

**OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

138000

**DİABETES MELLİTUS VE BUNA BAĞLI MİKROVASKÜLER
KOMPLİKASYONLARDA VEGF, MMP-9 DÜZEYLERİ VE
GLİSEMİ KONTROLÜNÜN BU FAKTÖRLERE ETKİSİ**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr.FATMA ÖZDEMİR

138000

2003

ESKİŞEHİR

I. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
II. GENEL BİLGİLER.....	3
II.1. DİABETES MELLİTUS.....	3
II.1.1. Tanımı ve Sınıflandırılması.....	3
II.1.2. Tip II Diabetes Mellitus	3
II.1.3. DM Tanısında Kriterler.....	4
II.1.4. Diabetin Vasküler Komplikasyonları	5
II.2. DİABETİK MİKROVASKÜLER KOMPLİKASYONLARIN BIYOKİMYASAL YÖNÜ.....	5
II.2.1. Polyol Yolu.....	6
II.2.2. DAG - PKC Yolu	7
II.2.3. Nonenzimatik Glükosilasyon	8
II.3. DİABETİK NEFROPATİ.....	9
II.4. DİABETİK RETİNOPATİ.....	11
II.5. V E G F	12
II.5.1. Genel Özellikleri.....	12
II.5.2. VEGF Sentezinin Düzenlenmesi	14
II.5.3. Fonksiyonel Özellikleri.....	16
II.5.3.a. Anjiogenez	16
II.5.3.b. Anjiogenez sürecinde VEGF'nin Rolü.....	17
II.6. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR	19
II.6.1. Genel Özellikleri.....	19
II.6.2. M M P-9.....	21
II.6.3. Fonksiyonel Özellikleri	22
II.7. HEMOGLOBİN A1c (HbA1c).....	24
III.MATERYAL ve METODLAR.....	26
III.1. MATERYAL	26
III.1.1. Olguların Seçimi.....	26
III.1.2. Çalışma Protokolü	27

III.2. METODLAR	27
III.2.1. Serumda Yapılan İncelemeler.....	27
III.2.1.a. V E G F ölçümü	28
III.2.1.b. M M P-9 ölçümü.....	28
III.2.2. Tam Kanda Yapılan İnceleme	29
III.2.2.a. HbA1c ölçümü.....	29
III.2.3. İdrarda Yapılan İnceleme	30
III.2.3.a. MAU ölçümü.....	30
III.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	30
IV. BULGULAR.....	31
IV.1. VEGF	31
IV.2. MMP-9.....	33
IV.3. HbA1c	35
V. TARTIŞMA	38
VI. SONUÇ	49
VII. KAYNAKLAR	51

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
SUMMARY.....	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
TABLolar DİZİNİ.....	V
GRAFİKLER DİZİNİ.....	V
KISALTMALAR DİZİNİ.....	VI



ÖZET

Diabetle ilişkili morbidite ve mortalitenin çoğu aslında mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlara bağlanabilir. Son birkaç yıldır diabetle ilişkili mikrovasküler komplikasyonların altta yatan etyolojilerinin çoğunun tanınmasında dramatik ilerleme sağlanmıştır.

Anjiogenik faktörlerin, özellikle günümüzde mikrovasküler komplikasyonların gelişiminde çok önemli bir rol oynadığı görülmektedir. Hiperglisemi, diğer büyüme faktörleri, ileri glikasyon son ürünleri ve iskemi bazı büyüme faktörlerinin ekspresyonunu artırabilir.

Büyüme faktörlerinin diabet ve diabetik mikroanjiopatideki rollerinin bilinmesi bu büyüme faktörlerinin zararlı etkilerini bloke etmeyi amaçlayan yeni terapötik yaklaşımlara yol açacaktır.

Bu çalışmada mikrovasküler komplikasyonlu ve mikrovasküler komplikasyonsuz Tip II DM hastalarında VEGF ve MMP-9 düzeylerini incelemeyi amaçladık.

VEGF ve MMP-9 serum düzeyleri ile tam kan HbA1c düzeyi 60 DM hastası ve 20 sağlıklı kontrolde saptandı. DM hastaları 5 gruba ayrıldı. Bu gruplar ;

1. Mikrovasküler komplikasyonları olmayan diabetik hastalar grubu
2. Mikroalbuminürili diabetik hastalar grubu
3. Makroalbuminürili diabetik hastalar grubu
4. Basit diabetik retinopati grubu (BDR)
5. Proliferatif diabetik retinopati grubu (PDR)

Gruplar arasındaki farklılıklar da değerlendirildi.

VEGF düzeyi DM hastalarında kontrol grubundakine göre anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0.001$). Grup 1, grup 2 ve grup 3'ün VEGF düzeyleri kontrol grubundakine göre anlamlı şekilde yüksek bulundu

(sırasıyla $p<0.05$, $p<0.001$, $p<0.01$). Grup 4 ve grup 5'in VEGF düzeyleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında yükselmişti fakat farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Beş grup arasında da farklılıklar bulundu fakat bu farklılıklar anlamlı değildi ($p>0.05$).

MMP-9 düzeyi DM hastalarında kontrol grubundakine göre daha yüksek bulundu fakat fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Beş grubun arasında farklılıklar bulundu fakat farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

HbA1c düzeyi DM hastalarında kontrol grubundakine göre anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0.001$). Beş grubun HbA1c düzeyleri kontrol grubundakine göre anlamlı şekilde yüksek bulundu (grup 1 için; $p<0.01$, diğer 4 grup için; $p<0.001$). Mikrovasküler komplikasyonları olan grupların HbA1c düzeyleri mikrovasküler komplikasyonları olmayan gruptan daha yüksek bulundu. Grup 1 ile grup 3 arasındaki farklılık ve grup 1 ile grup 4 arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $p<0.001$ ve $p<0.01$).

HbA1c ve VEGF düzeyleri arasında bir korelasyon bulundu ($r=0.317$; $p<0.01$) fakat HbA1c ve MMP-9 düzeyleri arasında korelasyon yoktu ($r=0.125$; $p>0.05$).

Bu bulgular, VEGF'nin Tip II DM ve onun mikrovasküler komplikasyonlarının patogeneğinde önemli bir anjiogenik faktör olduğunu ve HbA1c düzeylerinin serum VEGF düzeylerini etkilediğini göstermektedir.

Tip II DM tedavisinde antianjiogenik ilaçlarla yeni terapötik yaklaşımlar için daha kapsamlı çalışmalar yararlı olacaktır.

SUMMARY

Much of the morbidity and mortality associated with diabetes is primarily attributable to microvascular and macrovascular complications. Over the past several years, dramatic progress has been made in identifying many of the underlying etiologies for the microvascular complications associated with diabetes.

Angiogenic factors, in particular today appear to play a pivotal role in the development of microvascular complications. Hyperglycemia, other growth factors, advanced glycation end products and ischemia can increase several growth factors' expression.

Knowledge of the roles of growth factors in diabetes and diabetic microangiopathy will open the way to new therapeutic approaches aimed at blocking the deleterious actions of these growth factors.

In this study, we aimed to examine the levels of VEGF and MMP-9 in Type II DM patients with and without microvascular complications. The serum levels of VEGF and MMP-9 and whole blood level of HbA1c were determined in 60 DM patients and in 20 healthy controls. The DM group was divided into five groups. These groups were;

1. The group of diabetic patients without microvascular complications
2. The group of diabetic patients with microalbuminuria
3. The group of diabetic patients with macroalbuminuria
4. The group of background diabetic retinopathy (BDR)
5. The group of proliferative diabetic retinopathy (PDR)

The differences among the groups were evaluated. The level of VEGF was found to be significantly higher in the DM patients than in the control group ($p < 0.001$). The VEGF levels of group 1, group 2 and group 3 were found to be significantly higher than in the control group ($p < 0.05$,

p<0.001, p<0.01 respectively). The levels of VEGF of the group 4 and group 5 were increased as compared to control group but the differences were not statistically significant (p>0.05). Differences among the five groups were found but these differences were not statistically significant (p>0.05).

The level of MMP-9 was found to be higher in the DM patients than in the control group but the difference was not statistically significant (p>0.05). The levels of MMP-9 of the five groups were found to be higher than in the control group but these differences were not statistically significant (p>0.05).

The level of HbA1c was found to be significantly higher in the DM patients than in the control group (p<0.001). The levels of HbA1c of the five groups were found to be significantly higher than in the control group (for group1; p<0.01, for other four group; p<0.001).

The levels of HbA1c of the groups with microvascular complications were found to be higher than in the group without microvascular complications. Differences among the group 1 and group 3 and among the group 1 and group 4 were statistically significant (p<0.001 and p<0.01 respectively).

A correlation between the levels of HbA1c and VEGF was found (r =0.317; p<0.01) but no correlation between the levels of HbA1c and MMP-9 was present (r =0.125; p>0.05).

These findings suggest that VEGF is an important angiogenic factor in the pathogenesis of Type II DM and its microvascular complications and the level of HbA1c effects serum VEGF level.

More comprehensive studies would be beneficial for the new therapeutic approaches with antiangiogenic drugs in the treatment of Type II DM.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Monosit yüzeyindeki VEGF Flt –1reseptörü	14
Şekil 2. Anjiogenez basamakları	16
Şekil 3. Arteriogenezde monositlerin rolü	18
Şekil 4. Oluşan kollaterallerin büyümesi	18
Şekil 5. Zimojen MMP enzimlerinin aktivasyonu	19
Şekil 6. Plazminojen / plazmin ve MMP etkileşimleri	23

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. DM ve Kontrol grubu serum VEGF düzeyleri	31
Tablo 2. Tüm grupların serum VEGF düzeyleri	32
Tablo 3. DM ve Kontrol grubu serum MMP-9 düzeyleri	33
Tablo 4. Tüm grupların serum MMP-9 düzeyleri	34
Tablo 5. DM ve Kontrol grubu tam kan HbA1c düzeyleri	35
Tablo 6. Tüm grupların tam kan HbA1c düzeyleri	36

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. DM ve Kontrol grubu VEGF düzeyleri	31
Grafik 2. DM grupları ve Kontrol grubu VEGF düzeyleri	33
Grafik 3. DM ve Kontrol grubu MMP-9 düzeyleri	34
Grafik 4. DM grupları ve Kontrol grubu MMP-9 düzeyleri	35
Grafik 5. DM ve Kontrol grubu % HbA1c düzeyleri	36
Grafik 6. DM grupları ve Kontrol grubu % HbA1c düzeyleri.....	37

KISALTMALAR DİZİNİ

- DM** : Diabetes mellitus
- VEGF** : Vasküler endotelyal büyüme faktörü
- MMP** : Matriks metalloproteinaz
- OGTT** : Oral glukoz tolerans testi
- DAG** : Diaçilgliserol
- PKC** : Protein kinaz C
- ET-1** : Endotelin-1
- PDGF** : Trombosit kökenli büyüme faktörü
- EGF** : Epidermal büyüme faktörü
- IGF** : İnsülin benzeri büyüme faktörü
- FGF** : Fibroblast büyüme faktörü
- TGF- β** : Transforme edici büyüme faktörü β
- ECM** : Ekstrasellüler matriks
- HSPG** : Heparan sülfat proteoglikanı
- Ang II** : Anjiotensin II
- ACE** : Anjiotensin dönüştürücü enzim
- AGE** : İleri glikasyon son ürünleri
- MAU** : Mikroalbuminüri
- BDR** : Basit diabetik retinopati
- PDR** : Proliferatif diabetik retinopati
- IL-1** : İnterlökin-1
- TNF- α** : Tümör nekroz faktörü- α
- TIMP** : Matriks metalloproteinaz doku inhibitörü
- t-PA** : Doku tipi plazminojen aktivatörü
- u-PA** : Ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü

I . GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes Mellitus (DM); insülin hormon sekresyonunun ve / veya insülin etkisinin mutlak veya göreceli azlığı sonucu karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara neden olan kronik hiperglisemik bir metabolizma hastalığıdır. Amerikan Diabet Birliği'ne (ADA) göre hastalığın en basit tanısı venöz plazmadaki iki ardışık ölçümde açlık glisemi değerinin 126 mg/dl veya daha yüksek olması ile konur.

Diabetin kontrolünde 4 ana hedef vardır:

1. Diabetik semptomların olmaması
2. Akut komplikasyonların oluşmaması
3. Kronik komplikasyonların önlenmesi
4. Diabetik olmayanlarla aynı yaşam kalitesinin sağlanması.

Bu hedeflere ulaşabilmek için sıkı bir glisemi kontrolü gerekir. Kronik bir hastalık olan diabetin tedavisinin etkili olarak yapıp yapılmadığının takibi, oluşturacağı mikroanjiopatik veya makroanjiopatik komplikasyonların iyi bir şekilde izlenmesi ile mümkündür (1).

Diabetle ilişkili mortalite ve morbiditenin çoğu mikrovasküler ve makrovasküler hastalık nedeniyle ortaya çıkar. Son yıllarda bu komplikasyonların patogenezlerini açıklamada önemli ilerlemeler sağlanmıştır. Özellikle anjiogenik faktörlerin makrovasküler hastalığa cevapta olduğu gibi mikrovasküler komplikasyonların gelişmesinde de esas rol oynadığı saptanmış ve bu konu üzerindeki çalışmalar yoğunlaşmıştır (2).

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve onun katkıda bulunduğu anjiogenez birçok organda diabetik vaskülopatiyeye aracılık etmede merkezi rol oynuyor gibi görünmektedir. Meydana gelen anjiogenez olaylarına ekstrasellüler matriks de eşlik etmekte ve Matriks

metalloproteinaz (MMP) grubu enzimlerin rolü gündeme gelmektedir (3). Bu proseslerin temelindeki mekanizmaların anlaşılması yeni tedavi yollarının gelişmesine izin verecektir (4).

Bu tez çalışmasında diabetin önemli mikrovasküler komplikasyonlarından olan Diabetik nefropati ve Diabetik retinopatiye sahip hastalarda VEGF ve MMP-9 düzeylerini saptamayı, bunları mikrovasküler komplikasyonları olmayan diabetik hastalar ve sağlıklı kontrollerle karşılaştırarak komplikasyonsuz diabetteki ve mikrovasküler komplikasyonlardaki rollerini değerlendirmeyi, ayrıca HbA1c düzeylerini ölçerek glisemi kontrolünün VEGF ve MMP-9 düzeylerine ne derece etkili olduğunu görmeyi amaçladık.

II. GENEL BİLGİLER

II.1. DİABETES MELLİTUS

II.1.1. Tanımı ve Sınıflandırılması

Diabetes Mellitus; Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından “Kronik hiperglisemi” olarak tanımlanan, tam veya kısmi insülin eksikliği veya hücreler üzerinde insülin etki yetersizliği sonucu ortaya çıkan bir sendromdur (5).

WHO diabetes mellitus ve bozulmuş glukoz toleransını şu şekilde sınıflandırmıştır:

- Tip I DM (insüline bağımlı DM)
- Tip II DM (insülinde bağımsız DM)
 1. Nonobes tip II a DM
 2. Obes tip II b DM
 3. MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young)
- Bazı hastalıklar ve bozukluklara sekonder DM
- Gestasyonel DM
- Bozulmuş glukoz toleransı (5).

II.1.2. Tip II Diabetes Mellitus

Özellikle 40 yaş üzerindeki insanları etkileyen multifaktöriyel bir hastalıktır. Poligenik herediter özellikler ve çevresel faktörler klinik tablonun ortaya çıkışında önemlidir (5). Patogenezinde en azından 2 majör defekt vardır:

1. Pankreastan salınan insülinde yetersizlik (β -hücre disfonksiyonu)

2. Periferik dokularda insülin etki yetersizliği (insülin direnci).

İnsülin sekresyon yetersizliği ve insülin direnci sonucu hastalığın erken evrelerinde kısmi insülin eksikliği varken geç evrede bu durum mutlak insülin eksikliğine doğru ilerler (6). Hastalık; polidipsi, poliüri, polifaji, pruritis, ağırlık kaybı gibi belirtilerle ortaya çıkıyor olsa da çoğu kez uzun sürebilen asemptomatik bir dönemi mevcuttur ve bazen hastalar bu yakınmalardan çok retinopati, nefropati, nöropati ve aterosklerotik kalp hastalığı gibi kronik komplikasyonlarla ilgili yakınmalarla başvurabilir (1).

DM tanısı yalnızca hipergliseminin gösterilmesiyle konabilir. Ancak bazen Tip II diabetli hastalarda hiperglisemi, hastanın diabetik semptomları farkedebileceği kadar yüksek olmayabilir ve bu yüzden Tip II diabetin tanısı gecikebilir. Oysa Tip I diabetin tanısı genellikle kolaydır çünkü hiperglisemi aniden meydana gelir, şiddetlidir ve ciddi metabolik düzensizlikler eşliğinde oluşur (1).

II.1.3. DM Tanısında Kriterler

Aşağıdakilerden herhangi birinin mevcudiyeti DM için tanısaldır:

1. Diabetin klasik semptomları ve rastgele plazma glukoz

konsantrasyonu $\geq 200\text{mg/dl}$

2. Açlık plazma glukozu $\geq 126\text{mg/dl}$

3. Oral glukoz tolerans testinde (OGTT) 2.saatte plazma glukoz

konsantrasyonu $\geq 200\text{mg/dl}$

Bozulmuş açlık glukozu:

- Açlık plazma glukoz konsantrasyonu 110 - 125mg/dl

Bozulmuş glukoz toleransı:

- Açlık plazma glukozu $< 126\text{mg/dl}$
- OGTT'de 2.saatte plazma glukoz konsantrasyonu 140 –199

mg/dl (6).

II.1.4. Diabetin Vasküler Komplikasyonları

Diabetes mellitus birçok doku ve organı etkileyen kronik seyirli bir hastalıktır. Diabetin seyrinde gelişen diabetik anjiopati, nöropati, ve immun yetersizlik gibi komplikasyonların oluşumundan genellikle düzensiz glukoz regülasyonu sorumlu tutulur. Son çalışmalar komplikasyon oluşumunda genetik özelliklerin de rolü olduğunu göstermektedir. Diabetin en önemli vasküler komplikasyonları ateroskleroz, koroner arter hastalığı, periferik arter yetersizliği, serebral iskemiler, mezenterik arter yetersizliği gibi damar hastalıkları ve diabetin en önemli sonuçlarından olan diabetik nefropati ve diabetik retinopati gibi mikrovasküler komplikasyonlardır (1).

DM'da bütün mikrovasküler kan damarları tutulmasına rağmen sadece retina, renal glomerül ve muhtemelen büyük sinirlerde önemli patolojik değişiklikler olur. Özellikle bu dokuların tutulmasının nedenleri açık değildir. Mikroanjiopatinin klasik morfolojik bulgusu kapillerlerin bazal membranlarında kalınlaşmadır. Vasküler hücrelerde de spesifik değişiklikler olmakta ve birçok faktörün etkisiyle mikrovasküler komplikasyonlar şekillenmektedir (1).

II.2. DİABETİK MİKROVASKÜLER KOMPLİKASYONLARIN BİYOKİMYASAL YÖNÜ

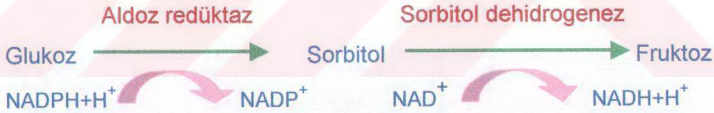
Diabetes mellituslu hastalarda doku ve organlarda biyokimyasal, morfolojik ve fonksiyonel birtakım değişiklikler meydana gelir. Akut olarak oluşan metabolik komplikasyonlar yaşamı tehdit edecek düzeyde hatta fatal olabilir ancak bugün için asıl sorun uzun sürede oluşan küçük ve büyük damarların hastalığıdır ve buna "Kronik vasküler sendrom" da denir(1).

Hiperglisemi diabetik komplikasyonların gelişiminde primer patogenetik faktör olarak saptanmıştır. Hiperglisemiye sekonder olarak

bazı biyokimyasal yollar aktive edilir. Bu aktive edilmiş yollar izole çalışmazlar ve aralarında yaygın etkileşimler oluşur. Bu yolların başlıcaları şunlardır:

- Polyol yolu
- Diaçilgliserol (DAG) -Protein kinaz C (PKC) yolu
- Nonenzimatik glikozilasyon (7).

II.2.1. Polyol Yolu : Sorbitol yolu da denen bu yol özellikle glukoz girişinin insülininden bağımsız olduğu lens, beyin, sinir dokusu, eritrosit, böbrek, karaciğer, pankreas adacıkları, aorta ve kapiller damar hücrelerinde etkindir. Bu dokularda hücre içi glukoz konsantrasyonu doğrudan doğruya kan glukoz konsantrasyonuna bağlıdır (1). Hiperglisemiye sekonder olarak intrasellüler glukoz seviyesi yükselir ve glukozun bir kısmı aldoz redüktaz enzimi tarafından sorbitole indirgenir. Sorbitol daha sonra sorbitol (polyol) dehidrogenaz tarafından fruktoza oksidize olur.



Böylece hiperglisemiye sekonder olarak polyol yoluna akış NADH/NAD⁺ oranını, hücre içi sorbitol ve fruktoz miktarını artırır. Glikolizin artması da NADH/NAD⁺ oranının artışına katkıda bulunabilir. Bu oranın yükselmesi sonucu sentezi artan DAG, PKC yolunu aktive eder (7). Aldoz redüktaz enzimi NADPH kullandığından sorbitol yolunun etkinleşmesi sonucu hücrenin NADPH tüketimi artar. Oksitleyici etkenlere karşı hücre korunmasında görev yapan indirgenmiş glutatyonun oluşumunu sağlayan glutatyon redüktaz da NADPH kullanmaktadır ve

sorbitol artışı sonucu bu yol aktive olamayacağından hücrenin oksitleyici etkenlere korunma gücü azalır. Ayrıca sorbitolün su çekici etkisi nedeniyle hücrelerde hidropik dejeneresans gelişerek hücre yapısı bozulur. Doku toksini olarak görev yapan sorbitolün retinopati, nöropati, katarakt ve nefropati patogeneğinde rolü olduğu düşünülmektedir (1).

II.2.2. DAG-PKC yolu: Son yıllarda yapılan çalışmalar PKC'nin diabetik nedenli vasküler disfonksiyonda önemli bir mediatör olduğunu göstermiştir (8). PKC; farklı enzimatik özellikler, fonksiyonlar ve dağılımlara sahip 3 izoform halinde bulunur : α , β ve γ . PKC izoformlarının; Endotelin-1(ET-1), VEGF, Trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), Epidermal büyüme faktörü (EGF), İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve Fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi bazı büyüme faktörlerinin önemli bir regülatörü olduğu gösterilmiştir. PKC diabetik komplikasyonların hedef organlarında VEGF üretiminin önemli bir düzenleyicisidir ve PKC- β izoform inhibisyonunun VEGF ekspresyonunu ve retina gibi dokularda diabetle indüklenen artmış vasküler permeabilityi önlediği gösterilmiştir (7). Böbrek mezengial hücrelerindeki VEGF üretimi de bir PKC bağımlı mekanizma üzerinden gerçekleşiyor gibi görünmektedir (9).

Böbreğin mezengial ve tübüler hücrelerinde PKC yolunun aktivasyonu, matriks birikimi ve fibrozisin en önemli mediatörü olarak bilinen Transforme edici büyüme faktörü (TGF- β) sentezinde artmayla sonuçlanır. Böbrekte PKC yolunu aktive eden faktörler yüksek glukoz ve Anjiotensin II (Ang II) düzeyleridir. Bunlar mezengial matriks metabolizmasındaki etkilerini TGF- β aracılığıyla gösterirler (10). TGF- β ekstrasellüler matriks (ECM) birikiminde anahtar bir sitokindir ve heparan sülfat proteoglikanında (HSPG) bir artış olmaksızın Tip IV kollajen, fibronektin, proteoglikanlar gibi ECM komponentlerinin üretimini stimüle

ederek defektif ECM remodelingine neden olur. HSPG/kollajen oranındaki rölatif azalmadan dolayı diabetik nefropatide heparan sülfatla ilişkili anyonik bölgelerin sayısı azalır ve bu durum albumin sızıntısına neden olur. TGF- β 'nın neden olduğu olaylar büyük damar duvarlarının media tabakasındaki ECM birikimine de katkıda bulunur (11). Yüksek glukoz ve Ang II etkisiyle mezengial hücrelerde artan TGF- β sekresyonu, kollajenazların ve diğer yıkım enzimlerinin aktivitelerinde de azalmaya neden olur. Ayrıca diabetik retinopati patogenezinin karışan bu sitokin, diabetik retinopati progresyonunu etkilemede diğer sitokinler ve büyüme faktörleri ile bir ağ oluşturur (12).

TGF- β sisteminin antagonistleri:

- Nötralize edici TGF- β antikorları
- Anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibisyonu
- PKC- β inhibisyonu
- İleri glikasyon son ürünleri (AGE) inhibisyonudur (13).

II.2.3. Nonenzimatik Glikozilasyon: Nonenzimatik glikozilasyon reaksiyonları AGE'lerin oluşumuyla sonuçlanan reaksiyonlardır. Kronik diabetik komplikasyonların patogenezinde önemli bir sekonder mekanizmayı oluştururlar (7). AGE'ler proteinlerin serbest amino grupları ile indirgenmiş şekerlerin karbonil gruplarının kompleks reaksiyonları sonucu oluşan irreversibl ürünlerdir ve bu ürünler proteinlerin, lipidlerin ve nükleik asitlerin fizyokimyasal özelliklerini değiştirirler (14).

Glukoz ve diğer şekerlerin fonksiyonel karbonil grupları proteinlerin serbest amino grupları ile önce ara form olan Schiff bazı veya Aldimin oluşturmak üzere reaksiyona girer. Aldimin daha sonra bir Ketamin oluşturmak üzere Amadori yeniden düzenleme reaksiyonuna girer. Aldimin labildir ve hidrolize olup serbest amino grubu ve karbonil grubunu yeniden oluşturabilir oysa ketamin stabildir ve onun oluşumu

irreversibldir. Ekstrasellüler glukoz konsantrasyonu ile orantılı olarak meydana gelen nonenzimatik protein glikozilasyonu kırmızı kan hücreleri, böbrek glomerülü, sinir hücreleri ve diğer dokularda yaygın şekilde oluşur ve aşırı glikozilasyon proteinin fiziksel ve biyokimyasal özelliklerinde önemli değişikliklere neden olur. Örneğin bir lens proteini olan alfa-kristalin'in glikozilasyonu onun çözünürlüğünü azaltır, IgG'nin glikozilasyonu fonksiyonunu etkileyerek enfeksiyonlara duyarlılığı artırır. Kan damarlarının bazal membran proteinlerinin glikozilasyonu diabetiklerin çoğunda bazal membran kalınlığının artmasına neden olur (15).

Sirkülasyonda bulunan en önemli glikozile protein Amadori glukoz eklenmesiyle modifiye edilen albumindir (16).

İn vitro deliller AGE'lerin IGF-I ve TGF- β 'yı içeren çeşitli büyüme faktörlerinin sentezini stimüle ettiğini göstermektedir (13,17).

AGE'lerin diabetik nefropati ve diabetik retinopatideki rolleri üzerine yapılan araştırmalar, diabet boyunca böbrek glomerüllerindeki yapısal değişikliklere AGE birikimini içeren bazı biyokimyasal anormalliklerin eşlik ettiğini göstermiştir. Diabetik ratlarda yapılan immunohistokimyasal çalışmalarda glomerüler bazal membran, mezengium, podositler ve renal tübüler hücrelerin yüksek seviyede AGE içerdiği saptanmıştır. AGE birikiminin glomerüloskleroza ve diabetikte yaygın disfonksiyonlara neden olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca AGE'lerin vücuttaki diğer vasküler yataklara benzer şekilde diabetik retinal damarlarda da lokalize olduğu görülmüş ve bazı retinal patolojilerden sorumlu olabileceği bildirilmiştir (18).

II.3. DİABETİK NEFROPATİ

Diabetik nefropati batı dünyasındaki son dönem böbrek yetmezliğinin en yaygın nedenlerinden biridir. Patogenezinde büyüme

faktörlerinin de rolü olduğu ileri sürülmektedir. Diabetik böbrek hastalığının erken karakteristik değişiklikleri renal büyüklükte artma, glomerüler hacimde artma ve hiperfiltrasyondur (13). Renal kan akımındaki artışı sağlayan olay afferent ve efferent glomerüler arteriollerin vazodilatasyonudur. Bu değişiklikleri takiben glomerüler bazal membran kalınlaşması ve glomerülosklerozun habercisi olan mezengial matrikste bir artış meydana gelir. Bazal membranın Tip IV kollajen komponentleri artarken heparan sülfat proteoglikanının azalmasıyla albumin gibi anyonik moleküllere bazal membran geçirgenliği artar. Geçirgenliğin artmasında bazal membran komponentlerinin glikozilasyonu da rol oynar. Glomerüler bazal membran kalınlaşmasının membran sentezinde artışa bağlı olduğu düşünülür. Azalmış bazal membran yıkımına dair bir kanıt yoktur (19). Nefropatinin en erken klinik laboratuvar bulgusu idrarda mikroalbuminüri (MAU) olarak adlandırılan albuminin nispeten düşük ancak anormal seviyelerinin ($\geq 30\text{mg/gün}$ veya ≥ 20 mikrog/dk) görülmesidir.

	24 saatlik toplama (mg/24 saat)	Sürelili toplama (mikrog/dk)
Normal	<30	<20
MAU	30-299	20-199
Klasik albuminüri	≥ 300	≥ 200 (20).

Hastalık ilerledikçe böbreklerde glomerüloskleroz gelişir ve genişleyen mezengial matriks subendotelyal alana ve glomerüler kapiller lümene yayılır ki bu da glomerüler kan akımı ve filtrasyonda bir azalmayla sonuçlanır. Progresif renal hastalık; ağır proteinüri, kan basıncı yükselmesi ve yoğun insülin tedavisiyle düzelmeyen azalmış glomerüler

filtrasyon hızı ile karakterizedir. Kreatinin klirensi 20ml/dk' nın altına düştüğünde dializ veya böbrek transplantasyonu planlanmalıdır (19).

II. 4. DİABETİK RETİNOPATİ

Diabetik retinopati; Tip I ve Tip II diabetin her ikisinde ortaya çıkabilen oldukça spesifik bir vasküler komplikasyondur. Retinopati prevalansı diabet süresiyle yakından ilişkilidir. Hastalığın 20. yılından sonra Tip I diabet hastalarının hemen hemen tümü, Tip II diabet hastalarının %60'dan fazlası retinopatinin bazı derecelerine sahiptir. Diabetik retinopati, görmeyi ciddi şekilde tehdit eden bir komplikasyondur. 20 - 74 yaş arası erişkinlerdeki yeni gelişen körlük vakalarının en sık sebebi olduğu tahmin edilmektedir (20).

Diabetik retinopatedeki erken ve karakteristik değişikliklerden biri böbrek gibi diğer organlarda da görüldüğü şekilde kapiller bazal membran kalınlaşmasıdır. Bunun gelişimine neden olan etkenlerin nonenzimatik glikozilasyon, azalmış bazal membran proteoglikanları ve artmış bazal membran protein sentezi olabileceği ileri sürülmektedir. Retinopatinin prelinik evreleri boyunca görülen diğer bir mikroskobik bulgu kapiller perisitlerin kaybıdır. Perisit kaybı, patogeneizde önemli bir olaydır ve retinopati seyrinde gelişecek sonraki olayların habercisi olan vasküler akım değişikliği ve endotelial hücre proliferasyonu bu olay sonucu meydana gelir (7).

Diabetik retinopati genellikle şu şekilde sınıflandırılır:

- Basit (background) diabetik retinopati (BDR)
- Proliferatif diabetik retinopati (PDR)

Bu formlar muhtemelen aynı patofizyolojik proseslerin farklı evrelerini gösterir (19).

Basit retinopatede görülen lezyonlar; artmış kapiller permeabilite, kapiller dilatasyon ve tıkanmalar, perisit kaybı ve endotelial proliferasyon

sonucu geliřtiđi dūřūnūlen mikroanevrizmalar, arteriovenöz řantlar, hemorajiler, yumuřak ve sert eksudalar ve mikroinfarktū alanlarıdır. Proliferatif retinopati ise neovaskūlarizasyonlar, skar oluřumu, vitreal hemoraji ve retinal ayrılma ile karakterizedir. Neovaskūlarizasyonun, kapiller tıkanmalar sonucu oluřan iskemiye sekonder bir mekanizma olduđu dūřūnūlūr. Bu olayda lokal bir kapiller būyūme faktōrünün rolū olabileceđi ileri sūrūlūr. VEGF'nin bu konuda aday bir faktōr olabileceđi dūřūnūlmektedir (19,21).

Diabetik retinopatiye bađlı gōrme kaybı birkaç mekanizma ile olur: Őncelikle santral gōrme makūler Ődem veya kapiller perfūzyon yokluđu nedeniyle bozulabilir. PDR'deki yeni kan damarları ve eřlik eden fibröz dokunun kasılması retinal ayrılmaya ve geriye dōnūřsūz gōrme kaybına neden olabilir. Son olarak, yeni oluřan kan damarları preretinal ve vitrōz kanama komplikasyonuna sebep olacak řekilde kanayabilir (20).

Bu sebepler arasında gōrme kaybına neden olan en Őnemli olay makūler Ődemdir. Makūler Ődem, retinal pigment epiteli ve retinal vaskūler endotelden oluřan kan-retina bariyerinin yıkılmasının sonucu oluřan ve artmıř retinal mikrovaskūler permeabiliteye bađlı bir patolojidir (22,23). PDR iēin en etkili tedavi lazer ile fotokoagūlasyondur. Lazer yeni kapillerleri, sızıntılı damarları ve mikroanevrizmaları harabeder, retinal Ődemi ve kanama riskini azaltır (19).

II.5. VASKūLER ENDOTELYAL BūYūME FAKTōRū (VEGF)

II.5.1. Genel Özellikleri

Vazopermeabilite faktōrū ve vaskūlotropin olarak da bilinen VEGF, gūēlū vaskūler permeabilite artırcı ve anjiogenik etkileri olan 45 kDa'luk homodimerik bir glikoproteindir. VEGF ekspresyonu ilk olarak oldukēa yūsek vaskūlariteye sahip, hızlı būyūyen tūmōrlerde tanımlanmıř ve VEGF endotelial hūcreler iēin gūēlū bir mitojenik faktōr olarak gōsterilmiřtir (2). Histamine gōre 50.000 kat daha fazla olan

vasküler permeabilite artırıcı özelliğinden dolayı Vazopermeabilite Faktörü olarak adlandırılmıştır (4).

İnsanlarda farklı mRNA bağlanmaları sonucu, disülfid bağlarıyla bağlı homodimerlerin oluşturduğu 5 VEGF izoformu üretilir: VEGF 121, VEGF 145, VEGF 165, VEGF 189, VEGF 206 (7).

Hücreler hakim form olarak VEGF 165 başta olmak üzere birçok izoformu aynı anda eksprese edebilirler (7,13). VEGF 121 ve VEGF 165 en çok bulunan ve anjiogenez oluşturmada en etkin olan izoformlardır ve sekrete edildiklerinden dolaşıma da geçerler. Halbuki diğer izoformlar ekstrasellüler matrikste depolanır ve dolaşıma çok az miktarda geçer (24).

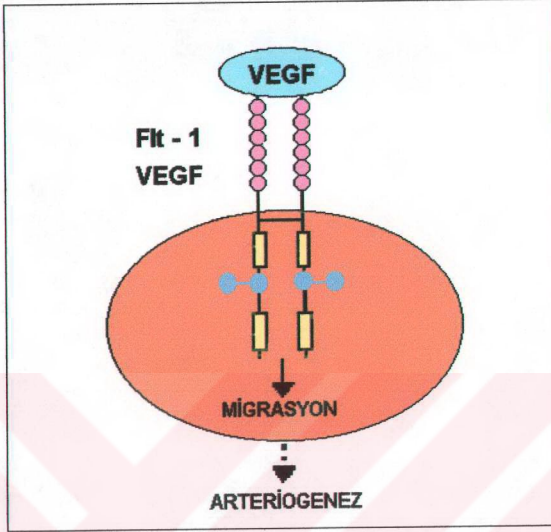
VEGF, heparin bağlayıcı bir büyüme faktörüdür ve aktivitesi heparin-bağımlı gibi görünmektedir; çünkü VEGF'nin hücre yüzeyine bağlanması heparin ile artırılır. Heparin bağlayıcı özelliğinden dolayı heparan sülfat proteoglikanına da bağlanır ve bu proteoglikan VEGF için ekstrasellüler bir depo olarak fonksiyon görebilir (25). Sadece VEGF 121'in heparin bağlama yeteneği yoktur (7).

VEGF aktivitesi yüksek afiniteli tirozin kinaz reseptörleri tarafından düzenlenir.

180 kDa fms like tirozin kinaz (Flt-1) → VEGF R1

200 kDa fetal liver kinaz-1 (KDR/Flk-1) → VEGF R2

Son zamanlarda nörofilin-1'e özdeş 3. bir reseptör saptanmıştır. Nörofilin-1 endotelial hücreler için yüksek mitojenik etkisi olan VEGF 165 için spesifiktir ve onun KDR/Flk-1'e bağlanmasını ve sonraki biyoaktivitelerini düzenler. Bu da 165 aminoasitlik izoformun niçin en güçlü mitojen özelliğe sahip izoform olduğunu açıklayabilir (24). Damar duvarında Flt-1 hem endotelial hücrelerde hem de monositlerde bulunurken KDR sadece endotelial hücrelerde bulunur (26).



Şekil 1: Monosit yüzeyindeki VEGF Flt-1 reseptörü

VEGF monositlerde bulunan Flt-1 reseptörü aracılığıyla monosit migrasyonunun güçlü bir uyarıcısı olarak fonksiyon görür (26) (Şekil 1).

VEGF'nin antiapoptotik, endotelial hücre bölünmesi ve migrasyonunu artırıcı etkileri de bu iki reseptörü sayesinde gerçekleştirilir (27). VEGF ve VEGF reseptörleri normal embriyonik gelişim için son derece önemlidir ve genlerin heterozigot hasarları bile mikro ve makrovasküler yapıların ölümcül hasarı ile sonuçlanır (2).

II.5.2. VEGF Sentezinin Düzenlenmesi

Bütün dokuların VEGF üretmek için potansiyele sahip olduğu sanılmaktadır (28). Gözde retinal pigment epitelyal hücreler, perisitler, endotelial hücreler, Mueller hücreleri ve astrositler VEGF üretme yeteneğine sahiptir (29). Böbrekte de çok miktarda VEGF

sentezlenmekte olup glomerüler podositler başta olmak üzere distal tübülüs ve toplayıcı kanallarda da sentezlenir (8).

VEGF üretimini stimüle edici faktörler şunlardır:

- Hipoksi
- Hiperglisemi
- Kan basıncı yükselmesi
- Vazopressin ve Ang II gibi vazopressör hormonlar
- İleri glikasyon son ürünleri (AGE)
- Mekanik gerilme
- TGF- β , IGF-1 , bFGF , PDGF (30,31).

VEGF'nin en güçlü stimülatörü hipoksidir (13). VEGF mRNA ekspresyonunun hipoksiye maruz kalan veya in vitro olarak hipoksi oluşturulan pekçok hücre çeşidinde belirgin olarak arttığı gösterilmiştir. Bu olay ; hem içeren, oksijen algılayıcı bir reseptörün aktivasyonu yoluyla oluşur ve sonuçta transkripsiyon faktörü olan hipoksi uyarılabilirlik faktörü-1 (HIF-1) aktive edilerek VEGF geni promoter bölgesindeki bir hipoksi cevap elementine bağlanır. VEGF'nin transkripsiyonel aktivasyonu bu bağlanma ile düzenlenir (27,28). IL-1 ve TNF- α gibi sitokinlerin DNA'ya HIF-1 bağlanmasını artırarak VEGF gen ekspresyonunu stimüle ettiği ileri sürülür. Hipoksiye cevap olarak Flt-1 ve KDR üretimi de artar fakat bu artış VEGF artışından daha azdır (28).

Bütün bu özellikleri VEGF'nin diabetik retinopati gibi hipoksiyle indüklenen hastalıklardaki neovaskülarizasyonu regüle edebileceğini düşündürür. Nitekim oküler hücre kültürlerinde VEGF mRNA ekspresyonunun hipoksi ile indüklenebildiği ve normoksinin yeniden sağlanması ile bu olayın tersine çevrildiği gösterilmiştir (4). VEGF üretimi üzerine hipergliseminin etkileri de araştırılmış ve yüksek glukoz

konsantrasyonunun muhtemelen PKC stimülasyonu üzerinden vasküler düz kas hücrelerinde VEGF üretimini stimüle ettiği gösterilmiştir (13).

II.5.3. Fonksiyonel Özellikleri

VEGF embriyonik vaskülogenezin normal gelişimi, kadın reproduktif siklusunda kan damarlarının siklik büyümesi ve yara iyileşmesi boyunca kapillerlerin oluşumu için gerekli bir büyüme faktörüdür. Bunun dışında proliferatif retinopatiler, romatoid artrit, psoriasis ve malignitelere görülen anormal anjiogenezde de rol oynar. Etkisini parakrin bir yol üzerinden gösterir (28).

II.5.3.a. Anjiogenez

Yeni kan damarı oluşumu 2 yolla olur:

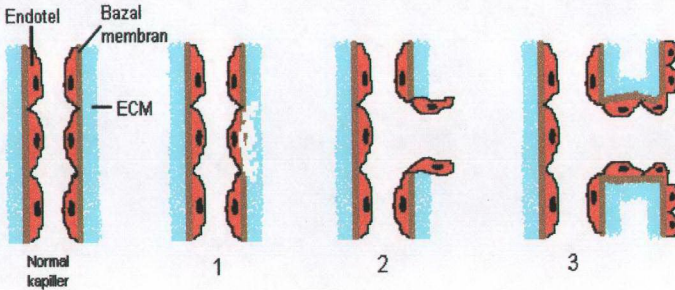
1-Vaskülogenez

2-Anjiogenez

Anjiogenez ; embriyonik dönemde görülen ve kök hücrelerin farklılaşmasından meydana gelen vaskülogenezden farklı olarak varolan damarlardan yeni damarların oluşmasıdır ve invaziv bir süreçtir (3).

Anjiogenez 3 temel basamakta meydana gelir:

1. Bazal membranın degradasyonu ve ECM'nin proteolizi
2. Endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonu
3. Yeni damar oluşumu



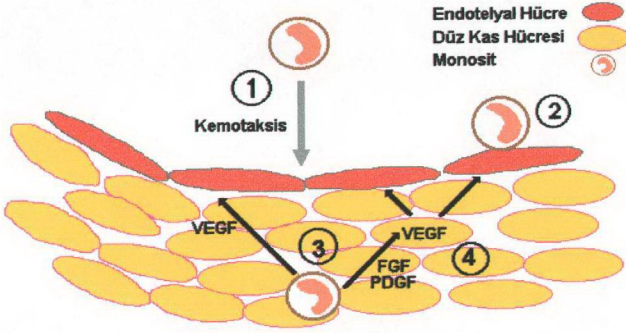
Şekil 2: Anjiogenez basamakları

İlk adım genellikle damardaki dilatasyondur. Sonrasında salınan kollajenazlar ve diğer proteolitik enzimlerle bazal membran inceltilmeye ve porlar daha da genişlemeye başlar. ECM proteinlerinin de yıkıma uğramasıyla endotel hücreleri belirlenen yolda ilerleyip yeni sentezlenen ECM üzerinde düzenli bir şekilde sıralanır. Yeni oluşan bu damar lümenine daha sonra kan akımı başlar ve anjiogenez tamamlanmış olur (32) (Şekil 2).

II.5.3.b. Anjiogenez sürecinde VEGF'nin rolü

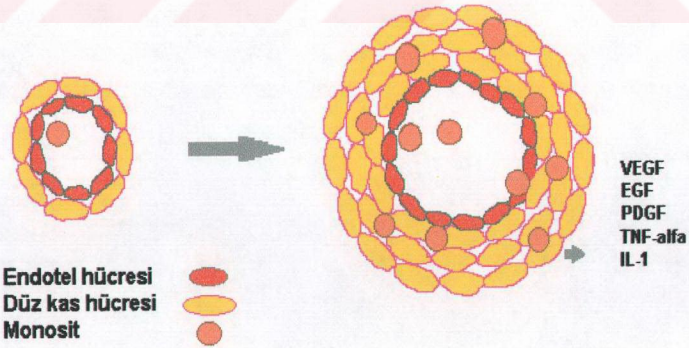
VEGF hem in vitro (hücre kültürü) hem de in vivo olarak endotelyumdaki fenestrasyonları indükleyerek vasküler permeabiliteyi artırır ve bunun ardından da endotelial hücrelerin büyümesi için destek sağlayan fibrin jelinin oluşumuna neden olan kan proteinlerinin ekstravazasyonu gerçekleşir (7). Antonetti ve arkadaşları deneysel diabette vasküler permeabilite artışının endotelial hücreler arasındaki bir sıkı bağlantı proteini olan endotelial Occludin'in azalmasıyla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (9). Artmış vasküler permeabilite sonucu plazminojen de damar dışına sızar. MMP sistemi ile birlikte bazal membran ve ECM'nin yıkımına katkıda bulunur (33).

Anjiogenezin sonraki basamağı olan endotelial hücre proliferasyonu ve migrasyonu için yine VEGF aktivitesine ihtiyaç vardır. Çünkü VEGF endotelial hücre selektif bir mitojen olarak bilinmektedir. Proliferasyon ve migrasyon sonucu olay yeni kapiller oluşumuna doğru ilerler. Tüm bu süreçler sonucu oluşan yeni kapillerler, uygun kollateral kan akımına izin vermek için çaplarında büyümeye ihtiyaç gösterirler ki bu olay "Arteriogenez" olarak bilinir. Arteriogenezin önemli bir özelliği büyümekte olan damar içine monositlerin infiltrasyonudur. VEGF monositlerin yüzeyindeki Flt-1 reseptörü aracılığıyla monosit migrasyonu için spesifik bir stimulus olarak aktivite gösterir (26).



Şekil 3: Arteriogenezde monositlerin rolü

Damar duvarı içine infiltre olan monositler VEGF, FGF-2, PDGF, EGF, TNF- α , IL-1 gibi bazı sitokin ve peptid büyüme faktörlerini üretir. Bu hücrelerde üretilen VEGF ve FGF-2 endotel hücreleri üzerinde direkt etki gösterir. PDGF ve diğer faktörler de düz kas hücrelerinde direkt aktivite ile proliferasyon ve migrasyonu stimüle ederler. Bu faktörler aynı zamanda düz kas hücrelerinde VEGF transkripsiyonunu artırır ve sonuçta oluşan damarların büyüme süreci olan arteriogenezi ilerler (26) (Şekil 3,4).



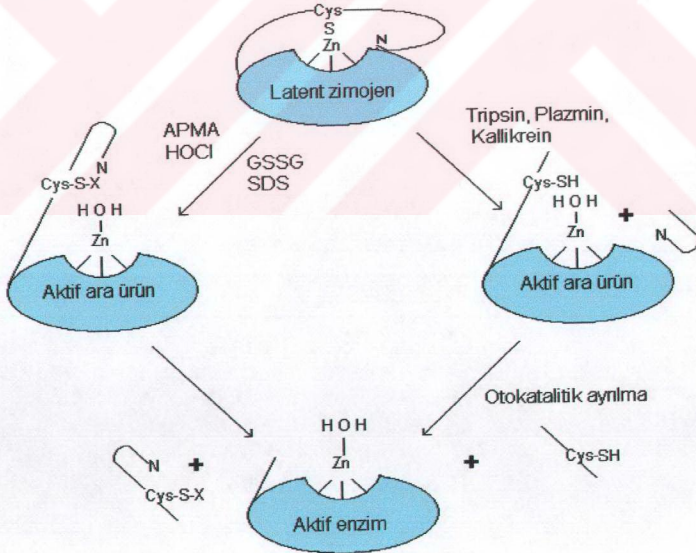
Şekil 4: Oluşan kollaterallerin büyümesi

II.6. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR

II.6.1. Genel Özellikleri

MMP'ler fizyolojik ve patolojik durumlardaki konnektif doku remodelinginde rol alan, nötral pH'da aktivite gösteren ve ECM komponentlerinin çoğunu degrade edebilen Zn^{2+} ve Ca^{2+} bağımlı endopeptidazlardır. Matriksin ailesi olarak da bilinirler (34).

Molekül ağırlıkları 28.000 – 92.000 dalton arasında değişir. Ailenin tüm üyeleri inaktif zimojenler olarak sekrete edilirler. Aktivasyon sırasında amino-terminal propeptidlerin ayrılmasıyla 10.000 dalton civarında peptid kaybına uğrarlar. Bu zimojen enzimlerin latent durumunu sağlayan; aktif merkezdeki çinkoya bağlanan korunmuş sistein rezidüsüdür. Sistein rezidüsünün çinkodan koparılmasıyla aktivasyon gerçekleştirilir (35) (Şekil 5).



Şekil 5: Zimojen MMP enzimlerinin aktivasyonu

Ekstrasellüler alanda aktivasyonu gerçekleştiren etkenler plazmin, tripsin, kimotripsin, kallikrein, katepsin veya nötrofil elastaz ve diğer MMP'leri içeren bazı proteinazlardır. İn vitro olarak 4-aminofenil merkürük asetat (APMA), hipokloroz asit (HOCl), oksidize glutatyon (GSSG), ve denatüranlar (üre, sodyum dodesil sülfat (SDS)) gibi non-proteolitik ajanlar tarafından da aktivasyonunun gerçekleştirildiği gösterilmiştir (33).

Günümüzde MMP ailesinin 23 üyesi saptanmış, yapıları ve substrat spesifitelerine dayanılarak 5 sınıfa ayrılmıştır. Bunlar;

1. Kollajenazlar
2. Jelatinazlar
3. Stromelisinler
4. Membran tipi MMP'ler (MT-MMP)
5. Diğerleri

Herbir MMP farklı bir gen tarafından kodlanır ve ECM bileşenlerinin çoğunu degrade etme yeteneğine sahiptir (33). Bu enzimler epitelial hücreler, fibroblastlar ve inflamatuvar hücrelerin de dahil olduğu çeşitli hücre tiplerince üretilirler. Endotelial hücrelerde de bazı MMP tipleri üretilir ki bunlar MMP-1, MMP-2, MMP-9 ve MT-1-MMP'dir (3).

MMP'lerin regülasyonu çoğunlukla büyüme faktörleri veya sitokinler tarafından gen transkripsiyonu seviyesinde ve ayrıca posttranskripsiyonel olarak doku inhibitörleri (TIMP'lar) ile düzenlenir. EGF, bFGF, interferon α , β , γ , interlökin 1α , β , PDGF, TNF- α gibi sitokinler ve büyüme faktörleri MMP ekspresyonunu artırırken retinoidler , glukokortikoidler ve TGF- β inhibe eder (35,36).

MMP'lerin aktiviteleri başlıca inhibitörleri olan TIMP'lar tarafından düzenlenir. TIMP ailesi 4 ayrı üyeden oluşur: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4. Bunların tümü 6 disülfid bağıyla birbirine bağlanan 12 sistein

rezidüsüne sahiptir ve NH₂-terminal bölgeleri MMP inhibitör aktiviteleri için gereklidir. MMP'lerin korunmuş aktif çinko bağlayıcı bölgesine nonkovalent olarak bağlanarak onları inhibe ederler. TIMP'lar birçok hücre tipi tarafından eksprese edilirler. Çoğu dokuda ve vücut sıvılarında mevcuttur (37). 28.5 kDa'luk bir glikoprotein olan TIMP-1; bütün aktive MMP'lerle ve pro-MMP-9 ile 1:1 kompleks formu oluşturur. 21 kDa'luk nonglikozile bir protein olan TIMP-2 ayrıca pro-MMP-2'ye bağlanır (38). MMP'lerin diğer inhibitörü ise α_2 -makroglobulindir. Bu enzimlere kovalent bağlanarak onların yapısını değiştirir, kollajeni ve diğer matris makromoleküllerini parçalamalarına engel olur (35).

II.6.2. MMP-9

Jelatinazlar sınıfına dahil bir endopeptidazdır. Jelatinazlar iki üyeden oluşur: MMP-2 (Jelatinaz A, 72 kDa tip IV kollajenaz), MMP-9 (Jelatinaz B, 92 kDa tip IV kollajenaz) (34).

Bunlar bazal membranın ana komponentlerinden biri olan tip IV kollajeni degrade ederler. Hem latent hem de aktive formların jelatine yüksek bir afinitesi vardır. MMP-2 ayrıca fibronektini de parçalar (39). Fizyolojik olarak MMP-2 fibroblastlar tarafından üretilirken MMP-9 başlıca nötrofiller ve makrofajlar tarafından üretilir (40). MMP-9; MMP ailesinin en büyük üyesidir. Sinyal peptidi, aktivasyon sırasında kaybolan bir propeptid, bir aktif enzim bölümü, fibronektin benzeri bölüm, Zn²⁺ atomu bağlayıcı bölüm, Tip IV kollajen benzeri bölüm ve bir COOH - terminal hemopeksin benzeri bölüm olmak üzere 7 bölümden oluşur. Ailenin diğer üyeleri bu bölgelerin bazılarında yoksundur. Fibronektin benzeri bölümün, 2 jelatinazın substratları olan jelatinlere bağlanmasını kolaylaştırdığına inanılır. Kollajen benzeri bölümün fonksiyonu bilinmemektedir. Hemopeksin benzeri bölümün substrat spesifitesini belirlemeye yardımcı olduğu düşünülmektedir (35).

II.6.3. Fonksiyonel Özellikleri

ECM moleküllerinin birini ya da daha fazlasını degrade etme yeteneğine sahip olan MMP'ler muhtemelen embriyonik gelişme, doku remodelingi ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik durumlarda olduğu kadar romatoid artrit, tümör invazyonu gibi pekçok patolojik durumda da önemli rol oynarlar (41). Hipoksi ve inflamasyon gibi durumlara yanıt olarak başlayan anjiogenez olayının erken evresinde MMP'lerin rolü olduğu düşünülmektedir. Çünkü bazal membran endotelial hücrelerin geçiş anjiogenik yanıtı başlatacakları ilk engeldir ve ayrıca ECM endotelial hücre invazyonu için bir bariyer olarak görülür. MMP aktivitesinin birincil görevi bu bariyerleri ortadan kaldırmak ve endotelial migrasyona izin vermektir. MMP aktivitesinin endotelial hücre fonksiyonları ile olan geçici ilişkileri anjiogenik fenotipi belirler. Bu fonksiyonlar endotelial hücrenin ECM'ye yapışması, ayrılması, migrasyon ve invazyon olaylarıdır. MMP'lerin anjiogenez olayında rol oynadıklarına dair en iyi kanıt sentetik ve endojen MMP inhibitörlerinin hem in vitro hem de in vivo olarak anjiogenik yanıtları inhibe etmeleridir (3).

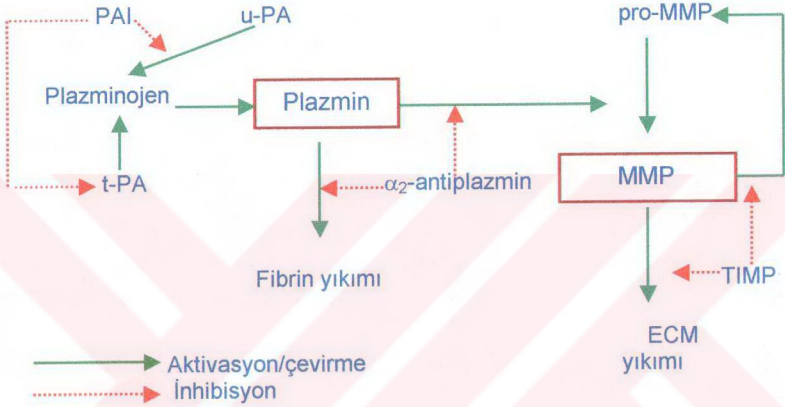
MMP'ler ECM'deki proteolitik etkilerini vasküler permeabilite artışı sonucu matrikse geçen plazminojen/plazmin sistemiyle birlikte gerçekleştirirler. Kan fibrinolitik sisteminin bir üyesi olan plazminojen aktif enzim plazmine çevrilebilen inaktif bir proenzimdir. İmmunolojik olarak ayrı, 2 fizyolojik plazminojen aktivatörü tanımlanmıştır:

Doku tipi plazminojen aktivatörü (t-PA)

Ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü (u-PA)

t-PA ile düzenlenen plazminojen aktivasyonu sirkülasyonda fibrinin yıkımını sağlarken u-PA ile düzenlenen aktivasyon latent proteinazların (pro-MMP'ler) aktivasyonu yoluyla perisellüler proteolizde rol oynar. Plazminin aktive ettiği pro-MMP'ler; pro-MMP-1, proMMP-3, proMMP-9, proMMP-10 ve proMMP-13'dür. Aktive olan MMP'ler de diğer

pro-MMP'leri aktive ederler. MMP-2 ve MMP-9 bazal membrandaki tip IV kollajeni parçalarken plazmin ise laminin, fibronektin gibi ECM bileşenlerini parçalar. Aktive olan diğer MMP'ler de çeşitli ECM bileşenlerini parçalayarak anjiogenezin erken evresine katkıda bulunurlar.



Şekil 6: Plazminojen/plazmin ve MMP etkileşimleri

Fibrinolitik sistemin inhibisyonu ya spesifik plazminojen aktivatör inhibitörleri (PAI-1 ve PAI-2) tarafından plazminojen seviyesinde ya da başlıca α_2 -antiplazmin tarafından plazmin seviyesinde oluşabilir (33).

MMP'ler yeni damar oluşumu için bağ dokusu bariyerlerinin yıkılması dışında da görev yaparlar. Ya direkt olarak ya da büyüme faktörleri aracılığıyla endotelial hücre proliferasyonunu, invazyonunu, migrasyonunu ve büyümesini regüle ederek anjiogenez desteklerler. Ayrıca yeni veriler MMP'lerin anjiostatin ve endostatin gibi anjiogenez inhibitörlerinin üretimini sağladıklarını düşündürmektedir. MMP'ler plazminojeni degrade ederek endotel hücre proliferasyonunu inhibe eden

ve anjiostatin olarak bilinen NH₂-terminal parçasını üretirler. Endostatin ise kollajen Tip XVIII'in proteolitik fragmanıdır, ancak MMP aktivitesinin endostatin aktivitesine olan etkisi henüz tam olarak bilinmemektedir (3).

MMP aktivitesinin anjiogenez için gerekli olduğunun gösterilmesiyle özellikle MMP-9'un PDR'deki retinal neovaskülarizasyon gibi mikrovasküler olaylar için kritik olabileceği ileri sürülmüştür. MMP-9 aktivasyonunda PKC'nin de merkezi bir rolü olduğunun ve hem MMP-2 hem de MMP-9'un ekspresyonlarının oksidatif stresle regüle edildiğinin ileri sürülmesi diabetik nefropati ve retinopati patofizyolojisinde MMP'lerin de işe karışabileceğini düşündürmektedir (42).

II.7. HEMOGLOBİN A_{1c} (HbA_{1c})

Diabetik hastaların eritrositleri elektroforezde asıl HbA pikinden önce hareket eden ve katyon değişim kromatografisinde ayrılabilen bir Hb komponentinin artmış oranına sahiptir. Bu; HbA_{1c} olarak isimlendirilir ve β -globulin zincirinin N-terminal valinine kovalent olarak bağlı heksoz rezidülerinin varlığı dışında yapısal olarak HbA'ya özdeştir. Glikohemoglobin oluşumu kan glukoz konsantrasyonuna bağımlı olarak Hb proteininin posttranskripsiyonel nonenzimatik bir modifikasyonunu gösterir (43).

HbA'nın kromatografik analizi birkaç minör Hb'in varlığını göstermiştir: HbA_{1a1}, HbA_{1a2}, HbA_{1b}, HbA_{1c}. Bunlar HbA₁ veya glikohemoglobinler olarak bilinir. HbA_{1a1}, β zincirinin amino terminaline fruktoz-1,6-bifosfat bağlarken HbA_{1a2} glukoz-6-fosfat bağlar. HbA_{1b}'nin yapısı yeni anlaşılmaya başlanmıştır ve bunun β zincirinin amino terminaline pirüvik asidin bağlandığı düşünülür. HbA_{1c} majör fraksiyondur ve HbA'nın herbir β zincirinin N-terminal valin rezidüsü ile glukozun bir anstabil Schiff bazı (pre-HbA_{1c}) formu oluşturmak için bağlanmasıyla

şekillenir. Schiff bazı ya ayrılır ya da bir stabil ketamin (HbA1c) formu oluşturmak için Amadori yeniden düzenlemesine uğrayabilir.



Glikozile Hb oluşumu irreversibldir ve kan düzeyleri kırmızı kan hücrelerinin yaşam süresiyle birlikte kan glukoz konsantrasyonuna bağlıdır. Oluşum oranı kandaki glukoz konsantrasyonu ile direkt orantılı olduğundan dolayı HbA1c konsantrasyonu 6 - 8 hafta öncesindeki glukoz değerlerini gösterir. Yarı ömrü 35 gündür (6). Normoglisemik kişilerde HbA1a₁, HbA1a₂, ve HbA1b toplam Hb'in % 0.4 – 0.8'ini meydana getirirken HbA1c % 4 – 5'ini oluşturur. Uzun süreli hiperglisemide HbA1c normoglisemidekine göre toplam Hb'in daha yüksek bir oranını meydana getirir. Plazma glukozundaki kısa süreli yükselmeler HbA1c seviyelerini çok hafif etkiler. Glikozile Hb'ler diabetin izlenmesinde büyük yarar sağlarlar ancak sınırdaki DM olgularını etkinlikle saptamak için yeterince sensitif değildirler (15).

III.MATERYAL VE METODLAR

III.1. MATERYAL

III.1.1. Olguların Seçimi

Hasta Grubu: Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Endokrinoloji Polikliniği tarafından TipII DM tanısıyla takip edilen, yaşları 35–77 arasında değişen (ortalama 56.7 ± 10.6) 32 kadın, 28 erkek toplam 60 hasta çalışmaya alındı. Hastaların 38'i oral antidiabetik, 22'si insülin tedavisi alıyordu fakat bu çalışmada tedavi tipine göre bir ayırım yapılmadı. ACE inhibitörü kullanan hastalar ise çalışma dışı bırakıldı.

Çalışma grupları şu şekilde sınıflandırıldı:

- Mikrovasküler komplikasyonu olmayan DM grubu (n:14)
- Mikroalbuminürlü DM grubu (n:12)
- Makroalbuminürlü DM grubu (n:12)
- Basit retinopatili DM grubu (n:12)
- Proliferatif retinopatili DM grubu (n:10)
- Sağlıklı kontrol grubu (n:20)

Mikrovasküler komplikasyonu olmayan DM grubuna gözde diabete bağlı retinopatik değişiklikleri olmayan, böbrek fonksiyonları normal, periferik ve otonom nöropatisi bulunmayan toplam 14 hasta dahil edildi.

Retinopatili DM grubuna Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Göz Polikliniği tarafından oftalmoskopik fundus muayene sonucuna göre basit (background) retinopati tanısı almış 12 ve proliferatif retinopati tanısı almış 10 hasta dahil edildi. Proliferatif retinopatisi olan hastaların tümü lazer tedavisi alıyordu. Bu grup da böbrek fonksiyonları normal olan hastalar arasından seçildi. Geçirilmiş oküler inflamasyon veya oküler cerrahi hikayesi olanlar çalışma dışı bırakıldı.

Mikroalbuminürlü DM grubuna 24 saatlik idrar incelemesinde 30-300 mg/gün albuminüri saptanan toplam 12 hasta, makroalbuminürlü DM grubuna 24 saatlik idrar incelemesinde 300 mg/gün'ün üzerinde albuminüri saptanan toplam 12 hasta dahil edildi. MAU diabetik nefropatinin en erken klinik laboratuvar bulgusu olarak gösterildiğinden hastalar bu verilere göre sınıflandırıldı. Nefropati dışında albuminüriye sebep olabilecek ateşli hastalığa sahip olanlar, kan alımı öncesinde ağır egzersiz hikayesi olanlar, başka böbrek hastalığına sahip olanlar çalışmaya kabul edilmedi.

Kontrol Grubu: Hastane dışından, açlık kan glukoz değerleri normal sınırlarda olup DM veya başka bir endokrin hastalığa sahip olmayan, kanser ya da başka bir sistemik hastalık tanısı almamış, böbrek fonksiyonları normal, yaşları 33 - 73 arasında değişen (ortalama 55.4 ± 9.0) 11'i kadın 9'u erkek 20 sağlıklı bireyden oluşturuldu.

III.1.2.Çalışma Protokolü

Venöz kan örnekleri hastalardan sabah aç karnına alındı. Serum örnekleri için pıhtılaşma aktivatörlü serum separatör içeren, tam kan örnekleri için ise lityum-heparin içeren steril tüpler kullanıldı. Tam kan örneklerinden HbA1c hemen çalışıldı. Diğer kan örnekleri 30 dakika pıhtılaşma sürecinin tamamlanmasından sonra 1000×g'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serum örnekleri analize kadar -80°C'de saklandı. Bu örneklerde VEGF ve MMP-9 düzeyleri çalışıldı. Prosedürüne uygun olarak toplanan 24 saatlik idrar örneklerinde MAU değerleri hemen saptandı.

III.2. METODLAR

III.2.1. Serumda Yapılan İncelemeler

III.2.1.a. VEGF ölçümü

VEGF konsantrasyonlarının saptanmasında kantitatif sandviç ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) tekniği kullanıldı (Quantikine R&D systems, Minneapolis). Bu teknik VEGF 165'i saptamak üzere geliştirilmiş bir immunoassay tekniğidir. İnsan VEGF'sine karşı geliştirilen monoklonal ve poliklonal antikorlar kullanılır.

VEGF için spesifik monoklonal antikorlar ile kaplanmış kuyucuklara VEGF standartları ve serum örnekleri pipetlendi. Örneklerdeki VEGF'nin antikorlara bağlanması için 2 saat oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Antijen-antikor bağlanmalarının gerçekleştiği bu süreçten sonra yıkama işlemi uygulandı. Enzimle işaretlenmiş poliklonal VEGF antikorları içeren konjugat kuyucuklara pipetlenip 2 saat oda ısısında inkübe edildi. Yıkama ile bağlanmayan antikorların uzaklaştırılmasından sonra enzim substratı eklenip 25 dakika daha inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda reaksiyon durdurularak 450nm'ye ayarlanmış mikropate okuyucuda absorbanlar belirlendi.

III.2.1.b. MMP-9 Ölçümü

MMP-9 konsantrasyonlarının saptanmasında kantitatif sandviç ELISA kullanıldı (Quantikine R&D systems, Minneapolis). Bu teknik total MMP-9 'u (aktif ve pro-MMP-9) saptamak üzere geliştirilmiş bir immunoassay tekniğidir. İnsan MMP-9'una karşı geliştirilen monoklonal ve poliklonal antikorlar kullanılır.

MMP-9 için spesifik monoklonal antikorlar ile kaplanmış kuyucuklara MMP-9 standartları ve serum örnekleri pipetlendi. Örneklerdeki MMP-9'un antikorlara bağlanması için oda ısısında, horizontal-orbital karıştırıcı üzerinde 2 saat inkübasyona bırakıldı. Antijen-antikor bağlanmalarının gerçekleştiği bu süreçten sonra yıkama işlemi uygulandı. Enzimle işaretlenmiş poliklonal MMP-9 antikorları içeren konjugat kuyucuklara pipetlenip oda ısısında ve yine karıştırıcı üzerinde

1 saat inkübe edildi. Yıkama ile bağlanmayan antikorların uzaklaştırılmasından sonra enzim substratı eklenip 30 dakika daha inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda reaksiyon durdurularak 450nm'ye ayarlanmış mikropate okuyucuda absorbanlar belirlendi.

III.2.2. Tam Kanda Yapılan İnceleme

III.2.2.a. HbA1c Ölçümü

Hemolize edilmiş tam kanda HbA1c düzeyleri türbidimetrik inhibisyon immunoassay yöntemiyle BM-911 otoanalizöründe (Roche Diagnostics) çalışıldı.

Bu yöntemde tam kan öncelikle hemolize edici bir ajan olan Tetradetiltrimetilamonyum bromid (TTAB) ile manuel olarak muamele edilir. Hemoliz sonucu serbestleşen HbA1c düzeyleri BM-911 otoanalizöründe, antijen-antikor reaksiyonu kullanan bir yöntemle ölçülür. Bunun için örnek üzerine HbA1c'ye karşı geliştirilmiş antiHbA1c antikorları eklenir. Oluşan antijen-antikor kompleksleri çözünür komplekslerdir. Bu reaksiyon sonrasında ortama polihaptenler içeren reaktifin eklenmesiyle ilk reaksiyonda bağlanmamış fazla antikorlar bu polihaptenlerle bağlanır. Çözünmeyen polihapten-antikor kompleksleri oluştuktan sonra türbidimetrik ölçüm ile HbA1c değerleri indirekt olarak saptanır.

Aynı analizde; hemolize edilmiş örnekte açığa çıkan ve karakteristik bir absorpsiyon spektrumuna sahip bir türevine çevrilen toplam Hb değeri de spektrofotometrik olarak ölçülür ve % HbA1c değeri otoanalizör tarafından şu formülle hesaplanır:

$$\% \text{HbA1c} = \frac{\text{HbA1c (g/dl)}}{\text{Hb (g/dl)}} \times 100$$

III.2.3.İdrarda Yapılan İnceleme

III.2.3.a. MAU ölçümü

24 saatlik idrarda MAU düzeyleri immunotürbidimetrik yöntemle BM-911 otoanalizöründe (Roche Diagnostics) çalışıldı.

Bu yöntemde albumine karşı geliştirilmiş antikor içeren reaktif idrar örneği üzerine eklenip örnekteki albumin ile bağlanması sağlanır. Antijen-antikor kompleksleri oluşur ve meydana gelen bulanıklık sonrası türbidimetrik ölçüm ile MAU değerleri mg/L olarak saptanır. Bu değer 24 saatlik idrar völümüne göre hesaplanarak günlük MAU değeri elde edilir.

III.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analiz Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda yapıldı. Veriler ortalama \pm SD olarak verildi. Gruplar arası karşılaştırma Student t testi ve Varyans analizi kullanılarak yapıldı. HbA1c ile diğer parametreler arasındaki korelasyonu değerlendirmek için Pearson Korelasyon Testi kullanıldı.

IV.BULGULAR

IV.1.VEGF

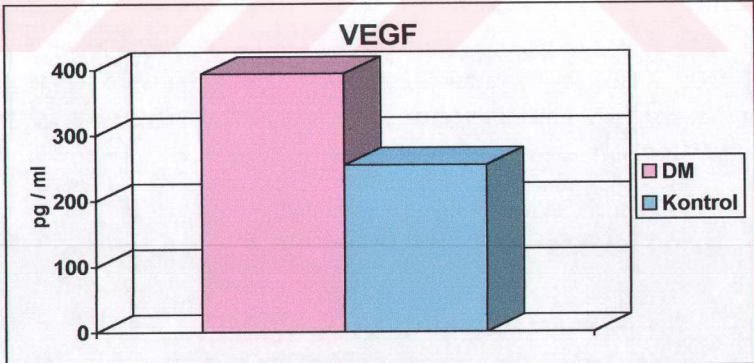
60 Diabetes Mellitus hastası ve 20 sağlıklı kontrolde ölçülen VEGF değerleri ortalama \pm SD olarak ifade edildi. Bu değerler Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1: DM ve Kontrol grubu serum VEGF düzeyleri (ortalama \pm SD)

GRUPLAR	VEGF pg/ml
DM grubu n:60	393 \pm 156 ^a
Kontrol grubu n:20	254 \pm 94

a: Kontrol grubuna göre fark $p < 0.001$

DM grubunun VEGF değerleri (393 \pm 156 pg/ml), kontrol grubu değerlerine göre (254 \pm 94 pg/ml) anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p < 0.001$).



Grafik 1: DM ve Kontrol grubu VEGF düzeyleri

5 gruba ayrılan DM hastaları ve kontrol grubunun ölçülen VEGF değerleri ortalama \pm SD olarak ifade edildi. Bu değerler tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2 : Tüm grupların serum VEGF düzeyleri (Ortalama \pm SD)

GRUPLAR	VEGF pg/ml
1- Komplikeşonsuz DM n :14	414 \pm 160 ^a
2- Mikroalbuminüri (MAU) grubu n :12	477 \pm 163 ^b
3- Makroalbuminüri grubu n :12	442 \pm 156 ^c
4- Basit Retinopati (BDR) n :12	350 \pm 110
5-Proliferatif Retinopati (PDR) n :10	257 \pm 91
Kontrol grubu n :20	254 \pm 94

a: Kontrol grubuna göre fark $p < 0.05$

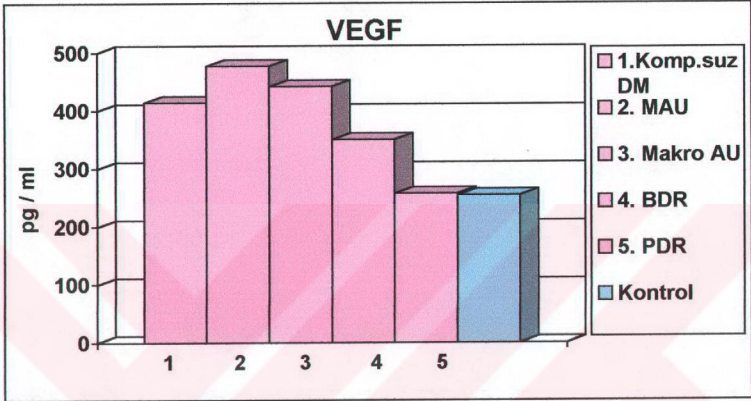
b: Kontrol grubuna göre fark $p < 0.001$

c: Kontrol grubuna göre fark $p < 0.01$

Komplikasyonsuz DM grubu VEGF değerleri (414 \pm 160 pg/ml), MAU grubu VEGF değerleri (477 \pm 163 pg/ml) ve makroalbuminüri grubu VEGF değerleri (442 \pm 156 pg/ml) kontrol grubundan (254 \pm 94 pg/ml) anlamlı şekilde yüksek bulundu (Sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.01$). BDR ve PDR'deki değerler kontrol grubu değerlerinden yüksek olmasına rağmen aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenemedi($p > 0.05$).

MAU grubu ve makroalbuminüri grubu VEGF değerleri komplikasyonsuz DM grubu VEGF değerlerinden yüksek bulundu ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$). MAU grubu değerleri makroalbuminüri grubuna göre yüksekti ancak bu da istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$).

BDR grubu ve PDR grubu VEGF değerleri komplikasyonsuz DM grubuna göre daha düşük bulundu ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).BDR'deki VEGF değerleri PDR'ye göre yüksek olmasına rağmen bu fark da istatistiksel anlamlılık göstermedi ($p>0.05$).



Grafik 2 : DM grupları ve Kontrol grubu VEGF düzeyleri

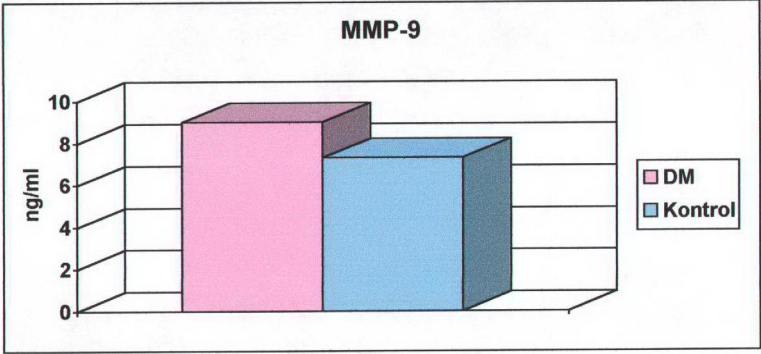
IV. 2. MMP-9 :

60 DM hastası ve 20 sağlıklı kontrolde llen MMP-9 değerleri Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3 : DM ve Kontrol grubu serum MMP-9 düzeyleri (ortalama \pm SD)

GRUPLAR		MMP-9 ng/ml
DM grubu	n :60	9.0 \pm 3.9
Kontrol grubu	n :20	7.3 \pm 3.7

DM grubunun MMP-9 değerleri (9.0 \pm 3.9 ng/ml), kontrol grubu değerlerine göre (7.3 \pm 3.7 ng/ml) yüksek olmakla birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p> 0.05$).



Grafik 3 : DM ve Kontrol grubu MMP-9 düzeyleri

Diabet hasta grupları ve kontrol grubunun MMP-9 değerleri ortalama \pm SD olarak ifade edildi. Bu değerler Tablo 4'de gösterilmiştir.

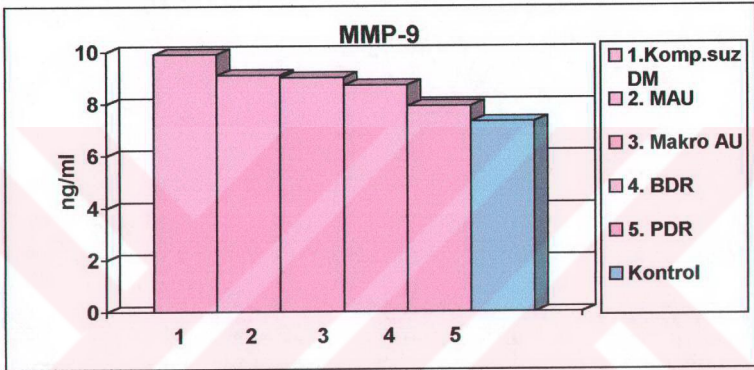
Tablo 4: Tüm grupların serum MMP-9 düzeyleri (ortalama \pm SD)

GRUPLAR		MMP-9 ng/ml
1- Komplikszyonsuz DM	n:14	9.9 \pm 4.3
2-MAU grubu	n:12	9.1 \pm 4.5
3-Makroalbuminüri grubu	n:12	9.0 \pm 3.6
4-Basit retinopati	n:12	8.7 \pm 3.4
5-Proliferatif retinopati	n:10	7.9 \pm 3.6
Kontrol grubu	n:20	7.3 \pm 3.7

DM gruplarının tümünün MMP-9 düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmasına rağmen aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$). MAU grubu ve makroalbuminüri grubu MMP-9

düzeyleri komplikasyonsuz DM grubuna göre düşük bulundu ancak aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

BDR grubu ve PDR grubu MMP-9 değerleri de komplikasyonsuz DM grubuna göre düşüktü ancak bu fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). MAU-Makroalbuminüri, BDR-PDR grupları arasındaki farklar da istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).



Grafik 4 : DM grupları ve Kontrol grubu MMP-9 düzeyleri

IV. 3.HbA_{1c}

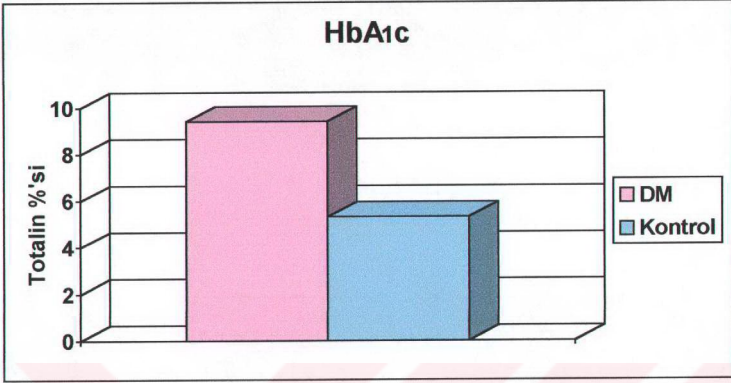
60 DM hastası ve 20 sağlıklı kontrolün HbA_{1c} değerleri Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5 : DM ve Kontrol grubu tam kan HbA_{1c} düzeyleri (ortalama \pm SD)

GRUPLAR	HbA _{1c} (Totalin %'si)
DM grubu n :60	9.4 \pm 2.2 ^a
Kontrol grubu n :20	5.3 \pm 0.4

a: Kontrol grubuna göre fark $p < 0.001$

DM grubunun HbA_{1c} değerleri (%9.4 \pm 2.2), kontrol grubu değerlerine göre (%5.3 \pm 0.4) anlamlı yüksek bulundu ($p<0.001$).



Grafik 5 : DM ve Kontrol grubu %HbA1c düzeyleri

Diabet hasta grupları ve kontrol grubunun % HbA1c değerleri ortalama \pm SD olarak ifade edildi. Bu değerler Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6 : Tüm grupların tam kan HbA1c düzeyleri (ortalama \pm SD)

GRUPLAR	%HbA1c
1-Komplikasyonsuz DM n:14	7.6 \pm 1.5 ^a
2-MAU grubu n:12	9.4 \pm 2.5 ^b
3-Makroalbuminüri grubu n:12	10.8 \pm 2.4 ^{b,c}
4-Basit Retinopati n:12	10.4 \pm 1.6 ^{b,d}
5-Proliferatif retinopati n:10	9.1 \pm 1.4 ^b
Kontrol grubu n:20	5.3 \pm 0.4

a: Kontrol grubuna göre fark $p < 0.01$

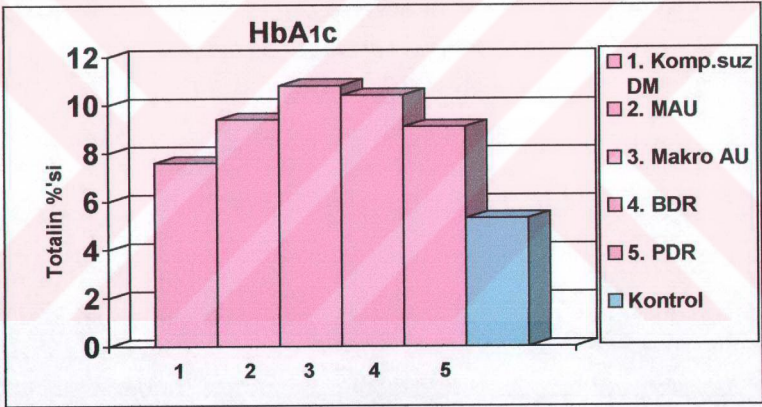
b: Kontrol grubuna göre fark $p < 0.001$

c: Komplikeasyonsuz gruba göre fark $p < 0.001$

d: Komplikeasyonsuz gruba göre fark $p < 0.01$

Komplikasyonsuz DM grubunun % HbA1c düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p < 0.01$). Diğer 4 DM grubunun % HbA1c düzeyleri de kontrol grubundan yüksekti ve tümünde istatistiksel fark anlamlıydı ($p < 0.001$).

DM grupları arasında % HbA1c açısından karşılaştırma yapıldığında komplikasyonlu 4 grubun da (2-3-4-5.grup) komplikasyonsuz 1. gruptan daha yüksek değerlere sahip olduğu görüldü. 1.grup ile 2. ve 5. grup arasındaki fark istatistiksel anlamlılık göstermezken 1.grup ile 3. ve 4. grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $p < 0.001$ ve $p < 0.01$).



Grafik 6 : DM grupları ve Kontrol grubu % HbA1c düzeyleri

HbA1c düzeyleriyle VEGF ve MMP-9 düzeylerinin ayrı ayrı korelasyonu değerlendirildiğinde HbA1c'nin VEGF ile anlamlı korelasyon gösterdiği saptandı ($r = 0.317$; $p < 0.01$). HbA1c ile MMP-9 düzeyleri ise korelasyon göstermedi ($r = 0.125$; $p > 0.05$).

V. TARTIŞMA

DM; geçmiş yıllarda olduğu gibi günümüzde de geniş kitleleri ilgilendiren önemli bir sağlık sorunudur. Oluşturduğu komplikasyonlar nedeniyle organ ve işlev kayıplarına neden olmakta, yaşam süresi ve kalitesini etkilemektedir. Diabetik komplikasyonların gelişiminde rol oynayan en önemli faktörlerden biri hastalığın ana karakteristiği olan hiperglisemidir. Hiperglisemi dokularda fonksiyonel değişikliklerle sonuçlanan biyokimyasal bozukluklara neden olur. Bunları kritik dokularda irreversibl yapısal değişiklikler ve klinik hastalık takip eder. Son 5 yıldıki in vitro çalışmalarda hipergliseminin TGF-β, FGF, PDGF ve VEGF gibi bazı büyüme faktörlerinin ekspresyonunu stimüle ettiği tespit edilmiştir (11).

Bu tez çalışmasında komplikasyonsuz ve mikrovasküler komplikasyonlu Tip II DM hastalarında serum VEGF düzeyleri ölçüldü. Tüm hasta gruplarının değerleri kontrol grubuna göre yüksek olarak saptandı. Komplikasyonsuz grup, MAU ve makroalbuminüri grupları ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak da anlamlıydı (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.001$, $p<0.01$).

Chiarelli ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada çok küçük çocukların da dahil olduğu Tip I diabetli hastalarda serum VEGF konsantrasyonlarının yüksek olduğunu saptadılar (11).

Braun ve arkadaşları spontan olarak diabet gelişmiş ratlarda, diabetin başlangıç döneminde in vivo olarak karaciğer, böbrek ve akciğer dokusunda VEGF'nin ekspresyonunun arttığını gösterdiler (44).

Diğer bir grubun çalışmasında da mikrovasküler komplikasyonlu ve komplikasyonsuz Tip I ve Tip II DM hastalarında kontrol grubuna göre yükselmiş VEGF seviyeleri rapor edildi (30).

VEGF; normal erişkin insan ve hayvan dokularının çoğunda düşük konsantrasyonlarda, renal glomerülün podositleri ve kardiyak miyositlerde ise daha yüksek konsantrasyonlarda ekspres edilen bir büyüme faktörüdür (45). Böbrek özellikle de glomerüller normal insandaki VEGF üretiminin temel kaynağıdır ve podositler tarafından üretilen VEGF'nin proteinlere karşı glomerüler geçirgenliği regüle etmede bazı rolleri olabileceği ileri sürülmektedir (9). Ancak VEGF'nin diabetik nefropatideki kesin rolü belli değildir (4).

Diabet; PKC'nin aktivasyonu, TGF- β 'yı da içeren çeşitli sitokin ve büyüme faktörlerinin artışı ve renin-anjiyotensin sisteminin stimülasyonu gibi tümü renal VEGF üretimini artırdığı bilinen çeşitli patolojik değişikliklerle sonuçlanmaktadır. Ryong Cha ve arkadaşlarının bulgularına göre VEGF'nin glomerüler geçirgenliği regüle etmedeki rolü henüz tanımlanmamış olsa da diabetik nefropatide glomerüler proteinüriye aracılık ediyor olabilir ve VEGF yoluyla oluşan vasküler permeabilite artışının mekanizması kollajenaz üretimi ve endotel bazal membranının proteolitik yıkımının stimülasyonunu içerebilir (9).

Bu tez çalışmasında, diabetik nefropati grubu olarak seçilen MAU ve makroalbuminüri diabet hastalarının serum VEGF seviyeleri komplikasyonsuz (normoalbuminüri) diabet hastalarına göre yüksek bulundu. Aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değilse de bu bulgu diabetik nefropati süresince VEGF sentezinin arttığı ve VEGF'nin diabetik nefropati patogenezinde rolü olduğu şeklindeki düşünceleri destekler nitelikteydi.

Başka bir çalışmada da MAU ve makroalbuminüri Tip II DM hastalarında normoalbuminürik hastalara göre anlamlı şekilde yükselmiş plazma VEGF seviyeleri saptanmış ve albuminüri düzeyinin artışı ile VEGF artışı arasında bir korelasyon tespit edilmiştir (30).

Bu tez çalışmasında MAU grubu VEGF değerleri makroalbuminüri grubuna göre istatistiksel anlamlılığı olmayan bir yükselme gösterdi ancak bu hasta sayısının sınırlı olmasına bağlı olabilir.

Ang II insan mezengial hücrelerindeki VEGF'yi Anjiotensin 1 reseptörü üzerinden artırmaktadır. Yeni çalışmaların, renin-anjiotensin sisteminin inhibisyonunun diabetik nefropati ve diabetik retinopati gelişmesini ve ilerlemesini geciktirebildiğini öne sürmesi de VEGF'nin diabetik nefropatide potansiyel bir rolü olduğu düşüncesini desteklemektedir (2).

Bazı patolojik prosesler, örneğin endotelial disfonksiyon, düz kas hücrelerinin kaybı, mikroanevrizmaların oluşumu ve artmış vasküler permeabilite hem diabetik nefropatide hem de diabetik retinopatide gözlenmektedir. Diabetik retinopatinin en önemli özellikleri, progresif retinal hipoksiye neden olan retinal kapillerlerin kaybı, artmış retinal vasküler permeabilite ve yeni retinal damar büyümesidir. Yeni damar gelişiminin göz içinde üretilen, yayılabilir bir büyüme faktörünün etkisiyle oluştuğuna inanılır. Bugüne kadar gözde birçok büyüme faktörü saptanmış olmasına karşın diabetik retinopati patogeneğinde VEGF'nin majör bir mediatör için tahminen gerekli olan tüm özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Gözde retinal pigment epiteli, endotelial hücreler, perisitler, glial hücreler ve ganglion hücrelerinin VEGF üretebildiği bilinmektedir. Bu hücre tiplerinde VEGF ekspresyonu hipoksi ile 2.5 - 30 kat artabilir (2,4).

Son zamanlardaki bazı yayınlarda VEGF'nin retinal anjiogenik proseslerde rol oynadığına dair güçlü deliller sağlanmıştır. Prematüre retinopatisine sahip ratlarda neovasküler safhada VEGF'nin retinada önemli miktarda eksprese olduğu ve yeni damarlar atrofiye uğradığında gerilediği gösterilmiştir (46).

Hernandez ve arkadaşları PDR'li diabetik hastaların vitröz sıvılarında sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında anlamlı şekilde yüksek

VEGF konsantrasyonları saptadılar. Vitroz sıvı VEGF düzeylerini hastaların serumlarında ölçülen VEGF düzeylerine göre belirgin yüksek buldular. PDR'li hastaların vitroz sıvılarındaki yüksek VEGF konsantrasyonlarının primer olarak serum difüzyonundan değil intraoküler sentezden kaynaklanabileceğini bildirdiler (47).

Bu çalışmada basit ve proliferatif diabetik retinopatili hastaların serum VEGF düzeyleri saptandı. Sonuçlar kontrol grubu değerlerine göre yüksek olmasına rağmen aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. İnvaziv bir yöntemle alınan vitroz sıvı materyalinde VEGF ölçümü yapılmadı. Retinopati grubu olarak seçilen BDR ve PDR'deki VEGF değerleri komplikasyonsuz gruba göre daha düşük olmasına rağmen bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

Burgos ve arkadaşları PDR'li diabet hastalarının serum ve vitroz sıvılarında VEGF düzeylerini saptadılar ve vitroz sıvıda VEGF'yi yükselmiş bulurken serumda kontrol grubuna göre ve mikrovasküler komplikasyonu olmayan gruba göre anlamlı farklılık tespit edemediler. Yakın dönemde yapılan deneysel çalışmalar VEGF ekspresyonunun yüksek glukoz ortamına kronik maruziyet ve retinadaki pigment epitel hücreleri, endotel hücreleri ve perisitlerde akut glukoz eksikliğiyle indüklendiğini göstermektedir. Bu bulgulara dayanarak Burgos ve arkadaşları diabetik ortamın retinal seviyede VEGF artışı lehine olduğunu ve çalışmalarındaki vitroz sıvı VEGF artışının serum difüzyonuna bağlanamayacağını, esas sebebin intraoküler sentez olduğunu bildirdiler (48).

Hipoksinin in vitro ve in vivo olarak VEGF gen ekspresyonunun anahtar stimulanı olduğu düşünülür (7). Aiello ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada PDR'li hastalarda sirkülasyondaki VEGF'ye göre yükselmiş intravitroz VEGF seviyeleri saptandı ve bunun iskemik retina tarafından üretime bağlı olduğu bildirildi. Ayrıca intravitroz VEGF

düzeylerinin BDR ve hareketsiz PDR'li hastalara göre yüksek olduğu tespit edildi. Hovind ve arkadaşları lazer tedavisi alan PDR'li hastalarda VEGF seviyelerini yüksek bulmadılar ve VEGF'nin başarılı lazer fotokoagülasyon sonrasında gerilediğini bildirdiler (30).

Başka bir çalışmada da PDR'li hastalardan lazer tedavisi öncesi ve sonrası vitröz sıvı alınmış, tedavi sonrasında VEGF konsantrasyonunun %75 azaldığı saptanmıştır (4).

Bu tez çalışmasında BDR'li hastaların serum VEGF düzeyleri PDR'lilere göre istatistiksel anlamlılığı olmayan bir yükseklik gösterdi. PDR'ye sahip tüm hastalarımız lazer tedavisi alıyordu.

Kan retina bariyerinin yıkılması hem insan hem de deneysel diabetteki vasküler disfonksiyonun erken evrelerinin bir özelliğidir. Funatsu ve arkadaşları VEGF'nin vasküler permeabiliteyi artırdığını ve BDR'de kan-retina bariyerinin yıkılmasında majör ilerletici faktör olduğunu bildirmişlerdir (49).

Diabetik retinopatide intravitröz olarak sentezinin arttığı düşünülen VEGF'nin seruma yansmasıyla ilgili yeterli delil bulunmamakla birlikte kan-retina bariyerinin erken evrede bozulmasına bağlı olarak seruma bir miktar VEGF geçiyor olabilir ve lazer tedavisi alan hastaların serum düzeyleri tedaviye bağlı olarak düşüyor olabilir.

Yakın dönemdeki çalışmalar anjiogenez olayları için MMP aktivitesinin de gerekli olduğunu göstermiştir (42). Bu çalışmada anjiogenez sürecinde VEGF ile birlikte rol oynadığı düşünülen MMP grubu enzimlerden MMP-9 serum düzeyleri de ölçüldü. DM'lu hastaların MMP-9 düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulundu ancak aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

MMP grubu enzimlerin DM patogenezindeki rolü konusunda yapılan çalışmalar oldukça sınırlı olmakla birlikte araştırmacılar tarafından bu konuyla ilgili değişik hipotezler öne sürülmüştür. Uemura ve

arkadaşları diabetik ratlarda yaptıkları çalışmada vasküler endotel hücrelerinde MMP-9'un arttığını tespit ettiler. Ayrıca bu ratların plazma MMP-9 seviyesinde de anlamlı derecede artış saptadılar. DM patogenezinde rol oynayan PKC aktivasyonu, oksidatif stres gibi hiperglisemiyle indüklenen olayların da etkisiyle MMP'lerin diabette özellikle aktive edildikleri hipotezini öne sürdüler (42).

MMP grubu enzimlerin fizyolojisi oldukça karmaşıktır ve aktiviteleri çeşitli kademelerde sıkı kontrol altında tutulmaktadır. MMP'ler birçok dokuda düşük seviyelerde eksprese edilmektedir ve sentezleri PKC agonistleri, çeşitli sitokinler, hormonlar ve TGF- β gibi büyüme faktörleri tarafından düzenlenmektedir. Mc Lennan ve arkadaşları diabetik nefropatideki böbreğin mezengial hücrelerinde MMP aktivitesi üzerine glukozun etkilerini inceleyen bir çalışmada özellikle TGF- β üzerinde durdular ve yüksek glukozun, MMP'lerin aktivitesini değiştirebilecek olan TGF- β 'yı artırdığını bildirdiler. Ayrıca TGF- β 'nın TIMP ekspresyonunun başlamasına neden olduğunu ve MMP'leri inhibe ettiğini, MMP-TIMP arasındaki dengesizliğin mezengial matriks birikmesine katkıda bulunabileceğini ifade ettiler. Yüksek glukoz ortamındaki insan mezengial hücre kültüründe MMP-2 ekspresyonunun artarken MMP-7 ve MMP-9 ekspresyonunun azaldığını, yüksek glukoz seviyelerinin TIMP-1 ekspresyonunu artırdığını bildirdiler (50).

Diabetik nefropati patogenezinde TGF- β artışının kritik bir unsur olduğuna dair birçok kanıt bulunmaktadır. TGF- β ECM turnoverinin düzenlenmesinde ve hücre proliferasyonunun modülasyonunda temel roller oynar. TGF- β 'nın bu etkilerinin moleküler mekanizması henüz açıklama beklemektedir ancak bu büyüme faktörü hücre kültür ortamına eklendiğinde bazı MMP'lerin ekspresyonu azalmaktadır. Bir grup araştırmacının Tip I diabetli ratlarda yaptıkları çalışmada diabette MMP-1,

MMP-3 ve MMP-9 ekspresyonunun azaldığını göstermeleri de bu bulguları desteklemektedir. Ancak bu konuda literatürde birbirleriyle ters düşen bulgular mevcuttur (50). Ebihara ve arkadaşları normoalbuminürili ve MAU'li Tip II diabet hastalarının plazma MMP-9 konsantrasyonlarını ölçtüler ve MAU'li grubun MMP-9 düzeylerini anlamlı yüksek buldular ve sonraki incelemelerde de giderek arttığını tespit ettiler. Aynı hastalar ACE inhibitörü ile tedavi edildiğinde MAU ve MMP-9 düzeylerinde düşme gözlemler (51).

Benzer bir sonuç Zaoui ve arkadaşları tarafından bildirildi. Bunlar proteinürisi olan diabetik hastalarda renin-anjiyotensin blokajının yokluğunda idrar MMP-9 seviyelerini kontrol grubuna göre anlamlı yüksek buldular (52).

Bu tez çalışmasında da MAU ve makroalbuminürili grubun MMP-9 seviyeleri kontrol değerlerine göre yüksekti ancak aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Ayrıca MMP-9 serum düzeyleri komplikasyonsuz gruptan MAU ve makroalbuminüri grubuna doğru düşme gösterdi. Bu sonuçlar, DM; dolaşımdaki MMP-9 seviyelerinin yükselmesine neden olur şeklindeki hipotezi desteklerse de diabetik nefropati grubundaki düşmeler Mc Lennan ve arkadaşlarının bildirdiği TGF- β 'nın inhibisyon etkisinin bu gruplarda bir miktar artmasına bağlı olabilir. Nitekim Tip I DM'lu hastalarda yapılan bir çalışmada bizim sonuçlarımıza benzer sonuçlar bildirilmiş ve Tip I DM'da MMP-9 plazma seviyesi artışının renal mikrovasküler komplikasyonların gelişiminden önce meydana geldiği bildirilmiştir (53).

Diabetik nefropatide MMP'lerin rolü üzerine yapılan çalışmaların bulguları birbirinden oldukça farklı olduğundan bu konuda daha geniş çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Son zamanlarda bazı araştırmacılar PDR ve diğer vitreoretinal hastalıkların patogenezinde MMP'lerin de işe karışabileceğini bildirmişlerdir. Bilindiği gibi diabetik retinopati lazer ve cerrahi tedavilerdeki ilerlemelere rağmen hala birçok gelişmekte olan ÷lkede körlük nedenlerinden biridir ve patogenezi tam olarak anlaşılmamıştır. Diabetik retinopatili hastaların vitröz sıvılarında yapılan bir çalışmada MMP-2 ve MMP-9 ölç÷lmüş, bu örneklerdeki MMP-2 kontrollere göre farklı bulunmazken MMP-9 anlamlı şekilde artmış bulunmuştur (54).

Kosano ve arkadaşları neovask÷larizasyon için potansiyel bir faktör olarak gör÷len VEGF'nin aktif PDR'de vitröz sıvıda anlamlı şekilde yükseldiğini tespit ettikten sonra PDR'deki neovask÷larizasyonun tek bir faktöre bağlanamayacağını bildirdiler ve PDR'li hastaların vitröz sıvılarında pro-MMP-9 düzeyini saptadılar. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hem sessiz hem de aktif PDR'li hastaların vitröz sıvılarında pro-MMP-9'un yükselmiş olduğunu buldular. Ancak sessiz PDR'deki pro-MMP-9 düzeyleri aktif hastalığa göre düşüktü. Bu araştırmacılar diabetik retinopati oluşumunda MMP'lerin rolü olduğunun ileri sür÷lebileceğini bildirdiler (55).

Diabetik retinopatideki erken vask÷ler değişiklikler perisitlerin kaybını içerir ve bu fenomenin bazal membran ve çevresindeki matriksin MMP'lerle degradasyonu yoluyla gerçekleştiği öne sür÷lmektedir. Yapılan başka bir çalışmada MMP-9'un PDR'li gözlerin vitröz sıvısında yükselmiş olduğunun gör÷lmesi ve bu MMP'nin varlığında mikrovask÷ler endotel permeabilitesinde artışın olması da MMP-9'un diabetik neovask÷larizasyonda rolü olabileceği gör÷şünü desteklemektedir (53).

Bu çalışmada BDR ve PDR'li hastaların serum MMP-9 düzeyleri ölç÷ldü ancak PDR'li hastalarımızın tümü lazer tedavisi aldığından aktif PDR'li değildiler. Herikisinde de MMP-9'un kontrol grubuna göre yüksek olduğu saptandı ancak aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı

bulunmadı. Ayrıca komplikasyonsuz DM grubundan düşük olmakla birlikte bununla da aralarındaki fark istatistiksel anlamlılık göstermiyordu. Serum VEGF düzeylerinde olduğu gibi lazer tedavisi alan PDR'li hastalarımızın MMP-9 düzeyleri de BDR'li olanlara göre istatistiksel anlamlılığı olmayan bir düşme gösterdi. Diabetik retinopatili hastaların serumlarında MMP-9 ölçümüne dair bir literatüre rastlamadık ancak PDR'li hastalardaki bu düşme VEGF'de ileri sürdüğümüz gibi vitröz sıvıdan seruma yansıdığına düşündüğümüz MMP-9'un lazer tedavisi ile yeni oluşan damarların fotokoagülasyonu sonucu azalmasına bağlı olabilir. Ayrıca hem VEGF hem de MMP-9 düzeyinin komplikasyonsuz grupta diabetik retinopatidekinden yüksek olması bu faktörlerin hastalığın erken evresinde daha fazla etkili olduğunu akla getirebilir. Bu konuda serum ve vitröz sıvı birlikte kullanılarak yapılacak daha geniş çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada tüm DM grupları ve kontrol grubunun glisemi durumunu görmek ve glisemi kontrolünün mikrovasküler komplikasyonlardaki rolünü değerlendirmek için HbA1c düzeyleri de ölçüldü. Tüm DM gruplarının değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulunmasının yanısıra mikrovasküler komplikasyonlu 4 grubun değerleri komplikasyonsuz gruba göre yüksek olarak saptandı. Bunlardan makroalbuminüri ve BDR'li grubun değerleri ile komplikasyonsuz grubun değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak da anlamlıydı (sırasıyla $p < 0.001$, $p < 0.01$).

Klinik pratikte diabetik hastaların glisemi durumunu izlemek için glikoHb ölçümü HbA1c olarak veya total glikoHb olarak sıkça kullanılmaktadır. The American Diabetes Association (ADA) glisemi durumu stabil olan hastalarda en az yılda 2 kez, tedavi prosedürü değişenlerde veya glisemik hedefe ulaşılamayanlarda daha sık glikoHb ölçümünü tavsiye etmektedir. ADA; tedavi hedefinin glikoHb

konsantrasyonunu %7'nin altında tutacak şekilde belirlenmesini ve eğer %8'in üzerindeyse tedavi rejiminin yeniden değerlendirilmesi gerektiğini tavsiye etmektedir (56).

The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) yaptığı büyük çaplı çalışmada geleneksel tedavi altındaki hastalarla karşılaştırıldığında (ortalama HbA1c'leri %9) yoğun tedavi altındaki hastalarda (ortalama HbA1c'leri %7) diabetik komplikasyonların gelişimi ve progresyonunda belirgin bir azalma saptadı. Ayrıca "iyi metabolik kontrollü" hastalarda (ortalama HbA1c \leq %6.87), "zayıf metabolik kontrollü" hastalara göre (ortalama HbA1c \geq %9.49) diabetik retinopati gelişme oranının çok daha düşük olduğunu bildirdi (57).

Tip II DM'lu 123 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada MAU gelişen grubun 6 yıllık ortalama HbA1c düzeyleri (%9.0) normoalbuminürik kalan hastalarla (%8.1) karşılaştırıldığında daha yüksek bulundu. DCCT ve United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) düzeltilmiş glisemik kontrolün Tip I ve Tip II DM hastalarının ikisinde de bazı mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların gelişimini ve progresyonunu azalttığını gösterdiler (56).

Çalışmamızda mikrovasküler komplikasyonlara sahip 4 DM grubunun tümünün % HbA1c değerlerinin komplikasyonsuz gruba göre yüksek bulunması tüm bu çalışmaların sonuçlarıyla uyumluydu.

Bu tez çalışmasında ayrıca HbA1c düzeyleriyle VEGF ve MMP-9 düzeylerinin ayrı ayrı korelasyonu da değerlendirildi ve HbA1c düzeylerinin VEGF ile anlamlı korelasyon gösterdiği saptandı ($r = 0.317$; $p < 0.01$). HbA1c ile MMP-9 düzeyleri ise korelasyon göstermedi ($r = 0.125$; $p > 0.05$).

Chiarelli ve arkadaşları Tip I DM'lu hastalarda yaptıkları çalışmada VEGF düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı yüksek

buldular ve HbA1c ile VEGF arasında korelasyon saptadılar ($r = 0.372$; $p < 0.01$). Bu sonuca göre glisemik kontrolün VEGF s rum seviyelerini etkilediğini bildirdiler (58). Maxwell ve arkadaşları ise Tip I DM'lu ve normal renal fonksiyonlu hastalarda yaptıkları çalışmada MMP-9 plazma düzeylerini kontrollere göre yüksek bulurken HbA1c ile MMP-9 arasında bir korelasyon saptayamadılar (59). İki çalışmanın bulguları da bizim bulgularımızla uyumluydu.

Sonuç olarak bu çalışmada Tip II DM'da VEGF serum düzeylerinin anlamlı şekilde yükseldiği ve HbA1c artışının da buna katkısı olduğu saptandı. Özellikle diabetik nefropatide olmak üzere Tip II DM ve onun mikrovasküler komplikasyonlarının patogenezinde VEGF'nin önemli rolleri olabileceği sonucuna varıldı. Ancak VEGF antagonistleri veya VEGF antikorları kullanılarak yapılacak antianjiogenik tedavi prosedürlerinin DM hastalarında uygulanabilmesi için daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Ayrıca MMP-9 ile DM arasındaki ilişkinin aydınlatılabilmesi için de geniş çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir.

VI. SONUÇ

Bu çalışmada anjiogenezle ilgili faktörler olan VEGF ve MMP-9'un Tip II DM ve onun mikrovasküler komplikasyonlarından olan diabetik nefropati ve diabetik retinopatiyle olası ilişkisi değerlendirildi. Bu ilişkinin VEGF ve MMP-9 serum düzeylerine yansımaları incelendi. Ayrıca HbA1c düzeyleri de saptanarak glisemi kontrol durumunun bu komplikasyonlardaki rolü ve HbA1c düzeyleriyle VEGF ve MMP-9 düzeyleri arasında korelasyon olup olmadığı araştırıldı. Bu amaçla 60 DM hastası ve 20 sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 80 olgu incelendi. Şu sonuçlar elde edildi:

1. DM hastalarının VEGF düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p < 0.001$). Komplikasyonsuz DM grubu, MAU grubu ve Makroalbuminüri grubu ile kontrol grubu VEGF düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenirken (sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.01$) BDR ve PDR'li gruplar ile kontrol grubu arasında istatistiksel düzeyde anlamlılık saptanmadı ($p > 0.05$).

2. DM hastalarının MMP-9 düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmasına karşın aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($P > 0.05$). DM grupları kontrol grubuna göre ayrı ayrı değerlendirildiğinde yine istatistiksel düzeyde anlamlılık bulunamadı ($p > 0.05$).

3. DM hastalarının HbA1c düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p < 0.001$). DM gruplarının tümü ayrı ayrı kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunduğu gibi komplikasyonlu grupların HbA1c düzeyleri komplikasyonsuz gruba göre de yüksekti. Makroalbuminüri grubu ve BDR grubu ile komplikasyonsuz grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $p < 0.001$ ve $p < 0.01$).

Bu verilerin ışığında, VEGF'nin DM patofizyolojisinde rol oynayan faktörlerden biri olduğu ancak bu hastalarda antianjiogenik tedavilerin başlatılması için daha geniş çalışmalara ihtiyaç olduğu sonucuna varıldı. Ayrıca HbA1c düzeyiyle VEGF düzeyi arasında pozitif korelasyon saptanması nedeniyle glisemi durumunun düzeltilmesiyle VEGF'nin zararlı etkilerinin azaltılabileceği yönünde bir sonuç elde edildi.



VII. KAYNAKLAR

1. Yenigün M. : DM'un tanımı, tanısı ve sınıflaması, DM'da laboratuvar, tanı izleme testleri ve metodları. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2001, pp.51-63.
2. Duh E., Aiello LP. : Vascular Endothelial Growth Factor and Diabetes.The agonist versus antagonist paradox. Diabetes, 48:1899-1906, 1999.
3. Stetler WG. : Matrix metalloproteinases in angiogenesis; a moving target for therapeutic intervention. J Clin Invest , 103:1237-1241, 1999.
4. Aiello LP., Wong JS. : Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications. Kidney Int , 58:113-119, 2000.
5. Thomas L. : Carbohydrate metabolism. Clinical Laboratory Diagnostics, 1st. ed., TH-Books Verlagsgesellschaft mbH. Frankfurt, 1998, pp.120-122.
6. Burtis CA., Ashwood ER. : Carbohydrates. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3th. ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1999 pp.766-791.
7. Chakrabarti S., Cukiernik M., Hileeto D., Evans T., Chen S. : Role of vasoactive factors in the pathogenesis of early changes in diabetic retinopathy. Diabetes Metab Res Rev , 16:393-407, 2000.
8. Cooper ME. : Interaction of metabolic and haemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy. Diabetologia , 44:1957-1972, 2001.
9. Cha DR., Kim NH., Yoon JW., Jo SK., Cho WY., Kim HK., Won NH. : Role of vascular endothelial growth factor in diabetic nephropathy. Kidney Int, 58:104-112, 2000.

- 10. Leehey DJ., Singh AK., Alavi N., Singh R. : Role of angiotensin II in diabetic nephropathy. *Kidney Int*, 58:93-98, 2000.**
- 11. Chiarelli F., Santilli F., Mohn A . : Role of growth factors in the development of diabetic complications. *Horm Res*, 53:53-67, 2000.**
- 12. Funatsu H., Yamashita H., Shimizu E., Kojima R., Hori S. : Relationship between vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in diabetic retinopathy. *Retina*, 21:469-477, 2001.**
- 13. Flyvbjerg A. : Putative pathophysiological role of growth factors and cytokines in experimental diabetic kidney disease. *Diabetologia*, 43:1205-1223, 2000.**
- 14. Conrad WD., Franke S., Sommer M., Henle T., Stein G. : Differences in the modulating potential of advanced glycation end product (AGE) peptides versus AGE proteins. *Kidney Int*, 59:63-66, 2001.**
- 15. Kaplan LA., Pesce AJ. : Diabetes mellitus. *Clinical Chemistry: theory, analysis, correlation*. 3th.ed., Mosby-Year Book, New York, 1996, p.627.**
- 16. Chen S., Cohen MP., Lautenslager GT., Shearman CW., Ziyadeh FN. : Glycated albumin stimulates TGF- β 1 production and protein kinase C activity in glomerular endothelial cells. *Kidney Int*, 59:673-681, 2001.**
- 17. Xiang G., Schinzel R., Simm A., Sebekova K., Heidland A. : Advanced glycation end products impair protein turnover in LLC-PK1:Amelioration by trypsin. *Kidney Int*, 59:53-57, 2001.**
- 18. Betteridge DJ. : Advanced glycation end-products: impact on diabetic complications. *Diabetes Current Perspectives*. 1st.ed., Martin Dunitz Ltd., London, 2000, pp.79-80.**
- 19. Wilson JD. : Diabetes mellitus. *Williams Textbook of Endocrinology*. W.B.Saunders Company, 9th. ed., Philadelphia, 1998, pp.1018-1024.**
- 20. American Diabetes Association : Diabetic Nephropathy, Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care*, 25:85-93, 2002.**

- 21. Bonn D. : Blocking angiogenesis in diabetic retinopathy. Sci Med, 348:604-604, 1996.**
- 22. Qaum T., Xu Q., Jousseaume AM., Clemens MW., Qin W., Miyamoto K., Hasselmann H. et al. : VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes. Invest Ophthalmol Vis Sci, 42:2408-2413, 2001.**
- 23. Hofman P., Blaauwgeers HGT., Vrensen GFJM., Schlingemann RO. : Role of VEGF-A in endothelial phenotypic shift in human diabetic retinopathy and VEGF-A-induced retinopathy in monkeys. Ophthalmic Res, 33:156-162, 2001.**
- 24. Latil A., Bieche I., Pesche S., Valeri A., Fournier G., Cussenot O., Lidereau R. : VEGF overexpression in clinically localized prostate tumors and neuropilin-1 overexpression in metastatic forms. Int J Cancer (Pred Oncol), 89:167-171, 2000.**
- 25. Mathews MK., Merges C., McLeod DS., Lutty GA. : Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Permeability Changes in Human Diabetic Retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci, 38:2729-2741, 1997.**
- 26. Waltenberger J. : Impaired collateral vessel development in diabetes: potential cellular mechanisms and therapeutic implications. Cardiovasc Res, 49:554-560, 2001.**
- 27. Kanellis J., Paizis K., Cox AJ., Stacker SA., Gilbert RE., Cooper ME., Power A. : Renal ischemia-reperfusion increases endothelial VEGFR-2 without increasing VEGF or VEGFR-1 expression. Kidney Int, 61:1696-1706, 2002.**
- 28. Jelkmann W. : Pitfalls in the Measurement of circulating Vascular Endothelial Growth Factor. Clin Chem, 47:617-623, 2001.**
- 29. Clermont AC., Aiello LP., Mori F., Aiello LM., Bursell SE. : Vascular Endothelial Growth Factor and severity of nonproliferative diabetic retinopathy mediate retinal hemodynamics in vivo : A potential role for**

vascular endothelial growth factor in the progression of nonproliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*, 124:433-446, 1997.

30. Hovind P., Tarnow L., Oestergaard PB., Parving HH. : Elevated vascular endothelial growth factor in type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Kidney Int*, 57:56-61, 2000.

31. Santilli F., Spagnoli A., Mohn A., Tumini S., et al. : Increased vascular endothelial growth factor serum concentrations may help to identify patients with onset of type 1 diabetes during childhood at risk for developing persistent microalbuminuria. *J Clin Endoc Metab*, 86:3871-3876, 2001.

32. Cursiefen C., Schönherr U. :Angiogenese und angiogenesehemmung im auge. *Klin Monatsbl Augenheilkd*, 210:341-351, 1997.

33. Lijnen R. : Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost*, 86:324-333, 2001.

34. Stetler WG. : Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. *Am J Pathol*, 148:1345-1350, 1996.

35. Woessner JF. : Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J*, 5:2145-2154, 1991.

36. Amano S., Akutsu N., Matsunaga Y., Kadoya K., Nishiyama T., Champiaud MF., Burgeson RE., Adachi E. : Importance of balance between extracellular matrix synthesis and degradation in basement membrane formation. *Exp Cell Res*, 271:249-262, 2001.

37. Gomez DE., Alonso DF., Yoshiji H., Thorgeirsson UP. : Tissue inhibitors of metalloproteinases:structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*, 74:111-122, 1997.

38. Galateau-Salle FB., Luna RE., Horiba K., Sheppard MN. et al. : Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in bronchial squamous preinvasive lesions. *Human Pathol*, 31:296-305, 2000.

- 39.** Grant MB., Caballero S., Tarnuzzer RW., Bass KE., Ljubimov AV., Spoerri PE., Galardy RE. : Matrix metalloproteinase expression in human retinal microvascular cells. *Diabetes*, 47:1311-1317, 1998.
- 40.** Iizasa T., Fujisawa T., Suzuki M., Motohashi S., Yasufuku K., Yasukawa T., Baba M., Shiba M. : Elevated levels of circulating plasma matrix metalloproteinase 9 in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res*, 5:149-153, 1999.
- 41.** Tryggvason K., Höyhty M., Pyke C. : Type IV collagenases in invasive tumors. *Breast Cancer Res Treat*, 24:209-218, 1993.
- 42.** Uemura S., Matsushita H., Li W., Glassford AJ., Asagami T. : Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity. *Circ Res*, 22:1291-1298, 2001.
- 43.** Felig P., Baxter JD., Frohman LA. : Fuel metabolism. *Endocrinology and Metabolism*. 3th.ed., (International Edition), McGraw-Hill, New York, 1995, p.1178.
- 44.** Braun L., Kardon T., Porszasz R., Banhegyi G., Mandl J. : The regulation of the induction of vascular endothelial growth factor at the onset of diabetes in spontaneously diabetic rats. *Life Sci*, 69:2533-2542, 2001.
- 45.** Tsuchida K., Makita Z., Yamagishi S., Atsumi T., Miyoshi H. : Suppression of transforming growth factor beta and vascular endothelial growth factor in diabetic nephropathy in rats by a novel advanced glycation end product inhibitor, OPB-9195. *Diabetologia*, 42:579-588, 1999.
- 46.** Paques M., Massin P., Gaudric A. : Growth factors and diabetic retinopathy. *Diabetes Metab (Paris)*, 23:125-130, 1997.
- 47.** Hernandez C., Burgos R., Canton A., Garcia-Arumi J. : Vitreous levels of vascular cell adhesion molecule and vascular endothelial growth factor

in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care*, 24:516-521, 2001.

48. Burgos R., Simo R., Audi L., Mateo C., Mesa J. : Vitreous levels of vascular endothelial growth factor are not influenced by its serum concentrations in diabetic retinopathy. *Diabetologia*, 40:1107-1109, 1997.

49. Funatsu H., Yamashita H., Noma H., Mimura T., Yamashita T. : Increased levels of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in the aqueous humor of diabetics with macular edema. *Am J Ophthalmol*, 133:70-77, 2002.

50. Mc Lennan SV., Fisher E., Martell SY., Death A K. : Effects of glucose on matrix metalloproteinase and plasmin activities in mesangial cells: Possible role in diabetic nephropathy. *Kidney Int*, 58:81-87, 2000.

51. Ebihara I., Nakamura T., Shimada N., Koide H. : Increased plasma metalloproteinase-9 concentrations precede development of microalbuminuria in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis*, 4:544-550, 1998.

52. Zaoui P., Cantin JF., Alimardani-Bessette M., Monier F., Halimi S., Morel F. : Role of metalloproteases and inhibitors in the occurrence and progression of diabetic renal lesions. *Diabetes Metab (Paris)*, 26:25-29, 2000.

53. Salzmann J., Astrid Limb G., Khaw PT., Gregor ZJ. : Matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fibrovascular membranes of proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol*, 84:1091-1096, 2000.

54. Jin M., Kashiwagi K. : Matrix metalloproteinases in human diabetic and nondiabetic vitreous. *Retina*, 21:28-33, 2001.

55. Kosano H., Okano T., Katsura Y., Noritake M. : ProMMP-9 (92kDa Gelatinase) in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Life Sci*, 64:2307-2315, 1999.

- 56.** Krishnamurti U., Steffes MW. : Glycohemoglobin: A primary predictor of the development or reversal of complications of diabetes mellitus. Clin Chem, 47:1157-1165, 2001.
- 57.** Zhang LY., Krzentowski G., Albert A., Lefebvre PJ. : Risk of developing retinopathy in diabetes control and complications trial type 1 diabetic patients with good or poor metabolic control. Diabetes Care, 24:1275-1279, 2001.
- 58.** Chiarelli F., Spagnoli A., Basciani F., Tumini S., Mezzetti A. : Vascular endothelial growth factor (VEGF) in children, adolescents and young adults with type 1 diabetes mellitus: Relation to glycaemic control and microvascular complications. Diabet Med, 17:650-656, 2000.
- 59.** Maxwell PR., Timms PM., Chandran S., Gordon D. : Peripheral blood level alterations of TIMP-1, MMP-2 and MMP-9 in patients with type 1 diabetes. Diabet Med, 18:777-780, 2001.