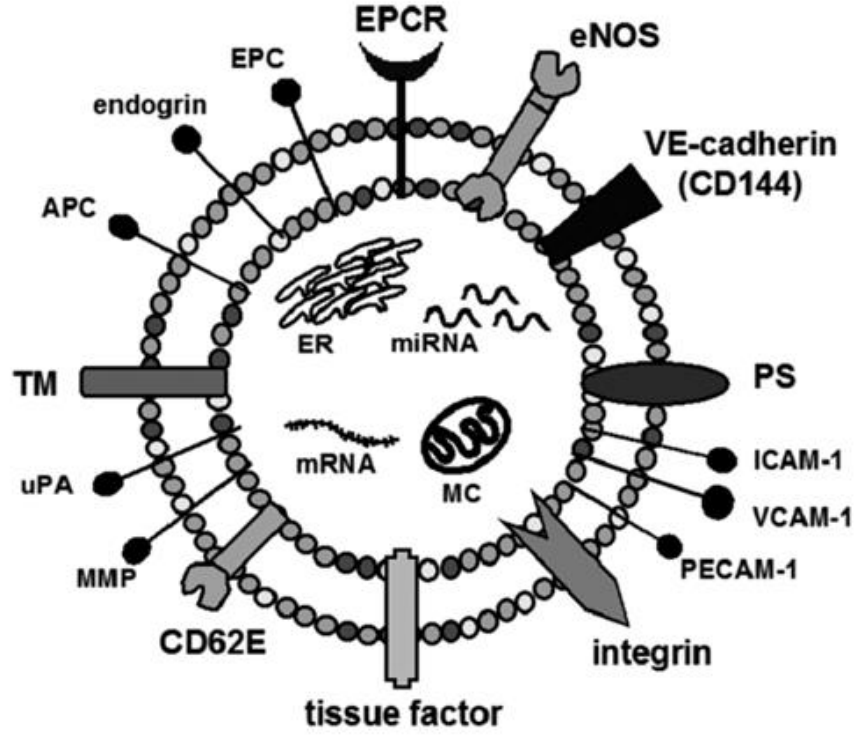


başlanmıştır. Yapılan çalışmalarda vitreus içi bevacuzimab uygulanmasının görme düzeylerini anlamlı olarak arttırdığı gösterilmiştir (36).

*Ranibizumab*, rekombinant monoklonal antikor teknolojisi ile üretilen, VEGF'nin bütün izoformlarına bağlanabilen insan anti-VEGF antikor fragmanıdır. VEGF'nin inhibisyonuyla etki gösterir. Ranibizumab'ın YBMD'li olgularda etkinliğini değerlendirmek üzere birçok klinik araştırma yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda intravitreal ranibizumab uygulanımı fotodinamik tedavi ile karşılaştırılmış, ranibizumab tedavisi alan hastalarda hem görme kaybı anlamlı olarak daha az olduğu, hem de görme artışının anlamlı olarak daha çok olduğu görülmüştür (37). Son yıllarda VEGF'in bütün izoformlarını inhibe eden, anti-VEGF bir molekül olan *aflibercept* de yaş tip YBMD tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (38).

### **2.3. MİKRO VEZİKÜLLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ**

MPs, hücrel aktivasyona veya apoptoza yanıt olarak plazma membranının ekzositotik tomurcuklanmasıyla birçok farklı hücre tipinden salınan küçük zar vezikülleridir. MPs, ana hücrelerden çıkan çeşitli biyoaktif efektörleri yayarlar. Bu nedenle, MPs vasküler fonksiyonu değiştirebilir ve vasküler homeostaz ile ilgili biyolojik yanıtları indükleyebilir. Kandaki çoğu MPs, PDMPs'dan kaynaklanmaktadır. PDMPs'dan GPIIb / IIIa veya GPIb / IX gibi çeşitli glikoproteinleri (GP'ler) içerir. MPs ayrıca lökositler, eritrositler, endotel hücreleri (Şekil 1), düz kas hücreleri (SMC) ve kanser hücrelerinden de salınırlar. Artmış MPs seviyeleri, venöz ve arteryal yataklarda ortaya çıkan hemen hemen tüm trombotik hastalıklarda belgelenmiştir. Artan MPs seviyeleri aynı zamanda inflamasyon, hücrel aktivasyon ve disfonksiyon, anjiyogenez ve hücrel transport ile ilişkilendirilmiştir (2).



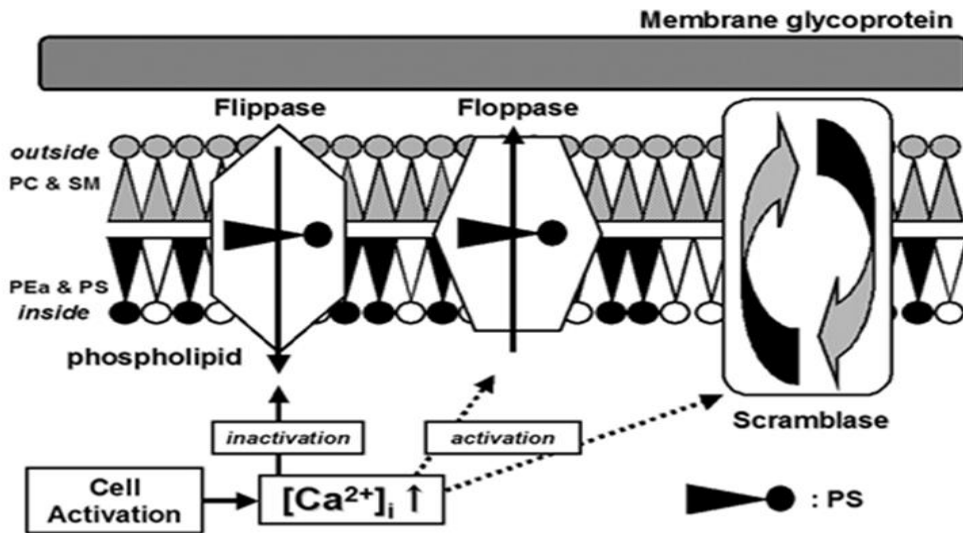
**Şekil 1.** Endotel kaynaklı mikroparçacıklar (EDMP) için fonksiyonel moleküller hedef antijenleri oluşturur

EPCR: endotelyal protein C reseptörü; eNOS: endotelyal nitrik oksit sentaz; PS: fosfotidil serin; ICAM-1: intrasellüler hücre adezyon molekülü 1; MMP: matriks metalloproteinaz; uPA: ürokinaz tip plazminojen aktivatör; TM: trombomodülin; APC: aktiflenmiş protein C; EPC: endotelyal protein C; MC: mitokondri; ER: endoplazmik retikulum; miRNA: mikroRNA; mRNA: haberci RNA (2).

MPs, hücre aktivasyonu veya apoptozis sırasında salınır. Sitokinler, esterleşmemiş kolesterol, trombin, endotoksinler, sigara özü, hipoksi ve shear stresi gibi pek çok kimyasal ve fiziksel uyarının hücre salınımını başlattığı bildirilmiştir. Yukarıda bahsedilen tüm uyarılar ve faktörler, diyabetik vasküler komplikasyonların gelişiminde potansiyel olarak yer alır. Bu duruma göre, dolaşımdaki MPs diyabet, diyabetik komplikasyonlar, kardiyovasküler hastalıklar ve abdominal aort anevrizması dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda artar (3).

Heterojenite, MPs'ın önemli bir özelliğidir. Farklı uyaranlarla muamele edilen aynı hücreler, farklı bileşenleri taşıyan MPs serbestleştirir. Buna karşılık, aynı uyaranla tedavi edilen farklı hücre tipleri de farklı bileşenleri taşıyan MPs serbestleştirecektir. Tandem kütle spektrometrisiyle birleştirilmiş sıvı kromatografisi (LC-MS) ile yapılan çalışmalar sayesinde insan kanında MPs'ın proteomik özellikleri belirlenmiş ve akut koroner sendrom, DM, sepsis ve orak hücre hastalığı gibi birçok hastalıkta plazma MPs'ın hücre içi içeriğinin değiştiği gösterilmiştir (3).

MPs, biyoaktif fosfolipidleri, kaynak oldukları hücrenin karakteristiği olan çeşitli antijenleri, onların uyarı tipini ve sitoplazmik bileşenlerini içerir. Bazı çalışmalarda MPs'ın proteomu analiz edilmiş ve yüzlerce protein tanımlanmıştır. MPs yapısal olarak hücre yüzeyinden salınır, ancak oluşumu hücrel aktivasyon veya apoptoz ile upregüle edilir. Hücrel aktivasyon veya apoptoz tetiklendikten sonra hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarında artış olur, ardından hücre iskeleti değişiklikleri meydana gelir. Hücre membranları farklı fosfolipid türleri içerir. Normalde yüksüz fosfolipidler membran çift katmanının dış kısmında yer alır, iç katman fosfatidilserin (PS) gibi negatif yüklü aminofosfolipidleri içerir. Hücrenin aktivasyonu veya apoptozu sırasında normal mebranın çift katlı lipit katmanında değişiklik olur (Şekil 2) ve flipflop hareketi ile iç katmandaki PS dış yüzeye geçer. Böylece, MPs hücrelerden salınabilir (2).



Şekil 2. Fosfatidilserinin (PS) transmembran göçüyle, membran hücre-içi tarafından hücre-dışı tarafa geçişi (2)

Fosfolipid asimetrisi, aktif flippaz kontrolü altındadır; floppaz, skramblaz ise inaktif haldedir. Hücrel aktivasyonu takiben, endoplazmik retikulumdan kalsiyum salınır; fosfolipid asimetri kaybolur, kalpain aktivasyonu gelişir. PC: fosfotidilkolin; SM: sfingomyelin; PEa: fosfotidiletanolamin.

### **2.3.1. Shear Stress ve MPs**

Yüksek kayma gerilmesi trombosit agregasyonunu ve prokoagulan içeren PDMPs'ın dökülmesini başlatabilir. Chow ve ark. yüksek shear (kayma) stress bölgelerinde primer hemostatik tıkaç bölgesinde oluşan trombinin, kaymayla indüklenen PDMPs üretimini güçlendirerek trombüsün yayılımında önemli bir rol oynadığını bildirmiştir. Dahası, trombosit GP'leri ve spesifik reseptörler, yüksek shear stresine bağlı PDMPs oluşumuna dahil olabilir. Yüksek shear stresiyle indüklenen PDMPs üretiminde rol oynayan mekanizmaları incelenmiş ve von Willebrand faktörünün GPIb'ye bağlanması, hücre dışı kalsiyum akışı ve trombosit kalpain aktivasyonu, yüksek shear stresi altında PDMPs üretmesi gerektiğini göstermiştir. Kayma stresi, endotelial apoptozun ana belirleyicisi olduğu için EDMPs üretiminde de rol oynamaktadır (1).

### **2.3.2. Tissue Factor ve MPs**

MPs başlangıçta prokoagulan olan fosfolipidleri ifade ettikleri için hastalıklarla ilişkili olduğu düşünülmekteydi. Bu MPs trombin oluşumunu (thrombin generation) destekler. Bununla birlikte, böyle bir koagülasyon sistemi sadece hastalık hallerinde değil sağlıklı bireylerde de aktive olabilir. MP'ın sağlıklı insanların kanında dolaştığını ve düşük dereceli trombin oluşumunu desteklediği bildirilmiştir. PDMPs'ın aktive trombositlere kıyasla 50 ila 100 kat daha spesifik prokoagulan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. PS'in kücre yüzeyine göçü, sadece pıhtılaşma komplekslerinin oluşumunu kolaylaştırmakla kalmaz, aynı zamanda TF'ün pıhtılaşmayı başlatmasını da kolaylaştırır. MPs, koagülasyonu ekstrensek yolaklarla (FVII/TF'ye bağımlı ve bağımsız) desteklemektedir. Vasküler hasar boyunca, kan ekstravasküler TF ile temas eder, ekstrensek pıhtılaşma aktivasyonu ve fibrin oluşumu ile sonuçlanır. Aslında, TF, aktif trombositlere MPs'ın yapışması ile aktive edilebilir (1).

Çeşitli çalışmalar, insan umbilikal ven endotel hücre kültüründe tümör nekroz faktörü (TNF)- $\alpha$ , lipopolisakarit veya oksitlenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein ile uyarılmanın, yüzey TF34-36 eksprese eden EDMPs'in salımında bir artışa neden olduğunu ortaya koymuştur. Bu EDMPs'in pıhtılaşma testine eklenmesi plazma pıhtılaşma süresini azaltır. FVII eksikliği olan plazmada bu etki gözlenmemektedir, bu durum EDMPs'in prokoagulan aktivitesinin bu gibi durumlarda FVII/TF'ye bağlı olduğunu göstermektedir. İlginç olarak, von Willebrand faktörünü taşıyan EDMp'in bir alt kümesinin, trombosit agregasyonunu indükleyebildiği görülmektedir (1).

MDMPs, vasküler hasar yerinde trombositlerin ve fibrin bakımından zengin trombüsün gelişimine, TF birikimi ile katkıda bulunur. MDMPs, P-selektin glikoprotein ligandı-1 ve TF'yi eksprese eder. Daha sonra aktif trombositler P-selektini açığa çıkarır ve P-selektin glikoprotein ligandı-1 yoluyla TF bağlayan MDMPs'ı yakalayabilir. Sonuç olarak, MPs'a bağlı TF, gelişen tromboz bölgesinde çabucak çökelir (1).

MPs yüzeyinde doku faktörü yol inhibitörü (TFPI), protein C veya trombomodulin gibi koagülasyonu inhibe eden proteinlerin varlığı, MPs'ın antikoagulan etkisini artırır. TF, MDMPs'dan açığa çıksa da, TF aktivitesi MPs'a bağlı TFPI tarafından belirgin olarak engellenmektedir. MPs yüzeyinde TF ve TFPI arasındaki denge, koagülasyonun başlatılmasında önemli bir özelliktir ve TF içeren MPs yüksek seviyeleri muhtemelen TFPI antikoagulan yolağı aşmaktadır (1).

### **2.3.3. MPs'ın klinik tanımlanması ve ölçüm yöntemleri**

MPs için tanımlama yöntemi, klinik çalışmalar için önemlidir. MPs, sitratlanmış tam kanın seri santrifüjüyle elde edilen platelet fakir plazmada (PPP) doğrudan ölçülebilir. Alternatif olarak, PPP'den ultra-santrifüjle yıkanmış MPs izole edilebilir (2).

MPs incelemek için en yaygın kullanılan yöntem, elde edilebilen bilgi zenginliği nedeniyle akan hücre ölçerdir; PPP veya MPs süspansiyonları, floresan konjuge monoklonal antikörlerle etiketlenmiştir. Akan hücre ölçerin en büyük avantajı, MPs hücresel kaynağını belirlemek için MPs'ın çift boyamasıdır. Annexin V bağlanması, MPs'ın fosfolipid özelliklerini teyit etmek için kullanılır, ancak çoğu EDMPs bu antijeni eksprese etmez. Kaynak hücreleri üzerinden eksprese edilen spesifik yüzey antijenlerine

karşı antikorlar MPs'ın alt tipini (örneğin, PDMPs'ın tanımlanması için anti-GPIb) tanımlamak için kullanılır. Akan hücre ölçer ile, MPs'ın ileri ışık dağılımının (FSS) değerlendirilmesiyle MPs boyutları hakkında da bilgi elde edilir. Ek olarak, çeşitli hücrelere daha özel antikorlar kullanılmıştır ve bu seçimler sonuçları etkilemektedir; örneğin,  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 ve P-selektinlerin trombositlere özgü antijenlerdir, tüm trombositlerde  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 olduğu halde, P-selektin'in sadece aktive trombositlerde olduğu bulunmuştur (3).

Enzim bağlı immunosorbent assay (ELISA) yöntemi daha kolay ve tekrarlanabilir bir MPs testidir; standart bir eğriye göre ölçüm yapılır. Bu yöntem P selectin ve CD40 ligandı gibi trombosit aktivasyon belirteçleri ile reaktif olan antikorlar kullanılarak yapılırsa, klinikte PDMPs'ın rolünün anlaşılmasına katkıda bulunacaktır. ELISA yönteminin sorunlarından biri, GPIb/IX/V kompleksi gibi çözünür glukoproteinleri ihtiva edebilmesidir (3).

Kan alımı (uygun örnekleme) ve taşıma, plazma hazırlama (ön-işlem) ve depolama koşulları dahil preanalitik evre dolaşımdaki MPs'ın ölçümünü etkiler. Kan örneğinin alımı ile santrifüjleme arasında geçen sürenin artması veya tek bir dondurma-çözme döngüsü nedeniyle MPs düzeyleri artar. Kan örneklerinin yıkama, saklama için dondurma işlemi öncesi iki kez santrifüjleme ve -80°C'de uzun süreli depolamanın, MPs kan düzeylerinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Ölçümleri olumsuz etkileyen, preanalitik evrenin üç ana parametresi; ilk santrifüj işleminden önceki gecikme, tüplerin taşınması sırasında sarsılması ve santrifüj işlemidir. Bu yüzden, MPs ölçüm teknolojilerinin geliştirilmesinde, standardizasyon şarttır (3).

#### **2.3.4. MPs RNA türlerini taşıyıcı**

Epigenetiğin gelişmesiyle birlikte, MPs özel miRNA'lar ve ebeveyn hücrelerinden türetilmiş RNA'lar içerdikleri için artan bir ilgi görüyor. MiR-126, miR-21 ve miR-29 gibi KAH ve diyabet ile ilişkili MPs'da çeşitli miRNA'lar mevcuttur. MPs'ın miRNA profilleri, stabil ve kararsız KAH'lı hastalar arasında ve uyarılmış ve uyarılmayan kültür hücreleri arasında in vitro olarak önemli derecede farklılık göstermektedir. Ateroskleroz hastalarından izole edilen MPs daha yüksek seviyelerde miR-150 içerir ve sağlıklı kontrollerden elde edilen MPs'a kıyasla insan mikrovasküler endotel hücre 1 (HMEC-1)

hücre göçünü destekleyebilir. Bu bulgular, belirli patofizyolojik koşullar altında MPs'a seçici bir şekilde miRNA taşınması olduğunu gösterir. Metabolik hastalıkları öngörmek için vücut sıvıları veya özellikle periferik kandaki biyobelirteç olarak spesifik EDMPs ile ilişkili miRNA işaretlerinin potansiyel kullanımı ile ilgili kanıtlar artmaktadır (3).

Yapılan çalışmalar MPs'ın, hedef gen ekspresyonunu ve alıcı hücrelerin işlevlerini düzenleyebildiği, alıcı hücrelere miRNA'lar gönderebildiğini göstermektedir. MPs (tek bir mesaj türü yerine) mRNA, transkriptlerin belirli alt grupları, miRNA'lar ve proteinler gibi birden fazla bilgi içeren mesajlar yayarlar. MPs, işlevsel olarak ilişkili genlerin ekspresyonunu, komşu hücreler arasında hiyerarşik sinyaller ve metabolik yollarla uyumlu ve koordineli olarak düzenleyebilir (3).

### **2.3.5. MPs'ın koagülasyondaki rolü**

MPs'ın, başlangıçta hastalıkla ilişkili oldukları düşünülüyordu çünkü prokoagülan olan fosfolipidleri ifade ediyorlardı. MPs, trombin oluşumunu desteklemekte ve hastalık hallerinde ortaya çıkan yaygın intravasküler koagülasyona dahil olabilmektedir. Bununla birlikte, bu koagülasyon sistemi yalnızca hastalık hallerinde değil, sağlıklı bireylerde de aktive olabilmektedir. Berckmans ve ark. MPs'ın sağlıklı insanlarda da kan dolaşımında olduğunu ve düşük dereceli trombin oluşumunu desteklediğini bildirmiştir. PDMPs'ın aktive trombositlere kıyasla 50 ila 100 kat daha yüksek prokoagülan aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. PS'in zardaki değişikliği sadece pıhtılaşma komplekslerinin oluşumunu kolaylaştırmakla kalmaz aynı zamanda TF 'nin koagülasyon başlatma gücünü artırır (2).

MPs, koagülasyonu ekstrensek yolakla (FVII/TF'ye bağımlı ve bağımsız yolaklarla) desteklemektedir. Vasküler hasar sırasında, kan ekstravasküler TF ile temas eder, ekstrensek pıhtılaşma yolu aktive olur ve fibrin oluşur. Gerçekten de, TF, aktif trombositlere MPs'ın yapışması ve füzyonu üzerinde etkilidir (2).

Birkaç çalışma, insan umbilikal ven endotel hücre kültüründe TNF  $\alpha$ , lipopolisakkarit veya oksitlenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein ile uyarılmanın, TF 'yi eksprese eden EDMP salınımında bir artışa sebep olduğunu bulmuştur. Bu EDMPs'ın pıhtılaşma testine eklenmesi pıhtılaşma süresini kısaltır. FVII eksikliği olan plazmada bu

etki gözlenmemiştir, bu durum EDMPs'in prokoagülan aktivitesinin FVII/TF'ye bağımlı olduğuna işaret eder (2).

MDMPs, hücrelerin toplanması ve TF birikimi yoluyla vasküler hasar olan bölgelerde trombositlerin ve fibrin bakımından zengin trombüsün gelişimine katkıda bulunur. MDMPs P-selectin, glikoprotein ligandı-1 ve TF 'yi eksprese eder. Gelişmekte olan trombüs içindeki aktive trombositlerde aktifleştirilmiş endotel hücrelerinde MDMPs'in P-selectin'e bağlanması TF birikimini ve lokalize trombin oluşumunu teşvik eder. Hem monositler, hem de MDMPs, TF açığa çıkarabilir. Daha sonra aktif trombositler P-selectini açığa çıkarır ve P-selectin glikoprotein ligandı-1 yoluyla TF açığa çıkaran MDMPs'ı yakalayabilir. Sonuç olarak, MPs ile ilişkili TF hızla gelişen trombüs yerinde birikir. DelConde ve ark. in vitro olarak TF açığa çıkaran MPs zarlarının füzyonunu ve aktif trombositlerin trombosit zarlarında TF'ün transferine sebep olduğunu gösterdi. Bu füzyon, TF ve koagülasyon faktörlerinin birlikte lokalize edilmesine ve dolayısıyla koagülasyonun daha etkin bir şekilde başlatılmasına ve yayılmasına neden olur (2).

Antikoagülan ve anti-inflamatuvar özelliklere sahip aktive protein C'nin endotel hücreleri ve EDMP oluşumu üzerindeki etkisi de araştırılmıştır. Aktive protein C açığa çıkaran endotel hücre kültürü, membrana bağlı endotel protein C reseptörü ile EDMP'yi serbest bırakır. Bu reseptöre bağlı aktive protein C, trombin oluşumunu azaltarak antikoagülan aktivitesini korur. MPs nin prokoagülan özelliklerinin düzenlenmesine katkıda bulunan diğer mekanizmalar TNF- $\alpha$  ve interlökin (IL) 10 gibi anti-inflamatuvar sitokinler arasındaki dengeye dayanmaktadır. Gerçekten, endojen IL-10'un yakın zamanda, monositlerde TF ekspresyonunu ve TF'ye bağlı MDMP salınımını down regüle ettiği ve trombin oluşumunu engellediği bildirilmiştir (2).

### **2.3.6. MPs ve tromboz**

MPs'in prokoagülan etkileri, pıhtılaşma olayında yer alan negatif yüklü PS ve açığa çıkan TF'den kaynaklanmaktadır. TF, MDMPs'da ve EDMPs'da tanımlanan bir transmembran moleküldür. Dolaşımdaki TF içeren MPs, P-selectin glikoprotein ligandı-1 (MP'ler üzerinde PSGL-1) ve P-selectin (trombosit yüzeyinde) arasındaki etkileşim vasıtasıyla aktive trombositlere bağlanabilir. In vivo çalışmalar, intravital mikroskopi



altında TF + MPs'ın tromboz oluşumuna dahil olduğunu göstermiştir. MPs üzerindeki P-selektin, PSGL1, GPIIb/IIIa protein disülfid izomeraz, FVIII ve FVa reseptörlerinin varlığı trombozda rol oynayabilir. PDMPs, FVa, FVIIIa ve FIXa faktörleri için membran yüzey alanı birimi başına aktif trombositlerden daha bağlayıcı alanlar ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, dolaşımdaki MPs'ın artan fosfolipid kompozisyonu ile koagülasyon arasında bir ilişki bulunmadığı da bildirilmiştir (3).

Çalışmalar diyabetik ve diyabet komplikasyonu olan hastalarda prokoagülan MPs düzeylerinin arttığını göstermiştir. Cimmino ve arkadaşları, koagülasyon markırlarının artmış düzeyine denk gelen yüksek prokoagülan TF taşıyan MPs'ın diyabette arttığını bulmuşlardır. Prokoagülan PDMPs, MDMPs ve EDMPs diyabette, komplikasyonsuz iyileşmiş kontrollü DM'da ve yeni tanısı konmuş tip 2 DM'da bile anlamlı şekilde artmaktadır. Ek olarak, hipertansiyon, hiperlipidemi, semptomatik olan veya olmayan anjina eşlik eden koroner hastalık, miyokard enfarktüsü, diyabetik retinopati ve nefropati gibi diyabet komplikasyonu olan hastalarda, komplikasyonu olmayan diyabetiklere kıyasla prokoagülan MPs'ın düzeyleri belirgin olarak artırmıştır. Bu nedenle artmış MPs seviyeleri artmış diyabetik tromboemboli komplikasyon riski ile ilişkili olabilir (3).

Trombüs, trombositleri aktive eder; aktive trombositler, daha ileri trombin oluşumuna yol açan PDMPs'ı serbest bırakır. Bu pozitif geribildirim diyabette hiperkoagülabilitate mekanizmalarını açıklayabilir. Sabatier ve ark. MPs'ın prokoagülan potansiyelinin arttığını ve tip 1 DM'de glisemik kontrol derecesi ile korele olduğunu bildirmişlerdir. Tersine, tip 2 DM'de total MPs artmasına rağmen prokoagülan potansiyellerinde bir artış yoktur. Yapay olarak indüklenen yüksek insülin düzeyinin, sağlıklı gönüllülerde artmış monosit TF ekspresyonuna neden olabileceğini göstermiştir ki, bu da hiperinsülineminin pro-tromboz etkisini düşündürmektedir. Antiplatelet ilaçların verilmesi diyabetli hastalarda dolaşımdaki MPs'ı ve aktive trombosit sayısını belirgin şekilde azaltabilir (3).

### **2.3.7. MPs ve vasküler inflamasyon**

Lökosit endotel etkileşimi ve daha sonra lökositlerin transendotelial göçü, ateroskleroz gelişimindeki erken dönem olaylardır. In vitro deneyler, apoptotik endotel

hücrelerinden veya aktive trombositlerden türetilen MPs'ın vasküler sistemde pro-inflamatuar ve pro-adezif potansiyelleri yayarak hücrel efektör etkisi gösterdiğini ortaya koymuştur. Aktive trombositler ve tip 2 DM hastalarından izole edilen PDMPs, endotel hücreleri ve monositler arasındaki etkileşimi desteklemektedir. Terrisse ve ark., MPs'ın in vitro olarak insan umbilikal ven endotel hücre yüzeyinde (HUVEC'ler) platelet dizilerinin oluşumunu teşvik ettiğini ve hücre yüzeyine MPs'ın da dahil olduğunu buldular. Bu alım, endotel hücre yüzeyinde von Willebrand faktörü ekspresyonu için ve aynı zamanda trombositler ile endotel hücreleri arasındaki etkileşim için gerekli olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini indükler. Bu çalışmalar MPs'ın vasküler hastalıklara ve diyabetik kardiyovasküler komplikasyonlara neden olabilecek endotelial aktivasyon, lökosit toplanması ve vasküler inflamasyonda potansiyel önemini göstermektedir (3).

### **2.3.8. MPs ve endotel disfonksiyonu**

Diyabetik hastalarda yapılan çalışmalar MPs'ın endotel fonksiyonlarını etkileyebildiğini göstermektedir. Artmış CD31 + / anneksin V + MPs düzeyleri, koroner arter hastalığı (KAH) olan hastalarda koroner endotel fonksiyonunun bozulması ile pozitif korelasyon göstermektedir (3).

İn vitro ve eks vivo deneyler, MPs'ın endotel hücrelerinde nitrik oksit (NO) ve prostasiklin üretimini azaltarak endotel disfonksiyonuna neden olabileceğini göstermiştir. Diyabetik hastalardaki LDMPs, shear stresin, NO ve prostasiklin üretimini etkileyerek fare mezenterik arterlerinde yaptığı dilatasyonu bozmaktadır. Buna ek olarak, yakın zamanda yapılan bir çalışma, yüksek glukoz maruziyeti yapılan EDMPs'ın artmış nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz (NOX) aktivitesi ve daha yüksek ROS düzeylerine bağlı olarak adezyon molekül ekspresyonu ve makrofaj infiltrasyonunu arttırarak endotel fonksiyonunu önemli ölçüde azaltabileceği gösterilmiştir (3).

Vasküler tromboz ve inflamasyondaki endotel hücrelerinin merkezi önemi nedeniyle, MPs'ın endotel disfonksiyonunu göstermede bir biyobelirteç olarak kullanılması düşünülmektedir ancak halen araştırılmaktadır. Endotel hücrelerine dayalı metodolojilerdeki MPs, diyabetik vasküler komplikasyonlarda vasküler inflamasyonu incelemek için kullanılabilir (3).

### **2.3.9. MPs ve anjiyogenik etkileri**

Pıhtılaşma ve vasküler inflamasyona ek olarak, sayısız çalışma MPs'ın anjiyogenezde rol oynadığını göstermektedir. Diamant ve ark., diyabetik hastalarda yüksek TF + MPs seviyelerinin, daha önce gösterilen TF + MPs'ın klasik prokoagulan fonksiyonundan başka transselüler sinyalizasyon veya anjiyogenik süreçlerde de yer alabileceğini bildirmiştir. Diyabetik retinopatili hastalardaki MPs ile HUVEC'lerin inkübasyonu, dengesiz tüp ağlarının oluşumuna neden olur, dolayısıyla kısmen PDR mekanizmalarını yansıtır. Ettelaie ve ark., ileri glikasyon son ürünlerinden (AGE) veya glikozla muamele edilen böbrek mesangial hücrelerinden salınan TF içeren MPs'ın insan dermal mikrovasküler endotel hücreleriyle kılcal damar oluşumunu in vitro olarak indüklediğini göstermiştir (3).

MPs'dan türetilmiş büyüme faktörleri ve sitokinlerin endotelial anjiyogenezde rol aldığı öne sürülmüştür. Dahası, MPs üzerindeki doku faktörleri, vasküler proliferasyonu ve anjiyogenezi düzenleyebilir. Diğer çalışmalar ayrıca, PDMPs'ın, MPs lipid bileşenlerinin, özellikle sfingozin 1-fosfatların aracılığı ile hücre proliferasyonunu artırarak ve apoptozu azaltarak in vitro anjiyogenezi uyardığını göstermiştir (3).

MPs, vasküler komplikasyonların tipiyle ilgili spesifik özelliklere sahip hücreler arasında biyolojik mesajlar aktarabilir. Gerçekten de, MPs, hücre homeostazını korumak, hücre onarımı ve anjiyogenezi desteklemek için yüksek glukoz seviyesi ile diyabetik vaskülopati gelişimi arasında temel bilgi vektörleri gibi davranmaktadır (3).

### **2.3.10.MPs ve aterotromboz**

PDMP, EDMP ve lölositten dökülen MPs'ın üretimi inflamatuvar koşullarda artabilir. Sağlıklı gönüllülerde bir kemotaktik peptid ile hücre içi uyarı vererek oluşan MPs, IL-6 ve monosit chemoattractant proteini (MCP)-1 salınmasının yanı sıra TF ekspresyonunu indükler. Aterosklerozun önemli bir özelliği, monositlerin endotel hücrelerine yapışması ve bunu takiben subendotelial göçün olmasıdır. IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinler, lökosit-endotelial adezyon moleküllerinin sentezini veya upregülasyonunu indükleyerek bu işlemi etkiler. Yüksek kayma stresin indüklediği PDMPs ile in vitro monosit ve endotel hücreleri uyarılarak IL-8, IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  üretimi önemli ölçüde

arttırılır. Ayrıca endotel hücrelerinin ve monositlerin PDMP ile uyarılması her iki hücre tipindeki adezyon moleküllerinin ekspresyonunu arttırarak monosit-endotel hücre etkileşimlerini modüle eder. Son zamanlarda, inflamasyonda PDMPs'ın önemine ek olarak, kritik hastalarda PDMPs düzeyleri ile klinik sonuçlar arasındaki bazı bağlantılar da değerlendirilmiştir (1).

PDMP ve lökosit kökenli dolaşımdaki MPs, endotel hücrelerinde ve monositlerde sitokinlerin upregulasyonu yoluyla inflamatuvar hücrelerin alınması ve hücrel adezyonun uyarılmasını destekler. Yüksek kayma stres koşullarında, PDMP rollingi, RANTES'in iltihaplı endotele ulaşmasını sağlar ve böylece monositlerin yapışmasını ve plakların infiltrasyonunu kolaylaştırır. Aterosklerotik plakların gelişimi ve ilerlemesi, plaklarda prokoagülan MPs'ın çok fazla olduğunu gösteren apoptotik hücre ölümüyle ilişkilidir. Dahası, artmış apoptoz veya lökositlerin, SMC'lerin ve endotelin aktivasyonu, MPs birikimine katkıda bulunur; benzer moleküller ile karşılaştırıldığında, plakta yer alan MPs çok daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve daha yüksek trombojen potansiyeline sahiptir. Plaklarda, bu MPs'ın çoğu inflamasyonu gösteren aktif lökositlerden, plak içi kanamayı gösteren eritrositlerden kaynaklanmaktadır. Aterosklerotik plaklar ayrıca önemli miktarda SMC kaynaklı MP ve EDMP içerir. MPs, sadece plak trombojenitesine katkıda bulunmaz, aynı zamanda inflamatuvar hücrelerin toplanmasına aracılık ederek instabiliteye katkıda bulunur. Dolayısıyla dolaşımdaki MPs vasküler inflamasyon, endotel disfonksiyonu, lökosit adezyonuna sebep olabilir. MPs, biyolojik efektörleri taşıdığından, bu plak büyümesine veya stent ile uyarılan vasküler inflamasyona sebep olabilir (1).

### **2.3.11.MPs ve diyabetik makrovasküler komplikasyonlar**

İnsanlarla yapılan çalışmalar, PDMPs, CD31 + / annexin V + DMPs, CD31 + / CD42b - EDMPs ve CD144 + EDMPs koroner, periferik ve serebrovasküler hastalıklar da dahil olmak üzere makroanjyopati bulunan tip 2 DM hastalarında artmıştır. Yakın tarihli bir çalışmada, miyokard enfarktüsü geçiren hastalarda sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında monomerik C-reaktif protein (CRP) pozitif MPs seviyelerinin anlamlı olarak daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Buna ek olarak, dolaşımdaki yüksek MPs

seviyeleri, hipertansiyon, obezite, kolesterol ve dislipidemi dahil olmak üzere kardiyovasküler risk faktörleri ile ilişkili bulunmuştur (3).

Bernard ve ark. Tip 2 DM hastalarında dolaşımdaki CD144 + endotelial kökenli MPs ile kararsız koroner plaklar arasında bir ilişki bildirmişlerdir. Buna ek olarak, geleneksel kardiyolojik biyobelirteçlerle karşılaştırıldığında, Koga ve arkadaşları, tipik anjina semptomları olmayan diyabetik hastalarda yüksek CD144 + MPs seviyelerinin, lipid düzeylerine, CRP'ye, diyabet süresi ve hipertansiyon varlığına göre KAH için göreceli olarak önemli risk faktörü olduğunu gösterdi. Başka bir çalışmada, MPs'ın diagnostik değeri ile sağlıklı Japon toplumundaki geleneksel kardiyovasküler biyobelirteçler karşılaştırılmış ve trombosit kökenli MPs'ın CRP'ye göre metabolik sendrom ile daha yakın ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Curtis ve ark., PS + MPs'ın CD34 + progenitör hücrelerine oranının, artmış kardiyovasküler riski sınıflamak için kullanılan birçok standart biyobelirteçten daha bilgilendirici olduğunu göstermiştir. Bu nedenle yüksek MPs düzeyleri, endotel disfonksiyonu ve kardiyovasküler risk için potansiyel biyolojik belirteç olabilir (3).

İn vitro çalışmalar, MPs'ın pentamerik CRP'yi pro-inflamatuar monomerik CRP'ye dönüştürebildiklerini göstermiştir. CRP monomerlerini içeren MPs endotel hücrelerinin yüzeyine bağlanabilir ve in vitro proenflamatuar sinyalleri üretebilir, bu da MPs'ın vasküler hastalıkta pro-inflamatuar CRP monomerlerinin taşınması ve verilmesinde potansiyel bir rol oynadığını düşündürmektedir. Monositlerin/makrofajların kolesterol zenginleştirmesinin, yüksek prokoagulan aktiviteye sahip TF + MPs'ın oluşumuna sebep olduğu ve bunun, protrombotik koşullara ve hiperkolesterolemide aterotromboza katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (3).

Son kanıtlar insülinin monositlerde ve monositlerden türetilen MPs'da in vitro olarak TF ekspresyonunu azalttığını göstermiş olmasına rağmen, in vivo çalışmada yüksek insülin düzeyinin sağlıklı gönüllülerde artmış monosit TF ekspresyonuna sebep olduğu gösterilmiştir, bu da hiperinsülineminin pro-tromboz etkisi olduğunu düşündürmektedir (3).

Dolayısıyla dolaşımdaki MPs'ın yüksek seviyeleri diyabetik makrovasküler komplikasyonlar için bir gösterge ve yararlı bir risk sınıflama aracı olabilir. Kandaki MPs, endotel hücrelerini ve aterosklerotik plak instabilitesini bozan potansiyel patojen faktörler olabilir. MPs ayrıca, diyabetik makrovasküler komplikasyonlarda tedavilere verilen yanıtı izlemek için yeni terapötik hedefler veya biyobelirteç olabilir (3).

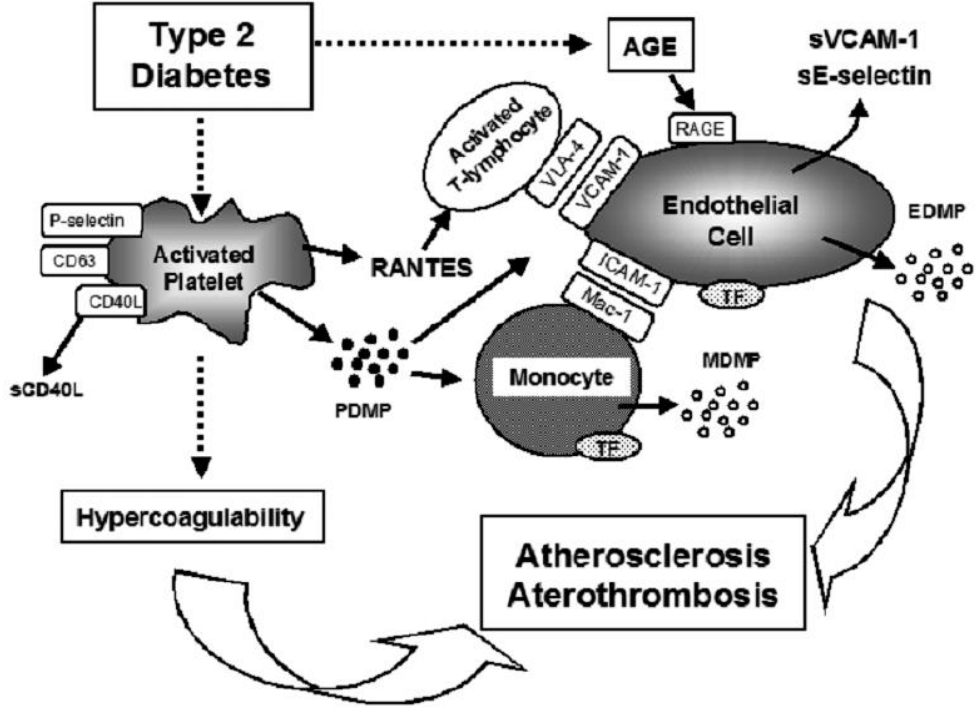
### **2.3.12.MPs ve mikrovasküler diabetik komplikasyonlar**

#### **2.3.12.1.MPs ve diyabetik retinopati**

Ogata ve ark. dolaşımdaki PDMPs'ın ve MDMPs'ın düzeylerinin diyabetik retinopati proliferasyonunda proliferatif olmayan aşamadan proliferatif aşamaya doğru gittikçe arttığını ve kılcal damar bölgelerinde diyabetik retinopatide anlamlı olarak daha yüksek olduğunu gözlemlemiştir. MDMPs seviyeleri, diyabetik hastalardaki PDMPs, aktive trombositler ve adezyon molekülleri ile pozitif korelasyon gösterir ve diyabetik retinopati progresyonu için prognostik bir faktör olabilir. Dahası, PDR, yeni damarlardan kaynaklanan EDMPs'ın dökülmesinde spesifik artış ile ilişkilidir (3).

Yüksek MPs seviyelerinin, koagülasyon kaskadını uyararak diyabetik retinopatinin ilerlemesine katkısı olup olmadığı tartışmalıdır. PDMPs yüksek seviyesi koagülasyonu uyarabilir ve lökosit ve endotel hücrelerinin adezyonunu arttırabilir. Bu sonuçlar retinopatili tip 2 DM hastalarında yüksek TF seviyesine sahip olmakla birlikte düşük bir TF/TFPI oranına sahip olduğunu ve bu da düşük prokoagulan aktivite olduğunu düşündürmektedir (3).

İn vitro deneylerde, TF MAPK ve protein kinaz C'ye bağımlı sinyal vermeyi aktive ederek oküler anjiyogenezini doğrudan teşvik eder. Buna ek olarak, MPs'daki miRNA'nın anormal ifadesi, neoanjiyogenezde rol oynayabilir. MiRNA-200b'nin azalmış ekspresyonu, VEGF ekspresyonunu azaltırken, miR-29b'nin artmış ekspresyonu bazı apoptotik genleri düzenler ve VEGF ekspresyonunu artırır; bu miRNA'lar diyabetik retinopatide kontrolsüz hücre çoğalmasına katkıda bulunabilir. Dolayısıyla, dolaşımdaki MPs'ın diyabetik retinopati patogenezindeki temel rolü, anjiyogenik ve inflamatuvar sinyalleri verme yeteneklerine dayanabilir (3).



**Şekil 3.** Tip 2 diyabette görülen ateroskleroz ve trombozda mikroparçacıkların (MPs) rolü

PDMPs, MDMPs, EDMPs üretimi tip 2 DM'ta artmış olabilir. ICAM-1: intrasellüler hücre adezyon molekülü 1; VCAM-1: vasküler hücre adezyon molekülü 1; VLA-4: very lated antijen-4; AGE: ileri glikasyon son ürünleri; RANTES: aktivasyonla düzenlenen, T hücre salınımı ve ekspresyonu normal olan; CD40L: CD 40 ligand (1).

### 3. MATERYAL VE METOD

Hastanemiz göz hastalıkları polikliniği ve retina polikliniğine başvuranlar arasından, belirlenen kriterlere uygun hastalar seçildi. Hastaların demografik bilgileri, hastalık ve ilaç/sigara öyküsü, bel çevresi, boy-kilo ölçümleri, kan basıncı değerleri kaydedilmiştir.

Tüm olgular 4 gruba ayrılarak incelenmiştir; grup-1: sağlıklı kontrol grubu (N=37); grup-2: diyabetik retinopati tanısı ile izlenen olgular (N=40); grup-3: DM olmayan ve kuru tip YBMD tanısı ile izlenen olgular (N=41); grup-4: DM olmayan ve yaş tip YBMD tanısı ile izlenen olgular (N=40). Olguların sınıflandırılması;

Grup 1: DM’u olmayan (sağlıklı bireyler)

Grup 2: Diyabetik retinopati (anti-VEGF öncesi)

Grup 3: Kuru tip YBMD

Grup 4: Yaş YBMD (en son anti-VEGF tedavi bir ay önce almış veya hiç tedavi uygulanmamış)

#### Olgu kabul kriterleri:

1. Dislipidemi veya HT dışında bilinen hastalığı olmayan sağlıklı kontrol bireyleri;
2. Yaşa veya diyabete bağlı yaş makula dejenerasyonu, kuru makula dejenerasyonu tanısı almış olup, aynı gün henüz anti-VEGF (etken madde: aflibercept veya ranibizumab) tedavi uygulanmamış olgular;



3. Kıırma kusuru vb. bozuklukları olup, retina ile ilgili herhangi bir göz bulgusu gözlenmeyen sağlıklı gönüllü olgular;
4. Elli yaş ve üzeri olgular.

Olgu dışlama kriterleri:

1. Tiroid fonksiyon bozukluğu;
2. Serum kreatinin (> 2,0 mg/dL) veya eGFR (<60 mL/dk);
3. DM dışında bilinen sistemik iltihabi hastalığı olması; kontrolsüz HT;
4. DM izleminde A1C (> % 11) bulunan olgular;
5. Glokom tanısı almış olgular;
6. İnflamatuar romatolojik hastalık, barsak hastalığı, otoimmün hastalık;
7. Gebelik ve laktasyon;
8. Bilinen malignansi tanısı olanlar;
9. Nefropatiye yönelik tedavi başlanmış hastalar,
10. Warfarin türevi, heparin türevi ilaç kullananlar.

Rutin biyokimya parametreleri (glukoz, üre, kreatinin, albumin, GGT, ALT, CRP) Beckman Coulter AU 2700 biyokimya analizöründe çalışılmıştır. Plazmada prokoagülan fosfolipid potansiyeli (MPs) oldukça labil yapıda olduğundan, sitratlı (0.109 M) tüpe alınan (BD Vacutainer Plus Sitrat tüpü, Ref no: 364305, Becton Dickinson, ABD) kanın en geç 20 dakika içerisinde (derhal) santrifüjü (15 dakika, 2500 g) sonrası; süpernatantın en üstteki 2/3 kısmı katkısız (düz) tüpe aktarılarak ikinci kez santrifüj edildi (15 dakika, 2500 g) ve yine süpernatantın en üstteki 2/3 kısmında elde edilen trombosit fakir plazma (platelet poor plasma: PPP) ependorf tüpe aktarılarak, en fazla 2 saat içerisinde -80°C’de saklanmış oldu. Hasta numuneleri en fazla 5 ay boyunca dondurulmuştur.

EDTA'lı tam kan örneğinde boronat afinite kromatografisi yöntemiyle A1C (Premier HB 9210, Trinity Biotech, İrlanda) ve tam kan sayımı (Sysmex XE 5000, Sysmex Medical International, Japonya) çalışılmıştır.

GFR değeri cockcroft-gault (C-G), aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (kadın olgularda, sonuç 0,85 ile çarpılarak düzeltme yapılmıştır) (39):

$$\frac{[(140 - Age \times weight)]}{[72 \times Scr(mg / dL)]}$$

Kayıtlı her bir hasta için Olgu Rapor Formu dolduruldu.

Polikliniğe başvuran takipli hastaların standart oftalmolojik muayeneleri yapıldı. En iyi düzeltilmiş görme keskinliği (BCVA), Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) eşeli ile ölçüldü ve logMAR'a çevrildi.

Hastaların her kontrolde Spectralis cihazıyla (Heidelberg retinal tomography; HRT; Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany) Optik Kohorens Tomografi (OKT) görüntülemeleri yapıldı; OKT ile merkezi maküla kalınlığı (CMT) kaydedildi ve veriler Excel dosyasına işlendi.

### 3.1. MPs ölçümü

Sağlıklı kontrol grubu ve makula dejenerasyonlu gruplardan açlık kan örnekleri alınarak saklandı. Yukarıda antadıldığı üzere; plazmada prokoagülan fosfolipid potansiyeli (MPs) oldukça labil yapıda olduğundan sitratlı kanın derhal seri santrifüjüyle (2 kez 15 dakika, 2500 g) elde edilen elde edilen PPP -80°C'de saklanmıştır.

Hiperkoagülabilitate lehine laboratuvar bulgusu olarak prokoagülan aktiviteye sahip olan MPs fonksiyonel düzeyleri, Dr Hemker tarafından geliştirilmiş olan, Tissue Factor (TF) aktivitesi florojenik ölçümü 'trombin oluşum testi' (thrombin generation test, TGT), Calibrated Automated Thrombography (CAT, Diagnostica Stago, Fransa) cihazında saptandı.

Çalışma günü daha önce dondurulmuş olan, hasta ve kontrol gruplarına ait PPP örnekleri, reaktifler, kalibratör, kontrol ve diğer sarf malzemesi oda ısısına getirildi. MP-

reaktifi (MP-Reagent, katalog no: 86222, Thrombinoscope BV, Maastricht, the Netherlands), PPP örneğinde trombin oluşumunu başlatmada tetikleyici rol oynamaktadır; prokoagülan mikroparçacıkların yüzeyinde bulunan TF'ye duyarlılığın artırılmasıyla, (ve TF'ye duyarlı fosfolipidlerle uyarılmasıyla) trombin aktivitesi sürekli (eğri oluşumu) izlendi. MPs reaktifi, flakonda liyofilize olup, 1 mL deiyonize su (apirojen ampul) ile sulandırıldı, 10 dakika bekledikten sonra karıştırılarak hazırlandı.

Kalibratör flakonda liyofilize olarak bulunmaktaydı, 1 mL deiyonize su (apirojen ampul) ile sulandırıldı, 10 dakika bekledikten sonra karıştırılarak hazırlanmış oldu. Her bir olgu numunesinde, içeriğinde sitrat ile tamponlanmış salin, sığır proteinleri ve sakkaritler bulunan kalibratör (Thrombin Calibrator, katalog no: 86192, Thrombinoscope BV, Maastricht, the Netherlands) kullanılarak; substrat tüketimi, optik artefaktlar (plazma rengi, içsel-filtre etkileri, gibi) için düzeltme yapıldı.

Benmari 37°C'ye getirildi. Numuneler ve FluCa kit önce 1 saat kadar oda sıcaklığında, daha sonra (çalışmadan hemen önce) 5-10 dakika benmaride (37°C) bekletildi. Daha önce kullanılmamış 96'lık plak alınarak bir olgu için iki kuyucuk harcanacak şekilde; bir kuyucuğa kalibratör (trombin), yanındaki kuyucuğa da MPs kiti 20 µL manuel pipetlendi ve peşine her PPP örneği için iki kuyucuğa 80 µL manuel pipetlendi. Böylece 48 olgunun PPP örneği için bir plak kullanıldı.

Trombine düşük afiniteli florojenik substrat (Z-Gly-Gly-Arg-AMC) polar çözücü dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülmüş halde bulunmakta olup; benmaride bekletilerek Hepes (pH: 7,35) ve kalsiyum klor içeren her bir flakon (1,6 mL) Flu tampon solüsyonuna, 40 µL Flu substrat ilave edildi, vorteks ile karıştırıldı; 1/40 oranında reaktif hazırlanmış oldu (FluCa kit, katalog no: 86197, Thrombinoscope BV, Maastricht, the Netherlands). Hazırlanmış olduğumuz FluCa-kit'i CAT cihazına yerleştirdik, daha sonra cihaz tarafından otomatik olarak kuyucuklara boşaltıldı. FluCa-kit ilavesiyle birlikte reaksiyon karışımında (toplam) 4 µmol/L fosfolipid bulunuyordu.

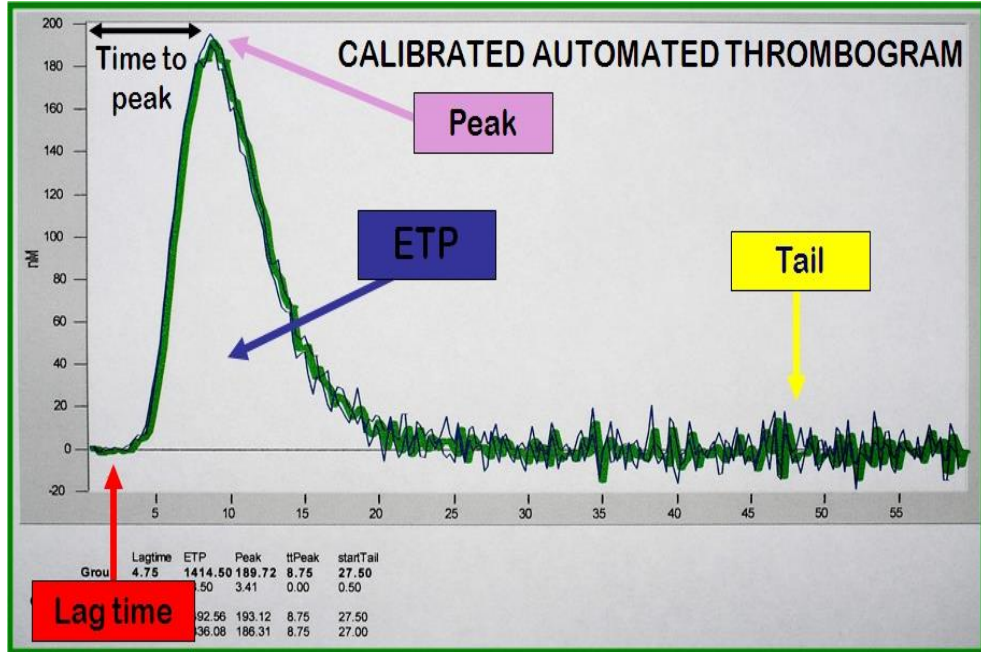
*FluCa kit ilavesiyle birlikte, en son reaksiyona girenler;*

1. Ölçüm kuyucuğu: 20 µL MPs reaktifi (TF + PL) + 80 µL PPP + 20 µL FluCa

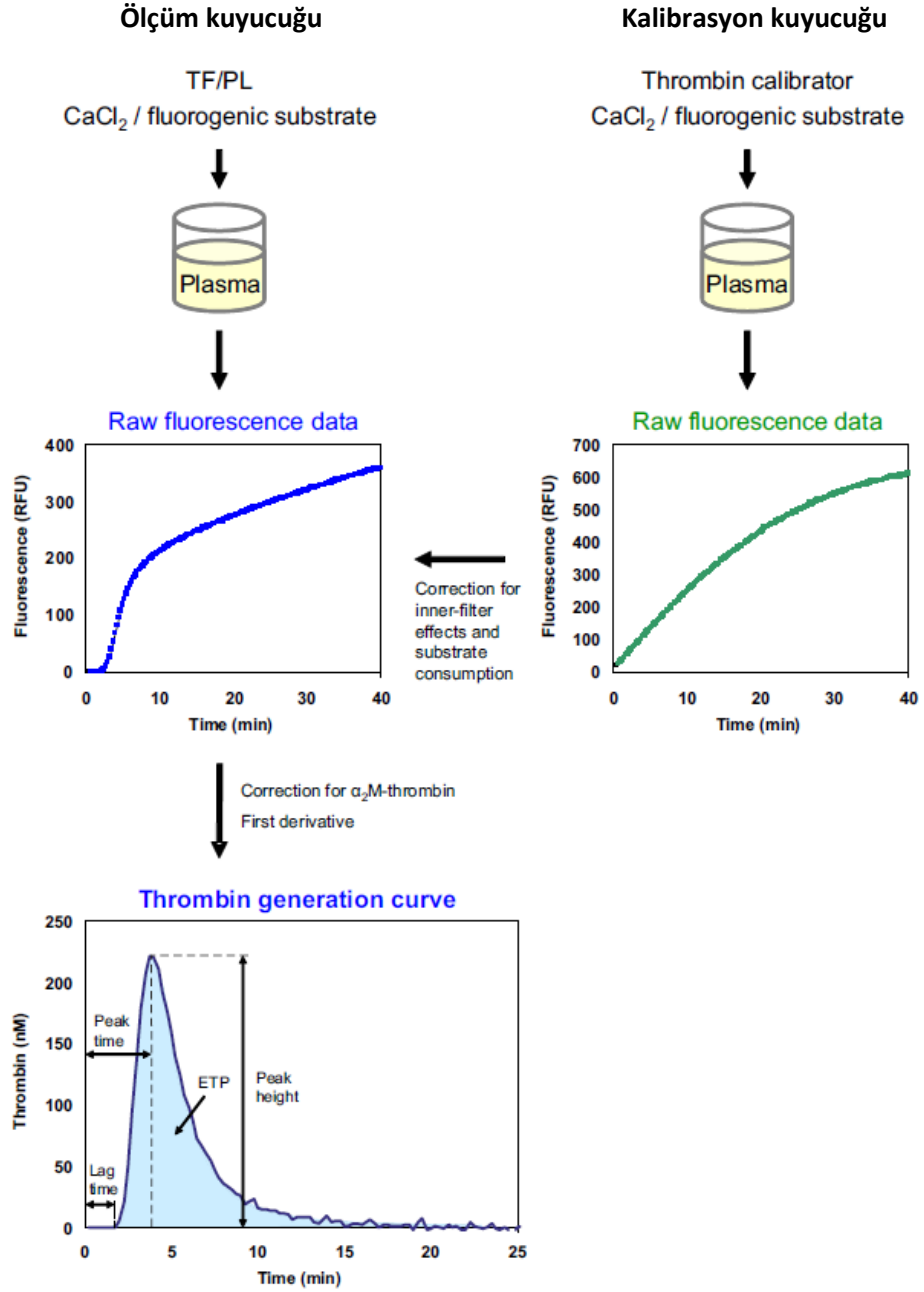
## 2. Kalibrasyon kuyucuğu: 20 µL kalibratör + 80 µL PPP + 20 µL FluCa

Floresan substratın parçalanmasıyla yayılan floresan yoğunluğu (raw fluorescence units: RFU), 390 nm (eksitasyon) ve 460 nm (emisyon) dalga boylarında (real-time, zaman içerisinde değişim) okutuldu. Trombogram eldesinde sıklıkla test tekrarları oldu. Oluşan trombin konsantrasyonu Trombinoscope yazılımı (QWERTY, katalog no: 86189, Thrombinoscope BV, Maastricht, the Netherlands) sayesinde hesaplanarak, elde edilen *trombin oluşum eğrisine* göre aşağıdaki trombogram parametreleri elde edildi:

- **Lag time (dakika):** cihazdaki reaksiyonun başlamasına kadar geçen süre; peak düzeyinin 1/6'sına (% 16,7) denk gelen zaman (x ekseninde)
- **Endojen Trombin Potansiyeli, ETP (nmol/L·dakika):** trombogram eğrisi altında kalan alan
- **Peak yüksekliği (nmol/L):** trombogram eğrisinin tepe yüksekliği (y ekseninde)
- **Time to trombogram Peak, ttPeak (dakika):** trombogram eğrisinde tepe yüksekliğine gelme süresi (x ekseninde)
- **startTail (dakika):** trombogram eğrisinin tamamlandığı süre (x ekseninde)



Şekil 4. CAT cihazında elde edilen örnek 'trombogram eğrisi'



**Şekil 5.** Mikroplakta ölçüm kuyucuğu ve kalibrasyon kuyucuğuna uygun pipetlemeleri takiben gelişen reaksiyona bağlı Calibrated Automated Thrombography (CAT) cihazında elde edilen çıktıların (eğrilerin), özel bir yazılım programı sayesinde değerlendirilerek elde edilen sayısal verilerden trombin oluşum testi (TGT) parametrelerinin tanımlanması (40).

### 3.2. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler MedCalc (MedCalc Software, Broekstraat, Mariakerke, Belgium) programı ile yapıldı. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu *Kolmogorov-Smirnov testi* ile araştırıldı. Gaussian dağılım gösteren değişkenler ortalama±SD; non-gaussian dağılım gösteren değişkenler ortanca (25.persentil–75.persentil) olarak gösterildi. Dağılımı normal olan değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmalarında *one-way ANOVA analizi*; post hoc karşılaştırmalarda *Tukey HSD* veya *Tamhane's T2 testi* kullanıldı. Dağılımı normal olmayan değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmalarında *Kruskal-Wallis H testi* kullanılıp; *Mann-Whitney U testi* ile yapılan post hoc çoklu karşılaştırmalarda istatistiksel anlamlılık 4 grup için  $P < 0,0083$  düzeyinde değerlendirildi. Gruplarda bir sayısal değişkene olası etkisi olduğu düşünülen ‘karıştırıcı faktör’ (confounding factor) başka bir sayısal değişkenin etkisinin incelenmesinde *analysis of covariance (ANCOVA)* kullanıldı. Grup oranlarını karşılaştırmalarında *chi-square testi* kullanıldı. Değişkenler arasındaki korelasyonlar *Spearman korelasyon katsayısı ( $r_s$ )* veya *Pearson korelasyon katsayısı ( $r$ )* le incelendi. İstatistiksel anlamlılık  $p < 0,05$  (two-tailed) düzeyinde değerlendirildi.

## 4. SONUÇLAR

Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'ün demografik ve laboratuvar verileri Tablo 1 ve 2'de gösterilmiştir. Dört grubun erkek/kadın, sigara tüketimi, alkol tüketimi oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Ancak dört grubun yaş, BMI ve bel çevresi ortalamaları ile SKB ve DKB ortanca değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar saptandı (sırasıyla,  $p<0,0001$ ,  $p=0,02$ ,  $p<0,001$ ,  $p<0,0001$ ,  $p=0,004$ ). Anlamlı fark saptanan parametreler için yapılan post hoc karşılaştırmalarda yaş ortalama değerlerinin Grup 1'e kıyasla Grup 2'de anlamlı düşük ( $p<0,01$ ), Grup 3'te ise anlamlı yüksek olduğu ( $p<0,01$ ); Grup 3 ve 4'e kıyasla Grup 2'de çok ileri düzeyde istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu saptandı ( $p<0,0001$ ). BMI ortalama değerleri Grup 1'e kıyasla Grup 2'de anlamlı yüksek idi. SKB ortanca değerleri Grup 2'de diğer üç gruba göre farklı düzeylerde istatistiksel olarak anlamlı yüksek idi (sırasıyla, Grup 1'e göre:  $p<0,0001$ , Grup 3'e göre:  $p=0,008$ , Grup 4'e göre:  $p<0,0001$ ). DKB ortanca değeri ise sadece Grup 2'de Grup 1'ye göre ( $p<0,001$ ) anlamlı yüksek idi (Tablo 1).

**Tablo 1.** Gruplar arasında demografik bulguların, kan basıncı değerlerinin ve sigara/alkol tüketiminin karşılaştırılması

	<b>Grup 1 (N=37)</b>	<b>Grup 2 (N=40)</b>	<b>Grup 3 (N=41)</b>	<b>Grup 4 (N=40)</b>	<b>p</b>
Yaş (yıl)	67,1±7,7	61,4±6,3 <sup>b</sup>	72,8±8,3 <sup>b, c</sup>	72,1±8,6 <sup>a, c</sup>	< <b>0,0001</b>
Cinsiyet (E/K)	16/21	22/18	19/22	23/17	= 0,5380
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27,6±4,5	30,9±5,8 <sup>a</sup>	28,2±4,1	28,3±5,6	= <b>0,0200</b>
Bel çev. (cm)	102,4±7,6	110,3±9,6 <sup>c</sup>	103,5±8,8 <sup>d</sup>	103,7±10,3 <sup>d</sup>	< <b>0,0010</b>
SKB (mmHg)	120 (120-130)	140 (130-150) <sup>β</sup>	130 (120-140) <sup>γ</sup>	130 (122-135) <sup>δ</sup>	< <b>0,0001</b>
DKB (mmHg)	80 (75-80)	85 (80-90) <sup>α</sup>	85 (75-90)	80 (75-85)	= <b>0,0040</b>
Sigara tüketimi (%)	13,5	12,5	4,9	15,0	= 0,4840
Alkol tüketimi (%)	5,4	5,0	2,4	2,5	= 0,8470
Hipertansiyon varlığı (%)	0	80,0	48,8	50	
Periferik damar hastalığı varlığı (%)	0	2,5	2,4	0	
Kronik akciğer hastalığı varlığı (%)	2,7	0	2,4	0	
Serebrovasküler olay (SVO) varlığı (%)	0	5	0	0	
İskemik kalp hastalığı (İKH) varlığı (%)	0	30,0	17,1	15,0	
Göz operasyonu (%)	5,4	25,0	36,6	40,0	
İğne Sayısı (mode) (aflibercept/ranibizumab)		1		5	

Gaussian dağılım gösteren değişkenler ortalama±SD; non-gaussian dağılım gösteren değişkenler ortanca (25.persentil–75.persentil) olarak gösterildi. Tüm olgularda tanımlayıcı istatistik parametreleri; periferik damar hastalığı, kronik akciğer hastalığı, serebrovasküler olay, iskemik kalp hastalığı, göz operasyonu, iğne sayısı.

<sup>a</sup>Tamhane's T2 veya Tukey testi, p<0,05 vs. Grup 1, <sup>b</sup>Tamhane's T2 veya Tukey testi, p<0,01 vs. Grup 1, <sup>c</sup>Tamhane's T2 veya Tukey testi, p<0,001 vs. Grup 1, <sup>d</sup>Tamhane's T2 veya Tukey testi, p<0,01 vs. Grup 2, <sup>e</sup>Tamhane's T2 veya Tukey testi, p<0,0001 vs. Grup 2, <sup>α</sup>Mann-Whitney U testi, p<0,001 vs. Grup 1, <sup>β</sup>Mann-Whitney U testi, p<0,0001 vs. Grup 1, <sup>γ</sup>Mann-Whitney U testi, p=0,008 vs. Grup 2, <sup>δ</sup>Mann-Whitney U testi, p<0,0001 vs. Grup 2



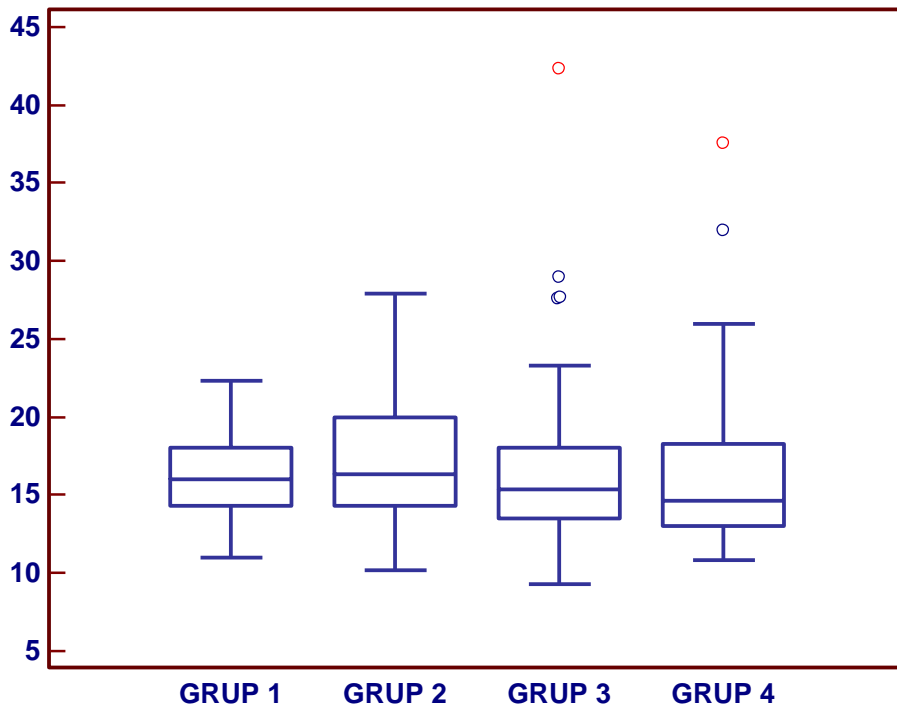
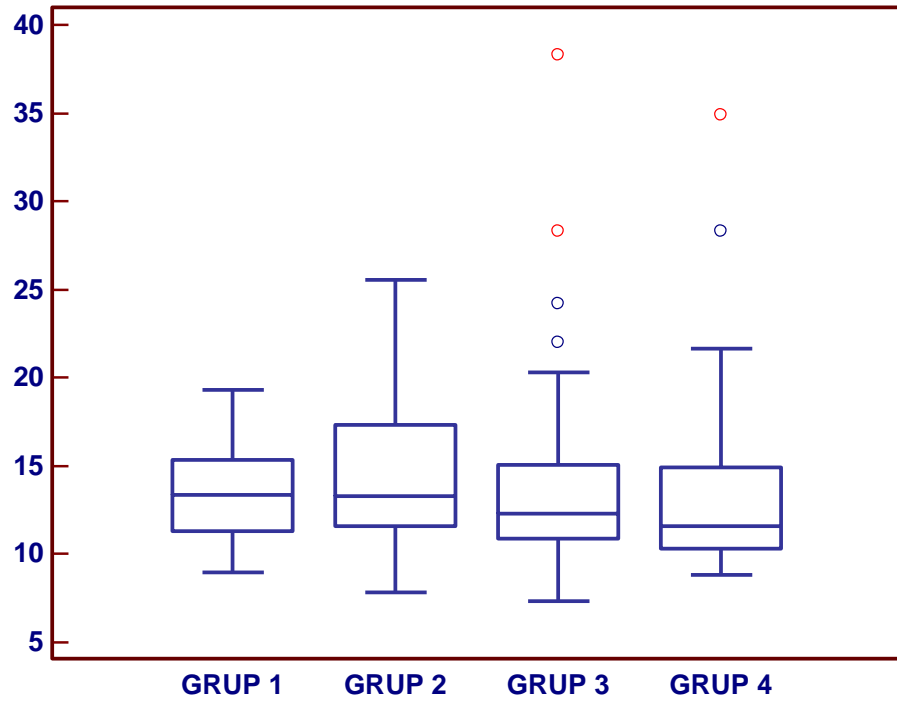
Dört grubun laboratuvar parametrelerinden albumin, eGFR, RBC, hemoglobin, hematokrit, nötrofil, NLR (oranı) ve MPs ETP ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar saptandı (sırasıyla,  $p=0,027$ ,  $p=0,047$ ,  $p<0,001$ ,  $p=0,005$ ,  $p<0,0001$ ,  $p=0,004$ ,  $p=0,045$ ,  $p=0,008$ ). Anlamlı fark saptanan parametreler için yapılan post hoc çoklu karşılaştırmalarda glukoz ortanca değerleri diyabetik retinopati olgularından oluşan Grup 2’de (beklendiği üzere), diğer üç gruba göre farklı düzeylerde istatistiksel olarak anlamlı yüksek idi. Albumin ortalama değerleri Grup 2’ye kıyasla Grup 3 ve 4’te istatistiksel olarak anlamlı yüksek idi ( $p<0,05$ ). RBC, HCT ve hemoglobin değerleri Grup 2’de diğer üç gruba göre farklı düzeylerde istatistiksel olarak anlamlı düşük idi (sırasıyla, Grup 1’e göre:  $p<0,01$ , Grup 3’e göre:  $p<0,05$ , Grup 4’e göre:  $p<0,01$ ). Nötrofil değerleri açısından 4 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark ( $p=0,004$ ), buna ilaveten WBC, NLR değerleri açısından da sınırda anlamlı fark (sırasıyla,  $p=0,056$ ,  $p=0,045$ ) bulunmuştur. Nötrofil değerleri Grup 1’de diğer üç gruba göre farklı düzeylerde istatistiksel olarak anlamlı düşük idi (sırasıyla, Grup 2’ye göre:  $p<0,001$ , Grup 3’e göre:  $p<0,01$ ). MPs ETP ortalama değerleri Grup 2’de Grup 1 ve Grup 4’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düşük idi (sırasıyla,  $p<0,01$ ,  $p<0,05$ ).

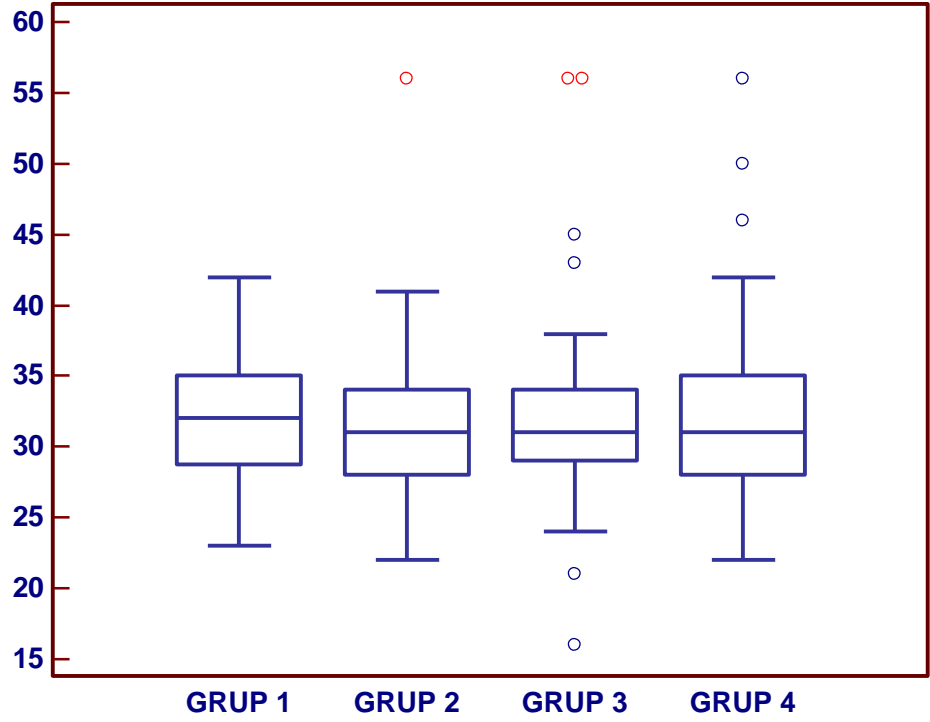
**Tablo 2.** Gruplar arasında, laboratuvar bulgularının karşılaştırılması

	<b>Grup 1 (N=37)</b>	<b>Grup 2 (N=40)</b>	<b>Grup 3 (N=41)</b>	<b>Grup 4 (N=40)</b>	<b>P</b>
Albumin (mg/dL)	4,2±0,2	4,1±0,4	4,3±0,3 <sup>c</sup>	4,3±0,4 <sup>c</sup>	= <b>0,0270</b>
ALT (U/L)	18,8±7,1	19,5±8,0	17,8±7,6	20,3±11,9	= 0,6520
Kreatinin (mg/dL)	0,77 (0,69-0,95)	0,90 (0,72-1,17)	0,85 (0,64-1,00)	0,86 (0,76-1,01)	= 0,1330
eGFR <sub>C-G</sub> (mL/dk/1,73m <sup>2</sup> )	86,2±21,1	97,4±42,2	82,1±30,5	78,2±29,2	= <b>0,0470</b>
GGT (U/L)	23 (15-30)	22 (18-32)	18 (15-28)	23 (16-37)	= 0,3330
Glukoz (mg/dL)	104 (98-109)	204 (133-305) <sup>γ</sup>	109 (100-120) <sup>δ</sup>	110 (100-120) <sup>δ</sup>	< <b>0,0001</b>
CRP (mg/dL)	0,30 (0,17-0,72)	0,40 (0,20-0,77)	0,44 (0,25-0,93)	0,29 (0,13-0,75)	= 0,4100
WBC (x10 <sup>9</sup> /L)	6,9±1,7	8,0±2,0	8,0±2,3	7,4±1,9	= 0,0560
RBC (x10 <sup>12</sup> /L)	4,8±0,5	4,3±0,6 <sup>a</sup>	4,7±0,6 <sup>c</sup>	4,8±0,4 <sup>d</sup>	< <b>0,0010</b>
Hemoglobin (g/dL)	13,7±1,7	12,3±1,8 <sup>a</sup>	13,3±1,4 <sup>c</sup>	13,2±2,1	= <b>0,0050</b>
Hematokrit (%)	40,7±4,4	36,9±5,0 <sup>b</sup>	39,9±4,0 <sup>d</sup>	40,3±3,8 <sup>d</sup>	< <b>0,0001</b>
MCV (fL)	86 (84-89)	84 (83-87)	87 (84-89)	87 (83-90)	= 0,2490
PLT (x10 <sup>9</sup> /L)	239±54	232±73	221±73	231±67	= 0,7010
Nötrofil (x10 <sup>9</sup> /L)	3,7 (3,0-4,6)	4,5 (3,9-6,0) <sup>β</sup>	4,6 (3,7-6,1) <sup>α</sup>	4,1 (3,2-5,0)	= <b>0,0040</b>
Lenfosit (x10 <sup>9</sup> /L)	2,2±0,8	2,2±0,7	2,0±0,7	2,4±0,9	= 0,1920
Nötrofil/Lenfosit (NLR)	1,92 (1,27-2,65)	2,12 (1,71-2,97)	2,37 (1,55-3,40)	1,87 (1,27-2,63)	= <b>0,0450</b>
MPs lag time (dk)	13,3 (11,3-15,3)	13,3 (11,5-17,3)	12,3 (10,8-15,2)	11,6 (10,3-15,0)	= 0,2830
MPs ETP (nmol/L•dk)	2174±639	1731±513 <sup>a</sup>	1999±539	2120±746 <sup>c</sup>	= <b>0,0080</b>
MPs Peak (nmol/L)	407,4±141,5	341,8±105,0	356,3±114,6	384,7±130,0	= 0,0920
MPs ttPeak (dk)	16,0 (14,3-18,0)	16,3 (14,3-20,1)	15,3 (13,4-18,0)	14,6 (13,0-18,3)	= 0,4210
MPs startTail (dk)	32 (29-35)	31 (28-34)	31 (29-34)	31 (28-36)	= 0,8190

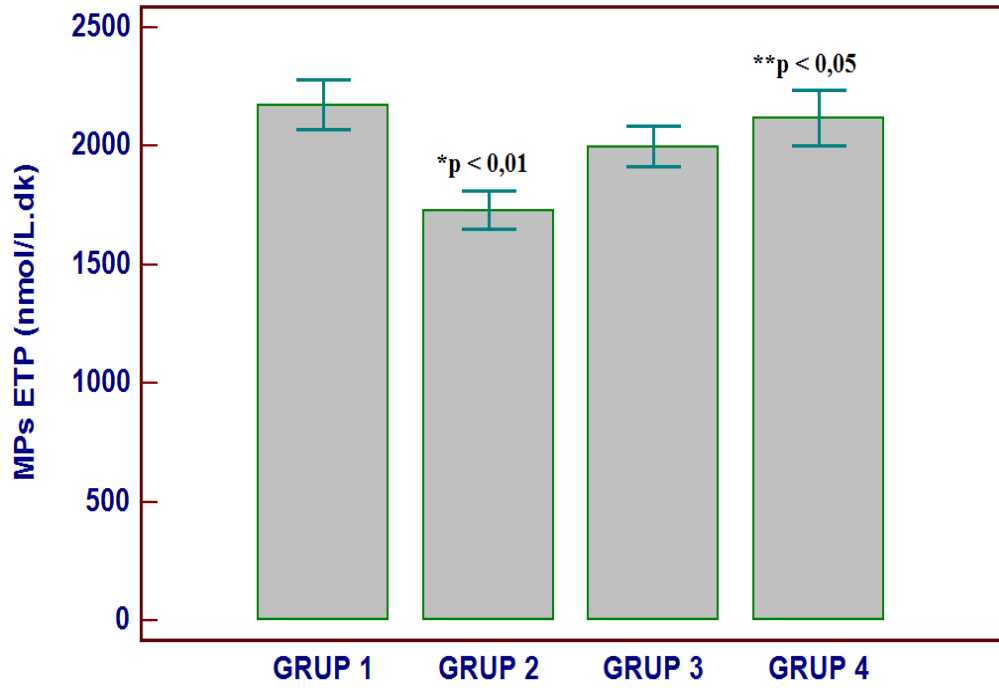
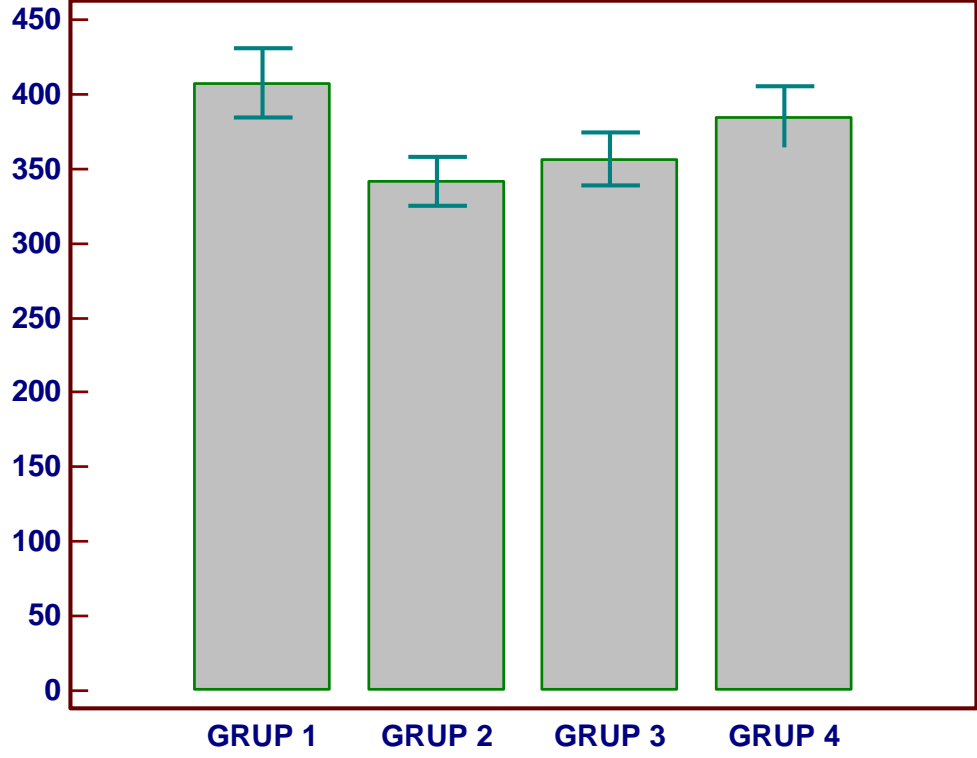
Gaussian dağılım gösteren değişkenler ortalama±SD; non-gaussian dağılım gösteren değişkenler ortanca (25.persentil–75.persentil) olarak gösterildi

<sup>a</sup>Tamhane's T2 veya Tukey testi, p<0,01 vs. Grup 1, <sup>b</sup>Tamhane's T2 veya Tukey testi, p<0,001 vs. Grup 1, <sup>c</sup>Tamhane's T2 veya Tukey testi, p<0,05 vs. Grup 2, <sup>d</sup>Tamhane's T2 veya Tukey testi, p<0,01 vs. Grup 2, <sup>α</sup> Mann-Whitney U testi, p<0,01 vs. Grup 1, <sup>β</sup> Mann-Whitney U testi, p<0,001 vs. Grup 1, <sup>γ</sup> Mann-Whitney U testi, p<0,0001 vs. Grup 1, <sup>δ</sup> Mann-Whitney U testi, p<0,0001 vs. Grup 2





Şekil 6-7-8. MPs parametrelerine (lag time, ttPeak ve startTail) ait Box-Plot çizimleri; ortanca (25.persentil–75.persentil).



Şekil 9-10: MPs parametrelerine (Peak ve ETP) ait bar grafikleri (ortalama±SE)

\* p<0,01 vs. Grup 1 \*\* p<0,05 vs. Grup 2

Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4’te MPs parametreleri (lag time, ETP, Peak, ttPeak, startTail) ile diğer demografik ve laboratuvar parametreleri arasında saptanan istatistiksel olarak anlamlı korelasyonlar Tablo 3’te gösterilmiştir. Her bir grup için tablolarda gösterilen korelasyon katsayıları ( $r$  veya  $r_s$ ) ve bağıntı yönlerine (+ veya -) ek olarak bağıntı katsayıları ve ilişkilerin dereceleri ifade edilmiştir.

**Tablo 3.** Gruplarda, MPs parametreleri (lag time, ETP, Peak, ttPeak, startTail) ile diğer demografik ve laboratuvar parametreleri arasında saptanan anlamlı korelasyonlar.

Değişkenler		Grup 1 (N=37)	Grup 2 (N=40)	Grup 3 (N=41)	Grup 4 (N=40)
Lag time	RBC	$r_s = -0,341$ $p = 0,039$			
	HCT	$r_s = -0,401$ $p = 0,014$			
	Bel Çevresi		$r_s = 0,327$ $p = 0,039$		
	DKB			$r_s = -0,365$ $p = 0,019$	
	ALT			$r_s = -0,339$ $p = 0,030$	
ETP	RBC	$r = -0,343$ $p = 0,035$			
	PLT	$r = 0,361$ $p = 0,028$			
	CRP	$r_s = 0,334$ $p = 0,043$			$r_s = 0,394$ $p = 0,012$
	Hemoglobin		$r = 0,417$ $p = 0,007$		
	HCT		$r = 0,409$ $p = 0,009$		
Peak	SKB		$r_s = -0,373$ $p = 0,018$		
	DKB		$r_s = -0,442$ $p = 0,004$		
	BMI			$r = 0,323$ $p = 0,040$	
	CRP				$r_s = 0,345$ $p = 0,029$
ttPeak	HCT	$r_s = -0,345$ $p = 0,036$			
	DKB			$r_s = -0,385$ $p = 0,013$	
	SKB			$r_s = -0,341$ $p = 0,029$	
	ALT			$r_s = -0,321$ $p = 0,041$	
startTail	RBC	$r_s = -0,348$ $p = 0,035$			
	BMI	$r_s = -0,335$ $p = 0,043$			
	DKB			$r_s = -0,365$ $p = 0,019$	
	ALT			$r_s = -0,443$ $p = 0,004$	
	CRP			$r_s = 0,341$ $p = 0,029$	$r_s = 0,330$ $p = 0,038$

$r$ : Pearson korelasyon katsayısı

$r_s$ : Spearman korelasyon katsayısı

0,25-0,50 zayıf-orta derece ilişkileri ifade etmektedir.

MPs parametrelerine yaşın olası etkisinin araştırıldığı ANCOVA analiz sonuçları ile bu parametrelerin one-way ANOVA ve Kruskal-Wallis H testleriyle yapılan çoklu grup karşılaştırma sonuçları incelendiğinde, yaşın 5 MPs parametresi üzerine anlamlı bir karşıştırıcı etkisinin olmadığı saptanmıştır (Tablo 4).

**Tablo 4.** Gruplarda, MPs parametrelerine (lag time, ETP, Peak, ttPeak, startTail) yaşın olası karşıştırıcı etkisinin araştırıldığı ANCOVA analiz sonuçları.

	<b>Grup 1</b>	<b>Grup 2</b>	<b>Grup 3</b>	<b>Grup 4</b>	<b>p</b>
MPs lag time (dk)	13,5±0,8	14,1±0,8	14,1±0,7	13,4±0,7	= 0,825
MPs ETP (nmol/L•dk)	2161±100	1661±107	2043±100	2157±100	= <b>0,003</b>
MPs Peak (nmol/L)	405,8±20,3	331,1±21,4	361,7±20,0	389,3±20,0	= 0,066
MPs ttPeak (dk)	16,2±0,8	17,0±0,8	17,1±0,8	16,4±0,8	= 0,792
MPs startTail (dk)	31,9±1,1	31,4±1,1	32,2±1,1	32,2±1,1	= 0,953

Ortalama ± standart error (SE) ve p değerleri yaşın etkisinden arındırılmış değerlerdir

Modelde kovaryantlar yaş=68,37 yıl değerine göre değerlendirilmiştir

Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'te göz kliniği ölçümleri ile diğer demografik ve laboratuvar parametreleri arasında saptanan istatistiksel olarak anlamlı korelasyonlar Tablo 5'te gösterilmiştir. Her iki AMD hasta grubunda (Grup 3, Grup 4) BCVA değerleri ile yaş arasında ters yönde ilişki gözlenmiş olup, Grup 4'te bu ilişki daha güçlüdür. Albumin değerleri ile BCVA değerleri arasında her üç hasta grubunda korelasyon gözlenmiş olup, Grup 3'te bu ilişki daha güçlüdür. Yine Grup 3'te BCVA değerleri ile kreatinin, RBC, Hb, Hct, eGFR arasında ve CMT değerleri ile BMI, sigara tüketimi, IKH, CRP, WBC, PLT değerleri arasında orta derecede ilişki olduğu söylenebilir. Grup 4'te ise BCVA değerleri ile IKH arasında görülen ilişkinin benzeri Grup 2'de de bulunmuştur. Yine Grup 4'te, CMT ile MPS parametrelerinden ikisi (lag time, ttPeak) ile pozitif yönde zayıf derecede korelasyonlar mevcuttur.

**Tablo 5.**Hasta gruplarında, göz kliniği ölçümleri ile diğer tüm demografik ve laboratuvar bulguları (MPs parametreleri dahil) arasında saptanan istatistiksel anlamlı korelasyonlar.

Değişkenler		Grup 2 (N=80)	Grup 3 (N=82)	Grup 4 (N=80)
BCVA	Yaş		$r_s = -0,315$ p = 0,031	$r_s = -0,388$ p = 0,003
	Albümin	$r_s = 0,220$ p = 0,063	$r_s = 0,355$ p = 0,014	$r_s = 0,286$ p = 0,031
	Kreatinin		$r_s = -0,294$ p = 0,045	
	CRP		$r_s = -0,246$ p = 0,095	
	RBC		$r_s = 0,413$ p = 0,004	
	Hb		$r_s = 0,356$ p = 0,014	
	Hct		$r_s = 0,378$ p = 0,009	
	eGFR		$r_s = 0,338$ p = 0,020	
	IKH	$r_s = -0,233$ p = 0,049		$r_s = -0,263$ p = 0,048
CMT	BMI		$r_s = 0,305$ p = 0,042	
	Sigara tüketimi		$r_s = -0,319$ p = 0,033	
	IKH		$r_s = -0,410$ p = 0,005	
	CRP		$r_s = -0,382$ p = 0,010	
	WBC		$r_s = -0,385$ p = 0,009	
	PLT		$r_s = -0,361$ p = 0,015	
	ttPeak			$r_s = 0,269$ p = 0,036
	lag time			$r_s = 0,243$ p = 0,059

Göz kliniği ölçümlerinde (BCVA, CMT), her bir göz ayrı hasta olarak değerlendiriliyor.

$r_s$ : Spearman korelasyon katsayısı

IKH olanlar 1, olmayanlar 0 olarak kodlanmıştır

Sigara içenler 1, içmeyenler 0 olarak kodlanmıştır



## 5. TARTIŞMA

TGT, prokoagulan ve antikoagulan maddeler arasındaki dengeyi yansıtmaktadır. CAT kullanarak çalıştığımız bu in vitro teknikle, tüm fizyolojik ve terapötik bileşenleriyle plazma örneğinde pıhtı oluşumu sırasında (koagülasyon sürecinde) zamanla ortaya çıkan (en son enzim) ve başlıca etkileyici olan trombin enzim aktivitesi değerlendirilmektedir. Bu amaçla, trombine düşük afinitesi olan florojenik substrat kullanılarak trombin aktivitesi sürekli izlenir. Trombin oluşum eğrisini şekillendirmeye katkı sağlayan koagülasyon faktörler ve inhibitörler (belirleyiciler) reaksiyon ortamına göre değişim gösterir. Bizim çalışmamızda, MP-reaktifi ile, trombin oluşum eğrisi şekillendirilmiştir.

Bu yöntemde, her bir hasta numunesi (PPP) ‘içsel-filtre etkileri’ne karşı uygun şekilde kalibre edilerek, ortamdaki hali hazırda dönüşmüş substrat molekülleri veya plazma rengi kaynaklı floresans sinyalleri bastırılır. Trombogram parametreleri ilaç ya da hastalık nedeni farklılıklar gösterir; preanalitik evrede belli koagülasyon faktörlerini ve inhibitörlerini etkileyen faktörlerin (yaş, cinsiyet, BMI, genetik faktörler, gebelik, oral kontraseptif kullanımı, vb.) iyi sorgulanması önerilir. Ayrıca, tüm verinin güvenilir bir şekilde değerlendirildiği özel bir yazılıma gereksinim vardır (40).

Trombin oluşumunu arttıran tüm mekanizmalar tromboz riskini arttırırken; buna karşılık trombin oluşumunu azaltan tüm mekanizmalar da tromboz riskini azaltır, ancak bu durumda kanama riski daha yüksek olabilir. Bu nedenle, TGT kanama veya trombotik eğilimi belirlemede önemli bilgi sağlar. Daha kısa lag time, daha büyük ETP veya yüksek Peak değerleri hiperkoagülobilite lehine yorumlanırken; uzamış lag time, azalmış ETP veya düşük Peak değerleri hipokoagülobilite (prohemorajik durum) lehine yorumlanabilir.

TGT yöntemiyle çalışmalarda, TF veya diğer bir tetikleyici ile (in vitro) koagülasyonun aktivasyonunu takiben plazma örneğinin trombin oluşturma (üretme) yeteneği ölçülür. Genel olarak pıhtılaşmaya dayalı ölçüm yöntemleri, başlangıçta trombin oluşumunun % 5'inin gerçekleştiği ilk *başlangıç* safhasını yansıtır. Sürecinin bütün olarak değerlendirildiği TGT ile, trombin oluşumunun (koagülasyonun) *ilerleme* ve *sonlanma* gibi ileri safhaları (% 100'ü) hesaba katılır (40,41).

Çalışmamızda, dört grubun yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar saptandı. Daha sonra yapılan post hoc karşılaştırmalarda, yaş ortalama değerlerinin sağlıklı kontrol grubu ve diğer hasta gruplarına göre, diyabetiklerde anlamlı düşük olduğu; kuru AMD grubunda (Grup 3) ise, sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğu gözlenmiştir. Diyabetik retinopati, sağlıklı bireylere göre daha erken yaşlarda diyabetin vasküler komplikasyonun ortaya çıktığından bu grubun hasta profili daha gençlerden oluşmaktaydı. Sonradan yaptığımız istatistiksel analiz sayesinde (Tablo 4); yaşın MPs parametreleri üzerine anlamlı bir karıştırıcı etkisinin olmadığı saptanmıştır. İnsan organizmasında bulunan vasküler sistemin yaşlanması, mikro-dolaşımda yaşa bağlı değişiklikler, venlerin yapısal bütünlüğünü kaybetmesi ve endotel fonksiyonunda bozulma ile ilişkilendirilir. Bunlara ilaveten yaşın artmasıyla birlikte prokoagülan proteinlerde (fibrinojen, FV, FVII, FVIII, FIX, vb.) artış olur, prokoagülan durum gelişir. CAT kullanılarak yetişkinlerde yapılmış olan bazı çalışmalarda, yaşın ilerlemesiyle birlikte dördüncü, beşinci dekat sonrası TGT parametrelerinde değişim olduğu gösterilmiştir (41). Her iki YBMD hasta grubunda (Grup 3, Grup 4) göz kliniği ölçümlerinden BCVA değerleri ile yaş arasında ters yönde ilişki gözlenmiş olup, Grup 4'te bu ilişki daha güçlü bulunmuştur. Ancak klinisyenlerin görüşü bu bulgunun klinik önemi olmadığı lehinedir, çünkü her iki hasta grubu da (kuru, yaş) YBMD olarak tanımlanır ve değerlendirilir. YBMD hastalarında göz kliniği ölçümlerinden CMT ile yaş arasında ilişki gözlenmemiştir.

Sağlıklı kontrol grubunda gözlediğimiz PLT sayımı ile MPs ETP ve RBC ile MPs üç parametresi (lag time, ETP, startTail) arasında gözlenen korelasyon, hasta gruplarında görülmemiştir. Tablo 1'de sağlıklı kontrol olgularında geçirilmiş katarakt operasyonu gözlenmektedir.

Antropometrik ölçüm olarak BMI açısından gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmuş, ikili karşılaştırmalarda diyabetiklerin sağlıklı kontrol grubundan yüksekliği gözlenmiştir. Bizim toplumumuzda, yaşları 5-18 arasında değişen obez çocuklarda yapılan TGT çalışmasında, obez çocuklarda lag time ttPeak kısaldığı, Peak yüksekliğinin ve ETP değerinin kontrol grubuna göre arttığı gösterilmiştir. İlginç olarak, TGT parametreleriyle metabolik parametreler (insulin ve HOMA-IR dahil) ve metabolik sendrom gelişmesi arasında hiç bir ilişki bulunamamıştır. Bu bulgular, obezlerde metabolik bozukluktan bağımsız olarak adipoz dokudan salınan yüksek adipokin düzeylerinin prokoagülan durumu uyarabileceğini göstermiştir (42). Bu çalışmadan farklı olarak bizim çalışmamızda, kontrol grubuna göre diyabetiklerde BMI anlamlı yüksek bulunmuş olsa da, MPs ETP değerleri kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur.

Diyabetik olguların bulunduğu Grup 2’de (diğer üç gruba göre farklı düzeylerde) BMI dışında, SKB istatistiksel olarak anlamlı yüksek; yaş, RBC, hemoglobin, hematokrit anlamlı düşük bulundu. Yine bu grupta, sağlıklı kontrol grubuna göre DKB istatistiksel olarak anlamlı yüksek; Grup 3 ve 4’e göre albumin anlamlı düşük bulundu. Diyabetik retinopatili olgularda elde ettiğimiz bu bulgularla birlikte olguların %80’inde HT ve %30’unda IKH oluşuyla, diyabetik hasta profili özelliklerini yansıtmaktadır. Diyabetiklerde eGFR değerleri, diğer gruplara göre daha yüksek görünse de, ikili karşılaştırmalarda anlamlı fark bulunmamıştır; yine de göze çarpan bu yükseklik, Grup 2 hasta profilinin diğer gruplardan daha genç oluşuyla ilişkilendirilebilir. Bu hasta grubumuzda idrarda mikroalbumin düzeylerini bilmediğimiz halde, eGFR değerleri diyabete bağlı böbrek fonksiyonlarında bozukluk lehine bulunmadı.

ETP, trombinin aktif olduğu dönemde gösterdiği tüm reaksiyonun performansını yansıtır ve kanama/tromboz riskini en iyi öngören parametre olarak kabul görür (40). Bizim çalışmamızda ETP değeri, diyabetiklerde sağlıklı kontrol grubuna ve Grup 4’e göre anlamlı düşük bulunmuştur. Buna karşılık, lag time ve ttPeak değerlerinde uzamaya eğilim diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da (Şekil 1 ve 2) dikkat çekici bulunmuştur. Diyabetiklerde yapılan bir çalışmada, TGT lag time, ttPeak, statTail parametrelerinde anlamlı uzama bulunmuştur (43), bizdeki MPs lag time ve ttPeak değerlerindeki uzamaya eğilim MPs varlığından ziyade, diyabetin hemostaz üzerine

etkileri/değişkenlere bağlı TGT yöntemine yansımaları olarak değerlendirilebilir. Ancak, hastaların diyabet yaşı TGT bulgularını önemli derecede etkileyebilir. Yapılan bir çalışmada, hastalarda diyabet kontrolünün kötü oluşunun (A1C > % 6.5) TGT bulguları üzerine etkisi gösterilse de, diyabet yaşının koagülasyon üzerindeki etkisi, diyabet kontrolünden daha farklı ve daha güçlü bulunmuş olup, artmış trombin üretimi, hipofibrinolizis, protrombotik pıhtılı fenotip diye özetlenebilir (44). Bizim çalışmamızda, hastaların diyabet yaşına dair güvenli veriye ulaşamadık; hasta ve hasta yakınlarının bu konuda beyanı yetersiz kalmıştır. Bu yüzden diyabet yaşının TGT parametrelerine etkisini gösteremedik, ancak diyabetiklerde bu etkiye bağlı MPs bulgularında (MPs lag time, ttPeak) değişkenliğin yüksek olduğu Şekil 6 ve 7’de gözlenmektedir. Bunlara ilaveten, diyabetiklerde aterotrombotik riskin artmasına yol açan hiperreaktif platelet fenotipin gelişmesinde birçok mekanizma yer almaktadır (45). Çalışmamızda, PPP örneği ile analiz yapıldığı için, platelet kaynaklı karıştırıcı etkinin nispeten en aza indirgenmiş olabileceğini düşünüyoruz.

Kuru tip YBMD olgularında (Grup 3) MPs parametrelerinden üçü (lag time, ttPeak, startTail) ile DKB ve ALT değerleri arasında korelasyon görülmesi, insülin direnci ve/veya metabolik stres zemininde damar endotel/duvar yapısal bütünlüğünde (olası) bozulma eğilimi ve/veya karaciğer (olası) yağlanması MPs varlığının (belki kısmen hastalığın patogenezinde) rolünü düşündürmüştür. Koagülasyon faktörlerinin çoğu karaciğerde üretilir (41). Ancak, brakial arterde akımla uyarılmış vazodilatasyon (FMD) ölçümü ile endotel disfonksiyon tespiti ve/veya batın ultrasonografi ile karaciğer yağlanmasının radyolojik bulgularla desteklenmesi ileri çalışmalarla önerilir. Üç hasta grubunda, serum albumin düzeyleri ile göz kliniği ölçümü BCVA değerleri arasında korelasyon gözlenmiş olup, Grup 3’te bu ilişki daha da güçlüdür. Bunun albuminin negatif akut faz reaktanı oluşu ve/veya beslenme/sosyo-ekonomik derecesiyle bağlantılı olabileceği düşünülmüştür. Yine Grup 3’te BCVA değerleri ile kreatinin, RBC, Hb, Hct, eGFR değerleri arasında ve göz kliniğinde diğer bir ölçüm olan CMT değerleri ile BMI, sigara tüketimi, IKH, CRP, WBC, PLT değerleri arasında orta derecede ilişki olduğu söylenebilir.

Her iki YBMD grubunda da (Grup 3, Grup 4), MPs parametrelerinden startTail ile CRP arasında korelasyon görülmüştür (Tablo 3). Ancak, yaş tip YBMD olgularında (Grup

4) MPs parametrelerinden üçü (ETP, Peak, statTail) ile CRP değerleri arasında korelasyon görülmesi, inflamasyon zemininde MPs varlığının (büyük olasılıkla hastalığın patogenezinde) rol oynamış olabileceğini düşündürmüştür. Yaş tip YBMD hastalığın gelişim sürecinde en büyük risk faktörünün yaşlanma olduğu bilinmektedir, ancak neovasküler YBMD'un patogenezi henüz tam açıklanamamıştır (30). Bu tezin 'Genel Bilgiler' bölümünde, hem PDR hem de YBMD histopatolojisinde açıklandığı üzere; anjiogenezisin başlangıcında kapiller duvarın endotel hücreleri arasında boşluklar ve endotel hücrelerinde pencereler oluşmasıyla kapillerin plazma proteinlerine ve fibrinojene geçirgen hale gelmesi, fibrin oluşumu, VEGF salınımının da etkisiyle yeni damarların oluşumu söz konusudur. Bu oluşumlar sırasında, VEGF reseptörlerin intraoküler anti-VEGF tedavi ile inhibisyonu, vasküler büyümede supresyona neden olmaktadır (12,32,46).

Kuru tip YBMD hastalarında (Grup 4) göz kliniği ölçümü BCVA değerleri ile IKH arasında görülen ilişkinin benzeri diyabetiklerde de bulunmuştur. Yine Grup 4'te, göz kliniğinde diğer bir ölçüm olan CMT ile MPs parametrelerinden ikisi (lag time, ttPeak) arasında pozitif yönde zayıf derecede korelasyon mevcuttur. Kuru tip YBMD hastalarında göz kliniği ölçüm parametreleri (BCVA, CMT) ile MPs parametreleri arasında ilişki görülmediği halde, yaş YBMD hastalarında neovaskülarizasyonla birlikte göz kliniği ölçüm parametreleri (BCVA, CMT) ile MPs parametreleri arasında ilişki görülmesi, TGT yöntemiyle elde ettiğimiz MPs hipotezimizi destekler niteliktedir. Ancak daha kapsamlı çalışmalarla, MPs parametreleri için kritik değerlerin saptanması sayesinde, klinikte biyobelirteç olarak değerli olabilir.

Dört grup arasında, nötrofil değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark ( $p=0,004$ ), buna ilaveten WBC, NLR değerleri açısından da sınırda anlamlı fark (sırasıyla,  $p=0,056$ ,  $p=0,045$ ) bulunmuştur. Ancak, yaş YBMD olgularında bu parametrelerin değeri nispeten daha düşük görünmüş olsa da, diğer hasta gruplarıyla ikili karşılaştırmalarda dikkate değer anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 2).

Yaş YBMD olgularında CRP, Nötrofil, WBC, NLR kan değerlerinin daha düşük görünmesi, son aylarda/yıllarda intraoküler anti-VEGF tedavi uygulanmış olan hastalarda, anti-inflamatuar etkiye bağlı sistemik kan bulgularıyla ilişkilendirileceğini

düşündürmüştür. Grup 4'teki yaş AMD olguların, daha önce hiç intraokuler anti-VEGF tedavi uygulanmamış hastalardan seçilmesi mümkün olmadı; bu durumda büyük olasılıkla CRP, Nötrofil, WBC, NLR kan düzeyleri daha yüksek bulunabilirdi. Hastanemizde polikliniklere başvuran ve çalışmaya katılanlar arasında daha önce tedavi almış olan yaş tip YBMD hastalarında, (aflibercept veya ranibizumab) intraoküler tedavinin uygulanma sıklığı mod olarak 5 bulunmuştur (Tablo 1), PDR ve yaş tip YBMD hastalarında kan örneği alım tarihinden en az bir ay öncesinde tedavi uygulanmış olabilir.

Pıhtılaşma ve vasküler inflamasyona ek olarak, sayısız çalışma MPs'ın vasküler proliferasyon ve anjiyogeneizde rol oynadığını göstermektedir (3). Çalışmamızın sonucunda, yaş tip YBMD olgularında, inflamasyon zemininde MPs fonksiyonel düzeylerini ölçtük ve TGT parametrelerinden üçü (ETP, Peak, statTail) ile serum CRP değerleri arasında korelasyon görüldü. Yine yaş tip YBMD olgularında göz kliniği ölçüm parametreleri (BCVA, CMT) ile MPs parametreleri arasında ilişki bulundu. Daha önce hiç anti-VEGF tedavi uygulanmamış hastaların çalışmaya katıldığı ve MPs hücre kaynağının akan hücre ölçer (flow cytometer) ile belirlendiği daha kapsamlı çalışmalarla, yaş tip YBMD olgularında neovaskülarizasyonun izlenmesinde MPs fonksiyonel düzeylerini gösteren TGT parametreleri için kritik değerlerin belirlenmesi önerilir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Nomura S. Microparticle and atherotrombotic diseases. *J Atheroscler Thromb.* 2016;23:1-9.
2. Nomura S, Shimizu M: Clinical significance of procoagulant microparticles. *J Intens Care.* 2015;3:2-11.
3. Ying Wang, Li-ming Chen and Ming-lin Liu. Microvesicles and diabetic complications — novel mediators, potential biomarkers and therapeutic targets. *Acta Pharmacol Sin.* 2014;35:433–443.
4. Stogdale L. Definition of diabetes mellitus. *Cornell Vet.* 1986 Apr;76(2):156-74.
5. Hikichi T, Fujio N, Akiba Y, et al. Association between the short-term natural history of diabetic macular edema and the vitreomacular relationship. *Ophthalmology* 1997;104:473–8.
6. Frank RN. The aldose reductase controversy. *Diabetes.* 1994; 43:169-72.
7. Cagliero E, Maiello M, Boeri D, et al. Increased expression of basement membrane components in human endothelial cells cultured in high glucose. *J Clin. Invest.* 1988; 82:735-8
8. Ashton N. Studies of the retinal capillaries in relation to diabetic and other retinopathies. *Br J Ophthalmol* 1963; 47:521–38.

9. Orledge A, D'Amore PA. Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes of smooth muscle cells. *J Cell Bio.* 1987;105:1455-62.
10. Ditzel J. Hypoxia as a pathogenic factor of microangiopathy with particular reference to diabetic retinopathy. *Acta Endocrinol* 1983; 238(Suppl):39-5.
11. Sulhvan PM, Davies EG, Cardwell G, Morris AH, Kohner EM. Retinal blood flow during hyperglycemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990;31:2041-5.
12. Aiello L, Avery R, Arrigg P, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N. Engl J Med.* 1994;331:1480-7.
13. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Report Number 9: Early photocoagulation for diabetic retinopathy, *Ophthalmology* 1991; 98:766-785.
14. Bresnick GH. Diabetic macular edema: A review. *Ophthalmology* 1986;93:989-997.
15. Bresnick GH. Diabetic maculopathy: A critical review highlighting diffuse macular edema. *Ophthalmology* 1983;90:1301-1317.
16. Best RM, Chakravarthy U. Diabetic retinopathy in pregnancy. *Br J Ophthalmol.* 1997;81:249-251.
17. Nasrallah FP, Jalkh AE, Va Coppenolle F, et al. The role of the vitreous in diabetic macular edema. *Ophthalmology* 1998;95:1335-1359.
18. Wells JA, Glassman AR, Ayala AR, et al. Comparative Effectiveness Randomized Clinical Trial of Aflibercept, Bevacizumab, or Ranibizumab for Diabetic Macular Edema. *N Engl J Med.* 2015;372:1193-203.



19. Nguyen QD, Shah SM, Khwaja AA, et al. READ-2 Study Group. Two-year outcomes of the Ranibizumab for Edema of the mAcula in Diabetes Study. *Ophthalmology*. 2010;117:2146-51.
20. Cruickshanks KJ, Hamman RF, Klein R, et al. The prevalence of age-related maculopathy by geographic region and ethnicity: The Colarado-Wisconsin study of age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol* 1997;115:242-50.
21. Ergin MH, Koçak N. Yaşa bağlı makula dejeneresansında epidemiyoloji ve etyopatogenez. *Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci* 2006; 41:1-6.
22. Vingerling JR, Dielemans I, Hofman A, et al. The prevalance of age-related maculopathy in Rotterdam study. *Ophthalmology* 1995;102:205-10.
23. Friedman DS, Kotz J, Bressler NM, et al. The Baltimore Eye Survey. Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration. *Ophthalmol*. 1999;106:1049-1055.
24. Bell S, Klein R. Smoking, alcohol intake, estrogen use, and age-related macular degeneration in Latinos: Los Angeles Latino Eye Study. *Am J Ophthalmol* 2006; 141:79-87.
25. Klein R, Klein BE, Jensen SC, at al. The 5 year incidence and progression of age related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*. 1997; 104: 7-21.
26. Evans JR. Risk factors for age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res*. 2001 Mar;20 (2):227-53.
27. Green WR. Histopathology of agr-related macular degenration. *Mol Vis* 1999;3: 27.

28. Grossniklaus HE, Green WR. Histopathologic and ultrastructural findings of surgically excised choroidal neovascularization. Submacular Surgery Trials Research Group. Arch Ophthalmol 1998; 116: 745-9.
29. Shikun H, Man Lin J, Worpel V, et al. A role of connective tissue growth factor in the pathogenesis of choroidal neovascularization. Arch Ophthalmol. 2003;121:283-288.
30. Tsutsumi C, Sonoda KH, Egashira K, et al. The critical role of ocular infiltrating macrophages in the development of choroidal neovascularization. J Leukoc Biol. 2003; 74: 25-32
31. Coscas G, Soubrane G, Koenig F. Subretinal neovascularization in senile macular degeneration. Bull Soc Belge Ophthalmol. 1984;211:43-73.
32. Wells JA, Murthy R, Chibber R, et al. Levels of vascular endothelial growth factor are elevated in vitreous of patients with subretinal neovascularisation. Br J Ophthalmol 1996;80:363-366.
33. Ku HH, Sohal RS. Comparison of mitochondrial prooxidant generation and antioxidant defences between rat and pigeon: possible basis of variation in longevity and metabolic potential. Mech Ageing Dev 1993;72:67-76.
34. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. Surv Ophthalmol 1995;39:367-374.
35. Bressler SB, Bressler NB, Alexander J, et al. Clinicopathologic correlation of occult choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. Arch Ophthalmol 1992;110:827-832.
36. Costa RA, Jorge R, Calucci D, et al. Intravitreal Bevacizumab for choroidal neovascularization caused by AMD: Results of a phase I dose escalation study. Invest Ophthalmol Vis Sci 2006;47:4569-78.

37. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, et al. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006;355:1419-31.
38. Verner-Cole EA, Davis SJ, Lauer AK. Aflibercept for the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Drugs Today (Barc)*. 2012 May;48(5):317-29.
39. Kuan Y, Hossain M, Surman J, et al. GFR prediction using the MDRD and Cockcroft and Gault equations in patients with endstage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:2394-401.
40. Castoldi E, Rosing J Thrombin generation tests. *Thrombosis Research* 2011;127 (Suppl. 3):S21–S25.
41. Favalaro EJ, Franchini M, Lippi G. Aging Hemostasis: Changes to Laboratory. Markers of Hemostasis As We Age—A Narrative Review *Seminars in Thrombosis & Hemostasis* 2014;40:621-633.
42. Şıklar Z, Öçal G, Berberoğlu M, et al. Evaluation of Hypercoagulability in Obese Children With Thrombin Generation Test and Microparticle Release: Effect of Metabolic Parameters *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 2011;17 585-589.
43. Kuliczowski W, Szewczyk M, Kaczmarski J, et al. Thrombin generation and platelet reactivity at hospital discharge and 6-month outcome after the acute coronary syndrome in diabetic and nondiabetic patients. *Cardiology*. 2014;128:25-33.
44. Konieczynska M, Fil K, Bazanek M, Undas A. Prolonged duration of type 2 diabetes is associated with increased thrombin generation, prothrombotic fibrin clot phenotype and impaired fibrinolysis. *Thromb Haemost*. 2014;111:685-93.
45. Rollini F, Franchi F, Muñoz-Lozano A, Angiolillo DJ. Platelet function profiles in patients with diabetes mellitus. *J Cardiovasc Transl Res*. 2013;6:329-45.

46. Kayıkçıoğlu Ö. Kuru tip (Non-Neovasküler) yaşı bağlı maküla dejenerasyonunda sınıflandırma ve patogenezi. Güncel retina 2017;1:105-11.



## 7. EK-1

### OLGU RAPOR FORMU

TARİH

OLGU NO:

CİNSİYET K  E  YAŞ

GEÇİRİLMİŞ GÖZ HASTALIĞI/AMELİYAT:  
KAÇINCI KEZ TEDAVİ ALIYOR:

GÖZ BULGULARI:

Görme keskinliği klinik bulguları (Best Corrected Visual Accuracy: BCVA):  
Foveal kalınlık (Central Macular Thickness: CMT):

BEL ÇEVRESİ (cm)

BOY (cm)

AĞIRLIK (kg)

SİSTOLİK TA (mmHg)

DİYASTOLİK TA (mmHg)

ALIŞKANLIK (miktar, ne kadar süredir):

ALKOL

SİGARA (paket/yıl)

ÖZGEÇMİŞ

HT   
İKH   
PERİF DAMAR HAST   
KRONİK AC   
SVO

İLAÇLAR

ACE   
ARB   
CA KANAL BLK   
DİÜRETİK   
NSAİİ   
ASA   
ALLOPURİNOL   
STERÖİD (sist)

LABORATUVAR:

GLUKOZ (mg/dL)

ALBUMİN (g/dL)

KREATİNİN (mg/dL)

GGT (U/L)

eGFR (mL/dk/1,73 m<sup>2</sup>)

ALT (U/L)

CRP (mg/dL)

MPs:

KAN SAYIMI: