

**T.C.**  
**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TİP-I DİYABET HASTALARINDA SERUM KARBONİK ANHİDRAZ I VE II**  
**OTOANTİKOR DÜZEYLERİ İLE DİYABETİK RETİNOPATİ ARASINDAKİ**  
**İLİŞKİ**

**Uzmanlık Tezi**

**Dr. Süleyman MOLLAMEHMETOĞLU**

**Trabzon - 2013**

**T.C.**  
**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TİP-I DİYABET HASTALARINDA SERUM KARBONİK ANHİDRAZ I VE II**  
**OTOANTİKOR DÜZEYLERİ İLE DİYABETİK RETİNOPATİ ARASINDAKİ**  
**İLİŞKİ**

**Uzmanlık Tezi**

**Dr. Süleyman MOLLAMEHMETOĞLU**

**Tez Danışmanı:**  
**Doç. Dr. Adem TÜRK**

**Trabzon - 2013**

## ÖNSÖZ

Göz Hastalıkları uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Nurettin Akyol'a, Sayın Prof. Dr. H. İbrahim İmamoğlu'na, Sayın Prof. Dr. Hidayet Erdöl'e, Sayın Prof. Dr. Avni M. Avunduk'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet Kola'ya, Sayın Doç. Dr. Adem Türk'e ;

Tez çalışmamda çok emeği geçen, eğitimim süresince yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen, tezimin her bölümünde çok emeği olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Adem Türk'e ;

Asistanlık sürecinin acı tatlı günlerini birlikte paylaştığım tüm asistan ve uzman arkadaşlarıma;

Birlikte çalıştığım tüm hastane personeline ve hemşire arkadaşlara beni sürekli destekleyen ailem ve biricik eşime teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Süleyman MOLLAMEHMETOĞLU

Trabzon, 2013

## İÇİNDEKİLER

<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>2</b>
2.1 Diyabetes Mellitus	2
2.1.1 Tanım	2
2.1.2 Epidemiyoloji	2
2.1.3 Etiyopatogenez	3
2.1.4 Patofizyoloji	4
2.1.5 Diyabetik Retinopati	5
2.1.6 Diyabetin Retina Üzerine Etkisi	5
2.1.7 Diyabetik Retinopati Gelişimini Etkileyen Faktörler	6
2.1.8 Diyabetik Retinopatide Retinal Lezyonlar	7
2.1.9 Diyabetik Retinopatin Sınıflandırılması	9
2.1.10 Ayırıcı Tanı	9
2.1.11 Diyabetik Retinopatinin Tedavisi	9
2.2 Karbonik Anhidraz Enzimi	10
2.2.1 Karbonik Anhidraz-I İzoenzimi	10
2.2.2 Karbonik Anhidraz-II İzoenzimi	11
2.2.3 Otoimmünite	12
2.2.4 Karbonik Anhidraz I-II Enzimlerinin Otoimmünite ile İlişkisi	13
<b>3. MATERYAL VE METOD</b>	<b>14</b>
<b>4. BULGULAR</b>	<b>19</b>
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>23</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>26</b>
<b>7. ÖZET</b>	<b>27</b>
<b>8. SUMMARY</b>	<b>28</b>
<b>9. KAYNAKLAR</b>	<b>29</b>

**TABLO VE GRAFİKLER**

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1: Karbonik anhidraz izoenzimleri, hidrataz aktiviteleri ve hücre içi yerleşimleri	11
Tablo 2: Karbonik anhidraz II enziminin memelilerde doku dağılımı ve görevleri	11
Tablo 3: Çalışmadaki biyokimyasal analizlerde kullanılan cihaz ve sarf malzemelerinin listesi	15
Tablo 4: Diyabetik retinopati ile yaş, diyabet süresi ve karbonik anhidraz II otoantikor düzeyleri arasındaki (multivariate) lojistik regresyon analiz tablosu	22
Grafik 1: Diyabetik retinopatisi olan grup ile diyabetik retinopatisi olmayan grupların diyabet süresi ve HbA1c düzeyleri açısından karşılaştırılması	21
Grafik 2: Diyabetik retinopatili hastalar ile sağlıklı kontrol grubunun ortalama karbonik anhidraz-I ve II otoantikor düzeylerinin karşılaştırılması	22

## KISALTMALAR

- DM: Diyabetes Mellitus
- DR: Diyabetik Retinopati
- KA: Karbonik Anhidraz
- ADA: American Diabetes Association (Amerikan Diyabet Derneği)
- HLA: Human Leukocyte Antigen (İnsan Lökosit Antijeni)
- IAA: Insuline Autoantibodies (İnsulin Otoantikoru)
- GADA: Glutamic acid decarboxylase autoantibodies (Glutamik asit dekarboksilaz otoantikoru)
- AGE: Advaced Glycosylation Endproduct (İleri Glikozilasyon Son Ürünleri)
- PKC: Protein Kinaz C
- HBY: Hekzoamin Biyosentez Yolađı
- UKPDS:UK Prospective Diabetes Study Group (Birleşik Krallık Prospektif Diyabet Çalışma Grubu)
- LDL: Low Density Lipoprotein (Düşük dansiteli lipoprotein)
- MA: Mikroanevrizma
- FFA: Fundus Floresein Anjiografi
- RH: Retinal Hemoraji
- SE: Sert Eksuda
- İRMA: İntretinal Mikrovasküler Anomaliler
- NV: Neovaskülarizyon
- NVD: New vessels on the disc (Disk neovaskülarizasyonu)
- NVE: New vessels elsewhere (Optik disk dışında retinanın herhangi bir yerinde neovaskülarizasyon)
- MÖ: Maküler Ödem

- ETDRS: Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study (Diyabetik Retinopati Erken Tedavi Çalışması)
- FAZ: Foveal Avasküler Zon
- DMÖ: Diyabetik Maküler Ödem
- VH: Vitre Hemorajisi
- VB: Venöz Boncuklanma
- DRS: Diabetic Retinopathy Study (Diyabetik Retinopati Çalışması)
- VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü)
- CAR: Cancer Associated Retinopathy (Kanser ile ilişkili retinopati)
- OR: Otoimmun Retinopati
- OCT: Optical Coherence Tomography (Optik kohorens tomografi)

## GİRİŞ

Diyabetes mellitus (DM), insülin hormonunun eksikliği ve ya dokularda gelişen direnç nedeniyle etkisizliği sonucu ortaya çıkan, etiolojinde birçok faktörün rol oynadığı kronik bir hastalıktır (1). DM, Tip-I ve Tip-II olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır (2).

DM'nin birçok sistemi etkileyen mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonları bulunmaktadır. Mikrovasküler komplikasyonları diyabetik retinopati, nefropati ve nöropatidir. Makrovasküler komplikasyonları ise koroner kalp hastalığı, serebrovasküler hastalık ve periferik damar hastalığıdır (3). Diyabetik retinopati (DR), DM'nin en sık görme kaybına yol açan komplikasyonudur (4).

Tip-I DM'nin etiolojisinde otoimmunitenin etkili olabileceği ilk olarak 1965 yılında yapılan bir çalışmada, pankreasta insulitis tablosu varlığıyla düşünülmüştür. İlerleyen yıllarda hastalığın HLA ile ilişkisinin ortaya çıkması ve immunsupresif tedavinin pankreas beta hücreleri üzerine koruyucu etkisinin bulunması bu düşünceyi daha da güçlendirmiştir (5).

Karbonik anhidraz (KA), intaselüler ve ekstraselüler pH'nın dengelenmesinde kritik rol oynayan bir enzimdir. Memeli hücrelerinde, günümüze kadar tanımlanan 16 farklı KA izoenzimi bulunmaktadır. KA'ya karşı gelişen otoantikolar sistemik lupus eritamatozus, romatoid artrit ve Tip-I DM gibi birçok otoimmün kökenli hastalıkta tespit edilmiştir (6).

Bu çalışmanın amacı, Tip-I DM hastalarındaki KA (KA-I ve KA-II) otoantikolar düzeylerinin sağlıklı kontrol grubu ile kıyas ederek araştırmak ve böylece otoimmün kökenli bir hastalık olduğu düşünülen Tip-I DM'nin etiopatogenenezinde KA-I ve KA-II otoantikolar seviyelerinin muhtemel rolünü incelemektir. Bu çalışmanın bir diğer amacı da DR gelişiminde bu iki otoantikoların muhtemel etkisini değerlendirmektir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. DİYABETES MELLİTUS

#### 2.1.1 Tanım

Diyabetes Mellitus (DM), insülin eksikliği ve ya insülin etkisindeki yetersizlik nedeniyle vücudun karbonhidrat, yağ ve proteinden etkili biçimde yararlanamadığı akut komplikasyonlarıyla ölüme neden olan, kronik komplikasyonlarıyla özellikle retinal, renal ve nöral dokuyu etkileyen, uzun süreli tedavi gerektiren kronik bir metabolik hastalıktır (7). DM genel olarak Tip-I ve Tip-II olarak 2 büyük gruba ayrılır. Tip-I DM, insülinin kesin eksikliği sonucu Tip-II DM ise insülin resistansı ve ya yetersiz insülin cevabı nedeniyle oluşur. DM, American Diabetes Association (ADA) tarafından 2011 yılında etiyolojik açıdan sınıflandırılmıştır (2).

Tip-I Diyabet (beta hücre deskrüksiyonu)

Tip-II Diyabet (insülin resitansına bağlı)

Diğer Spesifik Tipleri

Beta hücre fonksiyonunda genetik defekt

İnsülin aktivasyonunda ki genetik defekt

Egzokrin pankreas hastalıkları

Endokrinopatiler

İlaç ve kimyasal ajanlar

İnfeksiyonlar

İmmun aracılıklı diyabet

Genetik sendromlar

Gestasyonel Diyabet

#### 2.1.2 Epidemiyoloji

DM, dünya genelinde en sık karşılaşılan endokrin hastalığıdır (8). Tüm yaş grupları dikkate alındığında DM'nin prevalansı 2000 yılında % 2.8 iken 2030 yılında bu oranın % 4.4'e yükseleceği tahmin edilmektedir. DM'li hasta sayısının, 2000 yılında 171 milyon iken bu sayının 2030 yılında 366 milyona ulaşacağı düşünülmektedir. Tip-II

DM, tüm yaş grupları dikkate alındığında batı dünyasında ki prevalansı %10-15 civarındadır (9). Tip- I DM'nin son 20 yılda hem insidansında hem de prevalansında dramatik düzeyde artış kaydedilmiştir. Hastalığın görülme yaşı giderek 5 yaş altına inmektedir. Amerika'da, Tip-I DM prevalansı ve insidansı sırasıyla 1.7-2.5/1000 ve 15-17/100000 olarak bildirilmiştir. Avrupa Diyabet Çalışma Grubunun yaptığı araştırmada, Tip-I DM'nin insidansındaki yıllık artış hızı %3.4 olarak hesaplanmıştır (10-12). Ayrıca ABD'de her yıl 1.3 milyon yeni tanı alan hasta saptanmaktadır (9).

Artan popülasyon, yaşlanma, şehirleşme, obezite ve azalmış fiziksel aktivite bağlı olarak DM artış göstermektedir (13). Ülkemizde Onat ve arkadaşlarının 1990 yılında yaptığı çalışmada yaş gruplarına göre değişiklik arz etsede ortalama olarak diyabet prevalansı erkeklerde %8.3, kadınlarda ise %9.5 olarak bulunmuştur (14).

### **2.1.3 Etiyopatogenez**

Tip-I DM, pankreas beta hücrelerinin otoimmün hasarı sonucu meydana gelmektedir. Yapılan histolojik incelemelerde pankreas adacık hücrelerinin lenfosit ve makrofajlar ile infiltre olduğunun gösterilmesi, otoimmün hasarın bir göstergesidir. Aynı zamanda Tip-I DM'nin diğer otoimmün hastalıklarla beraber bulunması nedeniyle immün sistemde ki bozulmaların rolü üzerinde durulmuştur (15). Genetik etmenler ve çevresel faktörlerin hastalığın etiopatogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir (16-19)

Genetik ve çevresel faktörler, pankreas beta hücrelerine karşı otoimmün sürecin başlamasında tetikleyici rol oynamaktadır. Bu hasar süreci yavaş progresyon göstermekte ve beta hücrelerinin %80-90'ının hasarlanması sonucu ancak klinik bulgu vermektedir. Otoimmün mekanizmalar iki yolla oluşturmaktadır. Birincisi pankreas beta hücrelerinin haraplanması diğeri ise ortamda bulunan sitokinlerin insülin salınımını azaltmasıdır. Otoimmün süreç sırasıyla çevresel faktörlere maruziyet, T hücrelerinin uyarılması, T hücrelerinin farklılaşması ve beta hücrelerinin hasarı şeklinde olmaktadır. Bu metabolik olayların gelişim süreci kişiler arasında farklılık göstermektedir. Tip-I DM tanısı alan hastaların %70-80'inde beta hücrelerine karşı oluşan antikorlar tespit edilmektedir. İlk tanımlanan antikor adacık hücre antikorudur. [ICAs (Islet cell Antibodies)] (10-12,20-22).

Stres durumunda, immün sistemde değişikliklere yol açarak steroid salgılanmasını arttırmakta bunun sonucunda insülin ihtiyacı artış göstererek, DM' nin daha aşikar hale gelmesine neden olmaktadır (23).

Tip-II toplumda en çok görülen diyabet tipidir. Çevresel ve genetik faktörler göz önüne alındığında 3 mekanizma ile Tip-II DM oluşmaktadır. Bunlar periferik dokularda insüli direnci, pankreastan insülin salınım kusuru ve karaciğerde glukoz üretimi olarak sıralanabilir. (24-25).

#### **2.1.4 Patofizyoloji**

İnsülinin en önemli görevi hücrelerin enerji ihtiyacı düzenlemek ve enerji verici moleküllerin depolanmasını sağlamaktır. İnsülin salınımı, besinlerin alınmasını takiben hormonal, nöronal ve substratlarla ilişki olarak düzenlenmektedir. Metabolik dengenin sağlanması için insülinin, açlık ve tokluk durumlarında düzenli salınımı gerekmektedir. Tip-I DM'de beta hücre hasarı sonucu insülin sekresyonunda azalma olmaktadır (insilopeni), bunun neticesinde kan şekeri yüksekliği (hiperglisemi) gelişmektedir. Yağ ve kas dokusu hiperglisemi olmasına rağmen glukozu hem enerji ihtiyacında hem de depolamada kullanamamaktadır. Karaciğer ise bu ihtiyacı karşılamak için glikojenoliz (depo glikojenin yıkımı) ve glikoneogenezis (metabolik yollardan yeni glukoz üretimi) yapmaktadır. Böylece kan şekeri yükselmesine neden olmaktadır. Hiperglisemi sonucu dehidratasyon ve elektrolit dengesizliği meydana gelmekte ayrıca stress hormonları (glukagon, kortizol, büyüme hormonu ve epinefrin) salınmaktadır. Stress hormonlarındaki artış lipit yıkımını beraberinde getirmekte böylece metabolik denge tamamen bozulmaktadır (26).

DM'ye bağlı hiperglisemi, birkaç mekanizma ile vasküler hasara neden olmaktadır. Bu mekanizmalar glukoz ve benzer şeker ürünlerinin sorbitol yoluna kayması, hücre içerisinde ileri glikolizasyon ürünlerinin AGE (Advanced Glycosylation Endproduct) artışı, AGE'nin reseptörlerinde artış, Protein kinaz C (PKC) aktivasyonu ve hekzoaminaz yolunun aktivasyonu şeklinde açıklanmaktadır.

Glukoz, aldoz redüktaz enzimi ile sorbitole dönüştürülür. Aldo redüktaz sinir, retina, lens, glomerul ve vasküler hücrelerde bulunmakta ve enzimin foksiyonunu icra edebilmesi için kofaktör olarak NADPH gerekmektedir. Reaksiyon sonrası ortamda biriken sorbitol, sorbitol dehidrogenaz ile fruktoza çevrilir. Böylece sorbitol arttıkça NADPH azalır ve vasküler hasara neden olan myoinositol ortamda birikir (27,28).

İleri glikolizasyon ürünleri, non enzimetik yollarla oluşur. Parçalanmaya dayanıklık olan bu ürünlerin birikmesi, intraselüler proteinlerin fonksiyonlarını bozarak, ekstrasüler matriks bileşenleri ve matriks reseptörleri ile anormal etkileşimi girerek,

makrofaj, vasküler endotel hücre ve vasküler kas hücrelerindeki AGE reseptörlerine bağlanarak hücre hasarına neden olurlar (29).

PKC, uyarıldıktan sonra sitozolden plazmaya geçerek aktive olur. Yüksek glikoz düzeylerinde PKC'nin aktivasyonu artar. Bunun sonucunda hem hücrelerin albümine karşı geçiçenliği artar hem de vazodilatör mediyatörlerin salınımına neden olur. PKC aktivasyonu ile endotel hücrelerinde 1-2 diaçilgliserol miktarı artar. Hiperglisemi ile artan PKC aktivasyonu vasküler hücre disfonksiyonuna neden olur (28).

Hücre içine giren glikozun yaklaşık %2-4'ü hekzoamin biyosentez yolağına girmektedir. Bu yolağın son ürünü olan üridindifosfat-N-asetilglukozamin, glikozilasyon reaksiyonlarının substratıdır. Hiperglisemi durumunda hekzoamin biyosentez yolağında artış sonucunda glikoliz baskılanır ve oksidatif stress artar (30).

### **2.1.5 Diyabetik Retinopati**

Diyabetik retinopati (DR), hiperglisemi ve ya insülin yetersizliği sonucu ortaya çıkan, retinada kapillerlerin, venüllerin ve arteriyollerin tutulduğu spesifik bir mikroanjyopati tablosudur (31). Diyabetik popülasyonun yaklaşık olarak %25'inde herhangi bir seviyede DR vardır. Amerika Birleşik Devletleri'nde Framingham grubu tarafından yapılan çalışmada retinopati ile geçen süre arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Örneğin; 5 yıldan kısa sürelielerde %5, 5-9 yıl arasındakilerde %30, 10-14 yıl arasındakiler de %45 ve 15 yıldan uzun süreli hastalarda ise %62 olarak bildirilmiştir (32). Diyabetik retinopati, edinsel körlük nedenlerinin arasında ilk sırada gelmektedir.(33).

### **2.1.6 Diyabetin Retina Üzerine Etkisi**

Retina gözün en iç tabakasıdır ve nöroektodermden gelişmektedir. Retina sinir hücreleri; fotoreseptörler, amakrin, bipolar, horizontal ve gangliyon hücrelerini içermektedir. Glial hücreler (Müller hücreleri ve astrositler), nöronlarla vasküler hücreler arasında bulunurlar ve beslenme ve regülasyonda görev alırlar (34,35).

Retina vasküler otheregülyasyona sahiptir. Retinal mikrodolaşımın parçaları prekapiller arteriyoller, kılcak damarlar ve postkapiller venüllerdir. Arteriyoller sahip oldukları düz kas sayesinde çaplarını değiştirerek retinaya gelen kan akımını düzenlemektedirler (36).

Diyabetik retinopati, retinanın mikroanjyopatisidir. Mikrovasküler hasarın kesin nedeni günümüzde bilinmemektedir. Diyabetik retinopatide vasküler duvarda ve

hematolojik parametrelerde birçok değişiklikler olmaktadır. Diyabetik retinopati tipik histopatolojik değişiklikler, perisit ve endotel hücre kaybı ve kalınlaşmış bazal membrandır. Perisit kaybı damar duvarını zayıflamasına, genişlemesine son olarak bozulmuş kan retina bariyeri nedeniyle vasküler sızıntı neden olmaktadır. Mikroanevrizma, kapiller damarın dışı doğru balonlaşmasıdır ve DR için ilk bulgudur. Eritrosit deformitesi, artmış trombosit agregasyonu, serum fibrinojen ve  $\alpha_2$  globulin artışı, azalmış serum albümin seviyeleri vasküler hasar ile birleştğinde kapiller oklüzyon gelişmekte bu retinal iskemiye neden olmaktadır. Retina iskemi sonucunda ortaya çıkan hipoksi, retina yeni damar oluşumuna ve arteriovenöz şantların gelişimini tetiklemektedir (37,38).

### **2.1.7 Diyabetik Retinopati Gelişimini Etkileyen Faktörler**

#### **Yaş**

Puberte öncesi semptomlar genelde belirgin değildir. Puberte ile DR'nin şiddetinde artma gözlenmektedir. Bunun nedeni olarak IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) suçlanmaktadır (32,39).

#### **Hastalığın süresi**

Diyabetik retinopati varlığı ve gelişimi açısından en önemli risk faktörü olarak değerlendirilmektedir. Hastalığın süresi uzadıkça DR bulgularının görülme ihtimali artar. Tip-I DM tanısı alan hastaların 20 yıllık süre zarfında DR gelişme olasılığı %100'e yakın iken, Tip-II de bu oran % 60 civarındadır (39).

#### **Glisemik kontrol**

Diyabetin süresinde sonra, DR gelişimindeki en önemli 2. faktör kan glikoz seviyesidir. Diyabet Kontrolü ve Komplikasyonları Çalışması ve Birleşik Krallıklar Prospektif Diyabet Çalışması (UKPDS) çok merkezli ve uzun süreli çalışmalarında. Tip-I ve Tip-II DM'de, glisemik kontrol ile DR gelişim riskinin azaldığı ortaya konulmuştur (40,41).

#### **Sistemik Hastalıklar**

Yüksek kan basıncının DR gelişiminde risk faktörü olduğu gösterilmiştir (42). Proteinüri, artmış üre ve kreatinin düzeyleri ile karakterize olan kronik böbrek hastalığı, DR gelişimini hızlandırmaktadır (43). Total serum kolesterol seviyesi, düşük dansiteli lipoprotein (low-density lipoprotein LDL) ya da trigliserik düzeyleri, retina da sert eksuda oluşmasında ve gelişmesinde etkilidir (44). Gebelikte hormonal değişikliklere bağlı olarak, DR' de hızlı bir kötüleşme olabilir. Bu etki genellikle geçici olmakta ve

gebeliğin, uzun dönemde DR gelişme riski üzerine etkisi net olarak bilinmemektedir (45).

Alkol tüketiminin, DR üzerinde etkili olduğu gösteren birkaç çalışma vardır. Young ve arkadaşlarının (46) yaptıkları çalışmada, ağır alkol tüketiminin temelde retinopatisi olmayan hastalarda DR gelişimi açısından bir risk faktörü olduğu ortaya koyulmuştur. Anemide, retinal dokuda az miktarda oksijen bulunması nedeniyle DR gelişiminde risk faktörüdür (47).

### **Oküler faktörler**

Glokomlu gözler ve miyopik gözlerde DR gelişme olasılığının daha az olduğu gösterilmiştir. Arka vitre dekolmanı, koroidal dejenerasyonlar ve yaygın geçirilmiş koryoretinapati, DR’de koruyucu etkiye sahiptir (48).

### **2.1.8. Diyabetik Retinopatide Retinal Lezyonlar**

Mikroanevrizmalar (MA): Retinanın iç nükleer tabakasında yerleşirler. Perisit kaybına bağlı olarak hem retina kapillerlerde hem de koryokapillarisde damar duvarında baloncuklanma şeklinde görülmektedirler. Diyabetik retinopatinin oftalmoskopik olarak tespit edilen ilk lezyonlarıdır. Anevrizma bölgesindeki damar cidarının zayıflaması nedeniyle buradan floresein kolayca geçebilmektedir. Bu nedenle FFA (fundus floresein anjiyografide) özellikle venöz fazda anevrizmalar daha görünür hale gelmektedir (49,50).

Retinal Hemorajiler (RH): Mikroanevrizmanın rüptürü, dekompanse kapillerler ve intraretinal mikrovasküler anomaliler nedeniyle intraretinal hemorajiler oluşur. İntraretinal hemorajiler buldukları retina katmalarına göre farklı şekillerde görülebilirler. Eğer orta ve derin tabakalarda lokalizeyse, nokta veya oval şekilli yüzeyel tabakalarda lokalize ise, mum alevi veya iğ şeklinde görünüme sahiptirler (49-51).

Sert Eksuda (SE): Kan retina bariyerinin bütünlüğünün kaybolması sonucu, plazma ve lipoproteinlerin damar dışına sızması nedeniyle oluşurlar. Sarımsı renge sahip olup sınırları kısmen belirginlik arz eder. (49-51).

İntraretinal Mikrovasküler Anomaliler (İRMA): Retinal kapillerlerdeki irregüler, segmental dilatasyonu betimlemek için kullanılan terimdir. İRMA’nın ayırıcı tanısında rol oynayan özellikleri, intraretinal lokalizasyon göstermeleri, floresein anjiyografide diffüz sızıntı göstermeyişleri ve retinadaki büyük kan damarlarını çaprazlamayışlarıdır (49-52).

Yumuşak eksüdalar: Sinir lifi tabakasında gelişen infarktlara bağlı olarak oluşur.

Vasküler Değişiklikler: Çeşitli şekillerde (tespirlenme, parmak sucuk gibi) venöz değişimler görülmektedir. Arteriyollerde daralmanın yanında silinme de meydana gelmektedir (49,51).

Neovaskülarizasyon (NV): Yeni damar oluşumu optik sinir başı ve bir disk çapı uzaklıkta olursa NVD (New Vessels of the Disk), optik sinir dışında başka retinal alanlarda olursa ise NVE (NewVessels Elsewhere) olarak adlandırılır. Proliferatif evrenin en önemli göstergelerinden birisidir. Retinanın perfüzyon bozukluğunun sonucudur. Neovaskülarizasyonun şiddeti, yeni damar oluşumunun olduğu retinal bölgenin kaç optik disk çapı yer kapladığı şeklinde değerlendirilir (49,52).

Retinal Ödem: Kan retina bariyerinin bozulması neticesinde diffüz veya lokalize olabilen ödemdir. İlk olarak ödem dış pleksiform ve iç nükleer tabakalar arasında yerleşmektedir. Daha sonraları iç pleksiform ve sinir lifleri tabakalarına yayılmaktadırlar.

Maküler ödem (MÖ): Diyabetik retinopatide en önemli görme kaybı sebebi olarak bilinmektedir. Diyabette prevalansı yaklaşık %10 düzeyindedir. Maküler ödem, fokal veya diffüz olabilmektedir.

Fokal ödem, retinal kalınlaşmanın lokalize olması ile diffüz formdan ayrılmaktadır. İç kan retina bariyerinin yıkılması sonucu meydana gelmektedir ve sorumlu patolojik etmenler MA ile IRMA olarak bilinmektedir (49,51).

ETDRS (Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study) çalışma grubu tarafından maküler ödem iki gruba ayrılmıştır. Klinik olarak anlamlı olan ve görmeyi tehdit eden maküler ödem özellikleri şunlardır;

1. Foveal Avasüler Zone (FAZ) merkezinden 500 µ mesafeye kadar olan alanda retina kalınlaşmasına neden olan ödem.
2. FAZ merkezinden 500 µ mesafeye kadar olan alanda retina kalınlaşmasına neden olan sert eksudalar.
3. FAZ merkezinden bir disk mesafeye kadar olan alanda bir disk çapında retina kalınlaşması, ödem ve sert eksudalar (53).

Diffüz maküler ödem (DMÖ), arka kutupta kapiller yatakta tıkanma sonucu, vasküler yapılarda yaygın dilatasyon ve permabilite artışına neden olmaktadır. Böylece iç kan retina bariyerinin yıkımı meydana gelir (54).

Fokal ve diffüz maküler ödemden başka, iskemik maküler ödem de gelişebilmektedir. Muayenede, derin retina hemorajiler, yumuşak eksudalar ve maküler bölgede kapiller nonperfüze alanların görülmesiyle tanıya gidilmektedir (54).

Vitre hemorajisi (VH): Neovaskülarizasyon retina önünde bulunmakta ve asemptomatik olmaktadır. Oluşan yeni damarların kanaması sonucu genellikle subhyaloid hemoraji gelişmektedir. Zaman içerisinde vitreusun kontraksiyonu nedeniyle yeni oluşan damar ağı vitreye doğru çekilerek vitre hemorajisine neden olmaktadır.

Retina dekolmanı: Traksiyonel tiptedir. Neovaskülarizasyon gelişimi ile birlikte damar çevresinde fibröz doku oluşmakta ve sonrasında kontrakte olmaktadır. Arka vitre yüzeyi ile birlikte fibrovasküler dokunun kontraksiyonu retina dekolmanına neden olmaktadır (55).

### **2.1.9. Diyabetik Retinopatinin Sınıflandırılması**

Diyabetik retinopati proliferatif olan ve olmayan olarak iki gruba ayrılır (50-52)

### **2.1.10. Ayırıcı Tanı**

Oküler iskemik sendrom, retinal ven tıkanıklıkları, hipertansif retinopati, retinal telenjiektaziler, Coats hastalığı ve orak hücreli retinopati ayırıcı tanıda göz önünde bulundurulmalıdır (49).

### **2.1.11. Diyabetik Retinopatinin Tedavisi**

#### Medikal tedavi:

Diyabetes mellitus, göz kapağından optik sinire kadar tüm oküler dokuları etkilemektedir. Diyabetes mellitus tedavisinde, ilk basamak kan şekeri düzeyi, kan basıncı ve lipid düzeylerinin sıkı kontrolünü içerir. Ayrıca medikal tedavi olarak patolojik yollara etkili birçok ajan denenmiştir. Bunlardan bazıları renin anjiotensin sistem inhibitörleri, anti agregan tedavi, protein kinaz C inhibitörleridir (56,57).

#### Lazer tedavisi:

ETRS ve DRS (Diabetic Retinopathy Study) çalışma gruplarına göre, diyabetik maküler ödem ve proliferatif diyabetik retinopati tedavisinde lazer fotokoagülasyon altın standarttır. Lazer tedavisinin amacı, yeni damar oluşumunun gerilemesi ve santral maküler kalınlığın azalmasını sağlamaktır (56,58).

#### İntravitreal Kortikosteroidler ve VEGF inhibitörleri

Kortikosteroidlerin, antiinflamatuvar, antiproliferatif ve antianjiogenetik özellikleri bulunmaktadır. İntravitreal triamsinolon, kristal yapıda, sentetik ve kortizolden 5 kat daha etkili bir glukokortikoiddir. Diyabetik retinopatinin inflamatuvar



komponenti açısından DMÖ ve PDR tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Etkilerinin geçici olması, katarakt, glokom ve infeksiyon bu uygulamanın olumsuz yönleridir (59,60).

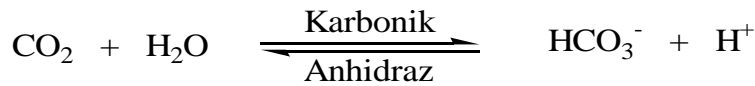
VEGF (Vasküler Endotelyal Growth Faktör), diyabetik maküler ödemde artış göstermektedir. Diyabetik maküler ödemi olan gözler, diyabet olmayan gözlerle kıyaslandığında VEGF'in anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur. VEGF artmış, retinal permabilitede majör rol oynayan mediyatördür. VEGF düzeyini baskılayan çeşitli ilaçlar günümüzde diyabetik retinopati tedavisinde kullanılmaktadır. Bunlar bevacizumab, ranibizumab ve pegaptanibtir (60,61).

#### Cerrahi Tedavi:

Diyabetik retinopatide vitreus hemorajisi, premaküler hemoraji, vitreomaküler yüzey hastalıkları, traksiyonel ± yırtıklı retina dekolmanı başlıca cerrahi endikasyonları oluştururlar (62).

## **2.2. KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ**

Karbonik Anhidrazlar (KA), mikroorganizmalardan omurgalı canlılara kadar dağılım gösteren, aktif bölgelerinde  $Zn^{+2}$  iyonu bulunduran, esas olarak karbondioksidin hidrasyonunu katalizleyen enzim grubudur.



Bu reaksiyon ve ürünleri ile metabolizmada,  $CO_2$ 'nin taşınması, asit-baz dengesinin sağlanması, üre döngüsü, elektrolit sekresyonu ve glukoneogenez gibi metabolik yol ve yollar için öncül maddelerin temini sağlanmaktadır (63-65). Bir canlı türünde farklı dokularda olup farklı kimyasal yapısı olmasına rağmen aynı reaksiyonu katalizleyen enzimlere izoenzim adı verilmektedir. İzoenzimlerin en önemli özellikleri farklı aminoasit sayıları içermeleri ve dizilim sıralarının farklılık göstermesidir. Karbonik anhidraz da bir izoenzimdir İnsanlarda farklı yerleşimli 15 farklı KA izoenzimi tespit edilmiştir. Günümüze kadar eritrositte (KA-I ve KA-II), iskelet kasında (KA-III), insan böbreğinde (KA-IV), mitokondride (KA-V), tükürük bezinde (KA-VI) ve sitozolde (KA-VII) izoenzimleri tespit edilmiştir. (66).

### **2.2.1 Karbonik Anhidraz I İzoenzimi (KA-I)**

Eritrositlerde en sık bulunan protein hemoglobindir. İkinci sıklıkta ise KA-I bulunmaktadır. KA-II ile karşılaştırıldığında insan eritrositlerinde 6 kat fazla bulunmasına rağmen aktivitesi KA-II'nin % 15'i kadardır. KA-I eritrosit dışında kalın

bağırsak epitelyumu, kornea epiteli, lenste, ter bezlerinde ve yağ dokusunda bulunmaktadır. KA-I izoenzimlerinin fiyolojik önemi ortaya konulamamıştır (68).

### 2.2.2 Karbonik Anhidraz II İzoenzimi (KA-II)

KA-II, hemen hemen her doku veya organın sitozolünde yerleşim gösteren ve geniş dağılımlı, yüksek aktiviteli bir izoenzimdir. KA-II, kemikte osteoklastlarda, beyinde oligodendrositler ve epitelyumunda, gözde lens ve müller hücrelerinde, karaciğerde, böbrekte, asiner hücrelerde, pankreatik kanal hücrelerinde, gastrik parietal hücrelerde, uterusun endometriumunda, endotel hücrelerinde, spermatozoada, eritrositlerde ve trombositlerde fonksiyon görmektedir (63-69). Farklı hücre tiplerinde bulunan KA-II'nin fiziksel rolü dönüşümlüdür

**Tablo 1:** Karbonik anhidraz izoenzimlerinin, hidrataz aktiviteleri ve hücre içi yerleşimleri (67)

İzoenzim	Katalitik aktivite (hidrataz)	Hücre içi yerleşim
KA-I	Düşük	Sitozol
KA-II	Yüksek	Sitozol
KA-III	Çok düşük	Sitozol
KA-IV	Yüksek	Plazma membranı
KA-V	Orta dereceli/ yüksek	Mitokondri
KA-VI	Orta dereceli	Tükrük içinde
KA-VII	Yüksek	Sitozol
KA-VIII	Yok	Sitozol
KA-IX	Yüksek	Plazma membranı
KA-X	Yok	Sitozol
KA-XI	Yok	Sitozol
KA-XII	Düşük	Plazma membranı
KA-XIII	Düşük	Sitozol
KA-XIV	Yüksek	Plazma membranı

**Tablo 2:** Karbonik anhidraz II enziminin memelilerde doku dağılımı ve görevleri

Doku dağılımı	Görev
GİS Epiteli	Hidrojen salgısı bikarbonat salgısı
Eritrositler- Akciğer	Gaz değişimi

Beyin	BOS salgısı
Böbrek	İdrar asidifikasyonu
Testis	Sperm hareketliliği
Göz	Aköz hümör üretimi
Osteoklast hücreleri	Kemik yıkımı

Yüksek göz içi basıncı ile seyreden glokom hastalığında KA-II'i, aköz hümörün salgılanmasında uyarıcı görev üstlenir. Karbondioksit değişiminin olduğu böbrekte, eritrositte, karaciğerde ve proksimal tübüllerde KA-II'nin yardımcı rolü vardır (70). Enzim gözde, pigmente ve nonpigmente siliyer epitelin hücre membranında bulunmaktadır. Aköz yapımında enzimin etkisi, bikarbonat iyonlarının aktif transportla siliyer epitelyum membranını geçip ortaya çıkan osmotik basınç farkı ile suyun pasif olarak aköz oluşuma katılmasını sağlamaktır. Bu enzimin inhibisyonu, aköz yapımını %50 veya daha fazla azalttığı için göz içi basıncını düşürmektedir. Aköz dışı akımı ile episkleral venöz basınç enzim inhibisyonundan ya etkilenir ya da hiç etkilenmez. Karbonik anhidrazın, göz içi basıncını düşürmesi için enzimin daima %100'ünün inhibe edilmesi gerekmektedir. Bundan dolayı topikal karbonik anhidraz inhibitörleri hümör aköz yapımını azalttığından dolayı göz içi basıncını düşürmektedirler. Total vücut karbonik anhidrazını etkilemediğinde sistemik etki çok azdır(71,72).

### 2.2.3 Otoimmünite

İmmün sistemin temel görevi, bünyenin kendisine yabancı antijenleri tanıma ve onlara karşı immün yanıt göstermesidir. Denetiminden sorumlu olan yapılar B ve T tipi lenfositler ile makrofajlardır. Canlılar normalde kendi doku antijenlerine karşı immün cevap oluşturmamaktadır. Buna karşın bazı patolojik süreçlere bağlı olarak hücre reseptörlerinin bozulması ile ya da immün cevap ürünlerinin farklı aktivite göstermesi ile organizmada yeniden şekillenen doku antijenlerine karşı immün cevap oluşmaktadır.

Organizmanın kendi doku antijenlerine karşı immün yanıt oluşturmaya otoimmünite denir. Patogenezinde otoimmün sistemin rol oynadığı hastalıklar, otoimmün hastalık olarak adlandırılmaktadır. Kesin nedeni net olarak bilinmeyen bu tür hastalıkların tanısında organizmanın kendi dokularına karşı oluşturduğu oto-antikordardan yararlanılmaktadır (73).

Toplumda otoimmün hastalıkların oranı %1-2 olarak bildirilmiştir. Hastalıklara özgü ölçülebilen antikor seviyeleri ile hastalıkların şiddeti belirlenebilir ve tedaviye yanıtı izlenebilir (74).

#### **2.2.4 Karbonik anhidraz I-II enzimlerinin otoimmünite ile ilişkisi**

Sjögren sendromu, idiopatik kronik pankreatit, primer safra sirozu, primer sklerozis, kuru gland sendromu veya otoimmün ekzokrinopati adı verilen hastalıklarda duktal epitel hücrelerinde eksprese edilen bir antijene karşı vücudun oluşturduğu otoimmün bir reaksiyon olabileceği ortaya konulmuştur (75,76).

Inagaki ve arkadaşlarının(77) 1991 yılında yaptığı çalışmada hem sistemik lupus eritamatozus hem de Sjögren Sendrom'lu hastaların serumlarında KA-II otoantikorlarının varlığı bildirilmiştir.

Nishimori ve arkadaşlarının(78) 1993 yılında. yaptığı çalışmada, Sjögren Sendrom'lu hastalarda pankreas, tükürük bezi, böbrek ve özefagus gibi ekzokrin organların incelemelerinde, KA-II'ye bağlanan monoklonal bir antikorun varlığını gösterilmiştir. 1995 yılında ise Ueno ve arkadaşlarının(79) yaptığı çalışmada, KA-II immünizasyonu yoluyla immün aracılıklı kolangitis tablosu oluşturulmuştur.

Günümüze kadar yapılan bir takım çalışmalarda, polimiyosit, sistemik skleroz, endometriosis, otoimmün kolonjitis, kronik viral hepatit, diabet gibi çeşitli hastalıklarda KA otoantikorları tespit edilmiştir (80,81).Otoimmün pankreatit, kronik pankreatit ve Sjögren sendromu gibi hastaların serumlarında da KA-I'e karşı gelişen otoantikorlar bulunmuştur (80,82,83).

### 3.MATERYAL VE METOD

Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda, Eylül 2011–Mart 2013 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Çalışma için Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul (2011/131) onayı alındı. Çalışmaya dahil edilen tüm olgulardan çalışma hakkında bilgilendirilmiş onam alındı.

Çalışmaya yaşları 13-58 arasında değişen 37 Tip-I DM'li hasta ve 47 sağlıklı kontrol grubu çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya alınan olguların bir kısmı retina biriminde takibi olanlardan bir kısmı da göz polikliniğine başvuran ve ya konsülte edilen Tip-I DM'li hastalardan seçildi. Hastaların daha sonraki muayene ve tedavi şemaları retina birimindeki kontrolleri esnasında belirlendi. Hastaların ilk başvuruları esnasında tam göz muayeneleri yapıldı. Diyabetin başlangıç yaşı ve süresi, hipertansiyon ve diğer sistemik hastalıkların varlığı, kullanılan ilaçları ve DR varsa yapılan oftalmik müdahalelerini içeren detaylı bir anamnez alındı. Her hastanın her iki gözüne ait görme keskinlikleri altı metre mesafeden Snellen eşeli okutturularak tashihli ve tashihsiz bir biçimde ayrı ayrı kaydedildi. Daha sonra hastaların air puff-tonometre (Canon Full Auto tonometer TX-F, U.S.A) cihazı ile göz içi basınçları ölçüldü. Biyomikroskop ile ön segment muayeneleri yapıldıktan sonra hastaların her iki gözüne %1'lik tropikamid (Tropamid Forte; Bilim İlaç, İstanbul) ve %2,5'lük fenilefrin HCl (Mydrin; Alcon, Teksas, ABD) damlaları iki kez damlatıldı. Pupil dilatasyonu sonrası fundus fotoğrafları çekildi (Canon CF-60 UVİ Fundus Camera; Canon Inc; Tokyo, Japonya) ve maküler ödem tanısı için gerekli olgulara optik kohorens tomografi (Optuvue RTVue-OCT, USA) cihazı ile maküler çekimler yapıldı.

#### **Çalışmanın Katılım Şartları ve Hazırlık Aşaması**

Çalışmaya, DR'si olan ve DR'si olmayan 60 yaş altı Tip-I DM'li hastalar alındı. Hastaların sistemik hastalık açısından detaylı anemnezleri alındı. Sjögren sendromu, otoimmün hepatit, primer biliyer siroz ve Graves gibi otoimmün hastalığı olanlar, ayrıca üveiti, glokomu olan hastalar da çalışmaya dahil edilmedi. Hastalardan tek sefer venöz kan alınıp aynı seanstaki göz muayene bulguları değerlendirildi. Tüm gözlere fundus

kamera ile fundus fotoğrafı ve gerekli görülen olgularda, maküler ödemin tespiti için, optik kohorens tomografi çekildi. Hastaların DR derecesi ETDRS'e göre belirlendi.

Tip-I DM'li hastalar yapılan muayeneler sonrasında DR'nin olup olmamasına göre iki gruba ayrıldı. Kontrol grubu olarak yaş grubu 60 yaşından küçük sağlıklı olgular seçildi

### **Hasta numunelerinin toplanması ve analiz edilmesi**

Hastalar yapılan ilk muayenelerinde DR açısından değerlendirildi. Gönüllü hastalardan yaklaşık 10 ml olmak üzere venöz kan alınarak biyokimya tüpüne konuldu. Alınan kanlar 5 dakika bekletildikten sonra santrifüj edilerek -80°C'de saklandı.

Tüm kan örnekleri aynı zaman dilimi içinde Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyokimya Ana Bilim Dalı tarafından analiz edilerek KA-I ve KA-II otoantikor düzeyleri ölçüldü.

### **Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler**

Bu çalışmada kullanılan cihaz, laboratuvar alet ve malzemelerin bazıları Tablo 4' de belirtilmiştir.

**Tablo 3:** Çalışmadaki biyokimyasal analizlerde kullanılan cihaz ve sarf malzemelerinin listesi

<b>Kullanılan Cihaz ve Malzemeler</b>	<b>Marka / Model</b>
Çalkalayıcı	Nüve, SL 350
Derin dondurucu	Vestel, Arçelik, Bosch
ELISA okuyucusu	Spektraflour plus, TECAN
ELISA pleyti	Coostar, yüksek bağlama kapasiteli
ELISA yıkayıcısı	Diagnostics Pasteur LP 35
Etüv	Gallenkamp
Hassas analitik terazi	Oertling NA 164
Manyetik karıştırıcı	Ikamag RH
Otomatik pipet, 0.5-10 µL	Biohit, Proline
Otomatik pipet, 10-100 µL	Socorex
Otomatik pipet, 50-200 µL	Biohit, Proline
Otomatik pipet, 100-1000 µL	Transferpette
Otomatik pipet, 0.5-10 µL	Biohit, Proline
pH-metre	Hanna Instruments, HI 9321

Santrifüj	Heraeus, Labofuge 200
Soğutucu	Philco FRT 152 D
Spektrofotometre	Beckman Coulter DU530, UV /VIS
Vorteks karıştırıcı	Nüve, NM 110
Disodyummonohidrojenfosfatheptahidrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	Merck, A547474
Asetazolamid	Sigma, A6011
Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck, % 30, d=1.11 (1.08597)
Süt tozu	Pınar
Sodyum bikarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck, > % 99.5 (6329)
Sodyum karbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Sigma, lot 2029A
4-nitrofenilasetat	Sigma, lot 023K2604
Tris(hidroksimetilaminometan)	Merck, K3528987
Tween-20	Sigma, %10, P8942
Horseradish peroksidaz takılı tavşan anti-human Ig G antikoru	Sigma, A-8792, Lot 103K4848
Sitrik asit (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> .H <sub>2</sub> O)	Sigma, C-1909, Lot 47H0808
<i>o</i> -fenilen diamin tabletleri	Sigma, P-1063, Lot 092K8205
Sülfürik asit (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Carlo-Erba ,%96, (d=1.84 g/ml) no: 306657
Sodyum dihidrojen fosfat -dihidrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O.)	Merck, (6345)
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck, > % 99 (6462)
Hidroklorik asit (HCl)	Carlo Erba, % 37, d=1.186 (7647-01-0)
Potasyum dihidrojen fosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, 646 A-153371
Potasyum klorür (KCl)	Merck, %99-100.5 (711 TA299855)
Sodyum klorür (NaCl)	Merck, % 99.5-100.5 (1.06400.1000)
Disodyumhidrojenfosfat-heptahidrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	Merck, A547474
İnsan karbonik anhidraz I	Sigma, 125 K 6005
İnsan karbonik Anhidraz II	Sigma, 084 K 6004

## **ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)**

Çalışma gruplarındaki bireylerin KA-I ve KA-II otoantikör seviyelerini belirlemek için Hosoda ve arkadaşları tarafından geliştirilen ELISA yönteminde küçük değişiklikler yapılarak kullanıldı (84). Her bir numune için ölçümler iki kez tekrarlandı.

### **ELISA ile numunelerin ölçülmesi**

1. pH'sı 9,6 olan kaplama tamponunda seyreltilen ve konsantrasyonu 10 µg/mL olarak hazırlanan KA-I veya KA-II'den 50 µL ile ELISA pleytindeki her bir mikrotiter kuyucuk kaplandı ve 18 saat +4°C' da inkübasyona bırakıldı (Kaplama yapılırken her serum örneği için 4 kuyucuk ayrılır ve bu kuyucukların ikisi KA-I veya KA-II ile kaplanır, ikisi kaplanmaz. Kaplı olan kuyucukların absorbans değerlerinden kaplanmamış olan kuyucukların absorbans değerleri çıkartılarak sonuçlar değerlendirilir).

2. Pleyt PBS tamponu (birinci yıkama çözeltisi) ile 5' er dakika arayla ve bu aralarda pleytler çalkalayıcıda bekletilerek üç kez yıkandı. Yıkama işlemi için, önce ELISA yıkayıcısında bir kez yıkanan pleyte sekizli pipetle 200 µL yıkama tamponu pipetlendi ve çalkalayıcıda 5 dakika çalkalandıktan sonra yeniden ELISA yıkayıcısında yıkanması sağlandı. Bu işlem üç kez tekrarlandı.

3. Yıkama işleminin tamamlanmasıyla pleytte her bir kuyucuğa 200 µL bloklama tamponu ilave edildi ve oda sıcaklığında iki saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.

4. İki saat inkübasyon sonunda bloklamanın sona erdiği pleyt tween-20 içeren PBS tamponu (ikinci yıkama çözeltisi) ile aynen ikinci basamakta anlatıldığı gibi üç kez yıkandı.

5. %1 süt tozu içeren PBS ile hazırlanan seyreltme tamponunda 1/200 oranında seyreltilen hasta ve kontrol serumlarından 100 µL KA-I veya KA-II kaplanmamış iki kuyucuğa ve KA-I veya KA-II kaplanmış iki kuyucuğa ayrı ayrı pipetlendi ve iki saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda bekletildi.

6. İnkübasyonun ardından pleyt tween-20 içeren PBS tamponu (ikinci yıkama çözeltisi) ile ikinci basamakta izah edildiği gibi 3 kez yıkandı.

7. %1 süttözu ihtiva eden seyreltme tamponuyla 1/200 oranında seyreltilmiş antikör (horseradish peroksidaz takılı tavşan anti-human IgG antikoru) çözeltisinden kuyucuklara 100 µL ilave edildi ve oda sıcaklığında bir saat çalkalayıcıda bekletildi.



8. Tween-20 içeren PBS tamponu (ikinci yıkama çözeltisi) ile pleyt ikinci basamakta izah edildiği gibi tekrar üç kez yıkandı.

9. 100 µL substrat çözeltisi ilave edilen pleyt 25 dakika süreyle karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletildi.

10. 100 µL 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bütün kuyucuklara pipetlenerek reaksiyonun durdurulması sağlandı ve ELISA okuyucusunda 485 nm'de absorbanlar okundu.

KA kaplanmış kuyucuklardan okunan absorbanların ortalamasından KA kaplanmamış kuyucukların ortalaması çıkarılarak sonuçlar elde edildi. Bu şekilde, serumlardaki KA otoantikör miktarları 485 nm'deki absorban artışı olarak belirlenmiş oldu.

### **Kullanılan İstatistiksel Yöntemler**

Tüm hastalardan ve kontrollerden elde edilen veriler SPSS 13.0.1 (SPSS, Chicago, IL; lisans no:9069728, KTU Trabzon) bilgisayar paket programında değerlendirildi. Ölçümsel veriler ortalama  $\pm$  standart deviasyon olarak sunuldu ve bu verilerin normal dağılıma uygunluğu tek örnekli Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Ölçümsel verilerin karşılaştırılmasında student t testi niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ki kare testi kullanıldı. Değişkenlerin birbirleriyle olan ilişkilerinin incelenmesinde pearson korelasyon testi kullanıldı. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi  $p<0,05$  olarak belirlendi. Diyabetik retinopati üzerine etkili olması muhtemel veriler lojistik regresyon analizi ile değerlendirildi. Bu amaçla olası faktörler (yaş, cinsiyet, diyabet süresi, intraoküler basınç, HbA<sub>1c</sub> düzeyi, maküler ödem karbonik anhidraz I ve II otoantikörleri) önce tek değişkenli (univariate) lojistik regresyon analizi ile değerlendirildi ve  $p<0.10$  olan parametreler çok değişkenli (multivariate) lojistik regresyon analizine dâhil edildi.

#### 4. BULGULAR

Çalışmaya, 17'si kadın (%45.9), 20'si erkek (%54.1) toplam 37 DM'li hasta ile 21'i kadın (%44.7), 26'sı erkek (%55.3) toplam 47 sağlıklı birey dahil edildi. Diyabetik hasta grubu ile kontrol grubu cinsiyet yönünden değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p=0.908$ ). Hasta grubun yaş ortalaması  $36.02\pm 9.7$  (13-58), kontrol grubunun yaş ortalaması  $33.9\pm 10.7$  (17-54) olup. yaş açısından hasta grubu ile aralarında istatistiksel fark bulunmadı ( $p=0.363$ ). Alt gruplara bakıldığında DR'si olan 17 hastanın (%45.9) yaş ortalaması  $38.82\pm 8.8$  (24-58), DR'si olmayan 20 hastanın yaş ortalaması  $29.75\pm 10.7$  (13-54) olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı farkın bulunduğu görüldü ( $p=0.009$ ).

Diyabet süresi DR'si olan grupta ortalama  $18.06\pm 7.8$  (6-37) yıl, DR'si olmayan grupta ise  $9.23\pm 8.6$  (1-34) olup. aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılığın olduğu görüldü ( $p=0,003$ ). Diyabetik retinopatisi olan grupta ortalama göz içi basıncı  $15.1\pm 3.5$  (9-20.7) mmHg iken DR'si olmayan grupta ise ortalama  $15.2\pm 2$  (11-19.5) mmHg olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p=0.980$ ). Her iki alt grup HbA1c açısından karşılaştırıldığında DR'si olmayan grupta ortalama  $8.8\pm 2$  (7-15) DR'si olan grupta ise HbA1c'i  $9.4\pm 2.3$  (6-14) olarak bulundu ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0,387$ ).

Diyabetik hastaların ortalama KA-I otoantikor düzeyleri  $0.1297\pm 0.0604$  (0.0258-0.3761) ABSU, ortalama KA-II otoantikor düzeyi  $0.1999\pm 0.1605$  (0.0260-0.7542) ABSU idi. Kontrol grubunun ortalama KA-I otoantikor düzeyi  $0.1479\pm 0.0956$  (0.0209-0.4827) ABSU ve ortalama KA-II otoantikor düzeyi  $0.1419\pm 0.0956$  (0.0014-0.4402) ABSU olarak bulundu. Diyabetik hasta grubu ile kontrol grubu KA-I ve KA-II yönünden sırasıyla kıyaslandığında istastiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla  $p=0.264$ ,  $p=0.057$ ). Alt gruplardan DR'si olanlarda KA-I otoantikor düzeyi  $0.1447\pm 0.07152$  (0.0396-0.3761) ABSU, KA-II otoantikor düzeyi ise  $0.2529\pm 0.1741$  (0.0372-0.7542) ABSU olarak bulundu. Diyabetik retinopatisi olmayan grupta KA-I otoantikor düzeyi  $0.1169\pm 0.04728$  (0.0258-0.2037) ABSU, KA-II otoantikor düzeyi ise  $0.1550\pm 0.1365$  (0.0260-0.5408) ABSU olarak bulundu. Diyabetik retinopatisi olan ve

DR'si olmayan alt gruplar KA-I ve KA-II otoantikorları açısından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, DR'si olan grupta KA-I otoantikor düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farkın olmadığı ( $p=0.890$ ) ancak KA-II otoantikor düzeyi göz önüne alındığında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu görüldü ( $p=0.002$ ). Diyabetik retinopatisi olmayan grup KA-I ve KA-II otoantikor yönünden kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her iki otoantikor düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmadığı görüldü (sırasıyla  $p=0.105$ ,  $p=0.722$ ).

Diyabeti olan 37 hastanın, 8'inde (%21.6) OCT'de MÖ tespit edildi. Maküler ödemi bulunan bu 8 hasta ile MÖ'sü bulunmayan 29 DM'li hasta (%78.4) KA-I ve KA-II otoantikor düzeyleri yönünden kıyaslandığında MÖ'sü olan DM'li hastalarda KA-II otoantikor düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p=0.018$ ). KA-I yönünden anlamlı fark yoktu ( $p=0.999$ ).

Diyabetli hastalarda HbA1c ile KA-I otoantikor arasındaki ilişki incelendiğinde her iki parametre arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilemedi ( $r=0.12$ ,  $p=0.445$ ). Aynı grupta, HbA1c ile KA-II otoantikor arasındaki korelasyon analizlerinde ise pozitif yönde istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edildi ( $r=0.36$ ,  $p=0.027$ ). Diyabetik retinopatisi olan 17 hastada HbA1c ile KA-I otoantikor değerleri arasında anlamlı korelasyon gözlenmezken ( $r=0.14$ ,  $p=0.578$ ). HbA1c ile KA-II otoantikorları arasında anlamlı korelasyon tespit edildi. ( $r=0.54$ ,  $p=0.024$ ). Diyabetik retinopatisi olmayan grupta HbA1c ile sırasıyla KA-I ve KA-II otoantikorları arasında anlamlı korelasyon bulunmadı ( $r=0.033$ ,  $p=0.890$ ;  $r=0.086$ ,  $p=0.72$ ).

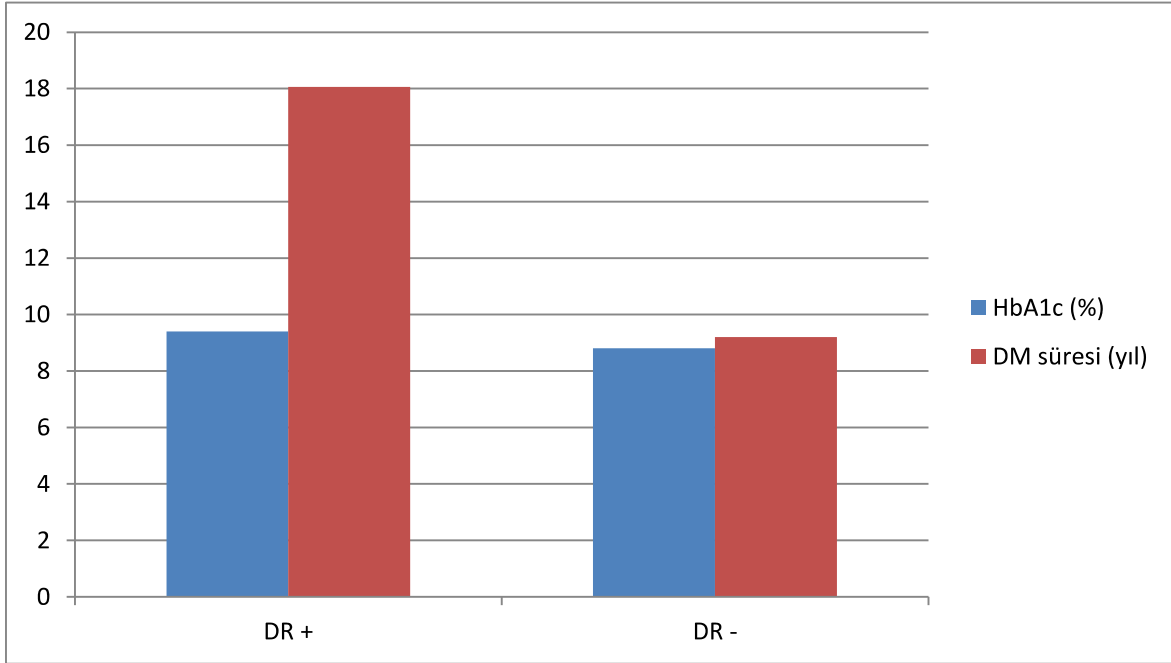
Diyabetli hasta grubunda KA-I ve KA-II otoantikorlarının kendi içinde korelasyonuna bakıldığında anlamlı bir ilişki tespit edilmedi ( $r=0.14$ ,  $p=0.386$ ). Diyabetik retinopatisi olan alt grup kendi içerisinde KA-I ve KA-II otoantikor düzeylerinin korelasyonu açısından kıyaslandığında yine anlamlı bir korelasyon izlenmedi ( $r=0.04$ ,  $p=0.870$ ). Diyabetik retinopatisi olmayan grup kendi içerisinde KA-I ve KA-II otoantikorları açısından incelendiğinde iki değişken arasında yine anlamlı bir korelasyonun bulunmadığı görüldü ( $r=0.14$ ,  $p=0.545$ ). Sağlık kontrol grubu kendi içinde değerlendirildiğinde KA-I ve KA-II otoantikor düzeylerinde yine anlamlı bir korelasyonun bulunmadığı görüldü ( $r=0.01$ ,  $p=0.913$ ).

Diyabetik hasta grubunda yaş faktörünün KA-I ve KA-II otoantikor düzeyleri üzerine etkisine bakıldığında yaş ile her iki otoantikor düzeyleri arasında anlamlı korelasyon tespit edilmedi (sırasıyla  $r=0.07$ ,  $p=0.634$ ;  $r=0.08$ ,  $p=0.611$ ). Benzer şekilde

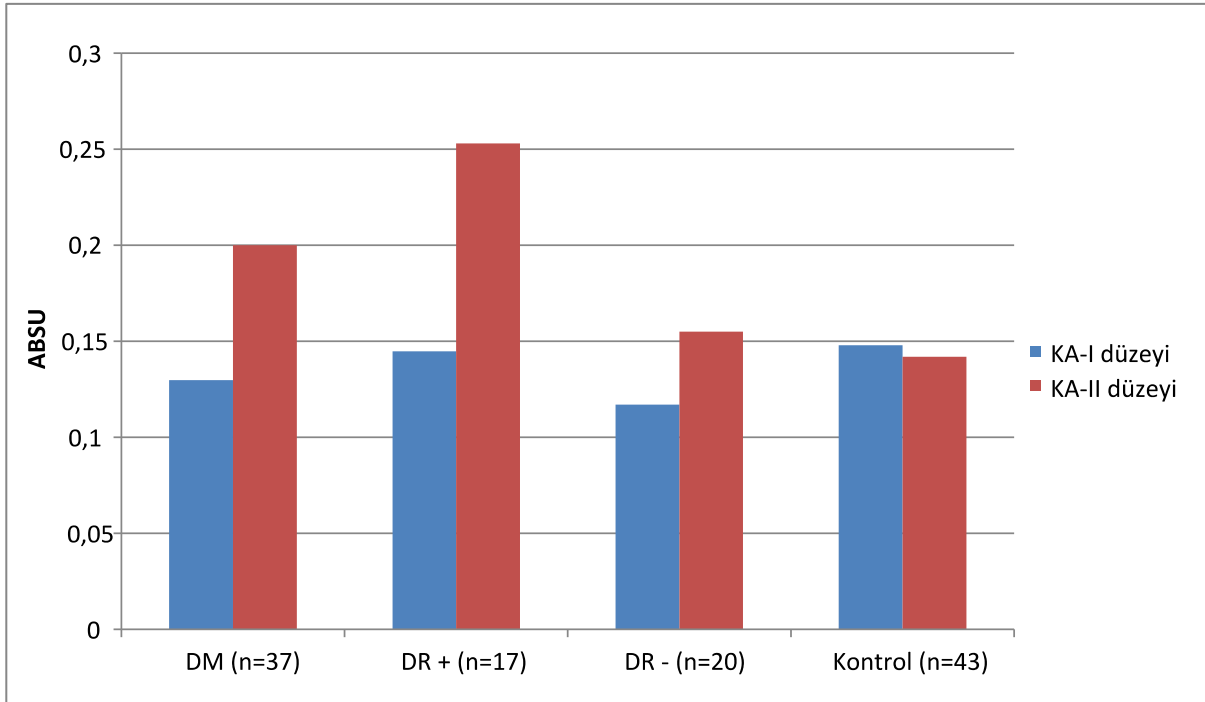
sağlıklı kontrol grubunda, KA-I ve KA-II otoantikör düzeyleri ile yaşın korelasyonu incelendiğinde anlamlı bir ilişkinin olmadığı izlendi (sırasıyla  $r=0.15$ ,  $p=0.33$ ;  $r=-0.02$ ,  $p=0.89$ ).

Diyabetik retinopati üzerine yaş, cinsiyet, diyabet süresi, intraoküler basınç, HbA1c düzeyi, maküler ödem ve karbonik anhidraz I ve II otoantikörlerinin etkisini önce tek değişkenli (univariate) lojistik regresyon analizine tabi tutulup anlamlı olan faktörlere çok değişkenli (multivariate) lojistik regresyon analizi yapıldığında faktörler ile diyabetik retinopati arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmedi. (Tablo:4)

**Grafik 1:** Diyabetik retinopatisi olan grup ile diyabetik retinopatisi olmayan grupların diyabet süresi ve HbA1c düzeyleri açısından karşılaştırılması



**Grafik 2:** Diyabetik retinopatili hastalar ile sağlıklı kontrol grubunun ortalama karbonik anhidraz-I ve II otoantikor düzeylerinin karşılaştırılması



**Tablo:4** Diyabetik retinopati ile yaş, diyabet süresi ve karbonik anhidraz II otoantikor düzeyleri arasındaki (multivariate) lojistik regresyon analiz tablosu

	OR	%95 CI	P değeri
Karbonik Anhidraz II otoantikoru	73,16755	0,331427-16152,85	0,119016
Diyabet süresi	1,104242	0,977139-1,247879	0,111992
Yaş	1,054237	0,958281-1,159801	0,278031

## 5. TARTIŞMA

Tip-I diyabetes mellitus, dünya genelinde milyonlarca insanı etkileyen yaygın görülen bir otoimmün hastalıktır. Hastalığın özellikle genç nüfustaki insidansı son yıllarda giderek artış sergilememektedir. Tip-I diyabetes mellitusun etiyopatogezi günümüzde hala daha tam olarak anlaşılammıştır. Multifaktöriyel etmenleri içeren, güçlü genetik komponenti olan pankreas beta hücrelerinin harabiyetiyle seyreden sistemik bir hastalık olduğu düşünülmektedir. Hastalıkla ilgili olarak ilk defa 1970'li yıllarda insan pankreasında ICA (Islet Cells Antibodies) adlı otoantikör tespit edilmiştir. Bunu takip eden süreçte ise GADA (Glutamic Acid Decarboxylase Antibodies), mIAA (microinsulin autoantibody) ve Anti-ZnT8 (antibodies against the zinc transporter) gibi çeşitli otoantikörlerin varlığı Tip-I DM'li hastalarda rapor edilmiştir (85). Hastalığın gelişiminde ayrıca genetik ve çevresel faktörler suçlanmaktadır. Genetik etmenlerin hastalığa olan yatkınlığın yaklaşık olarak 1/3'ünden sorumlu olduğu düşünülmektedir (16). Çevresel faktörlere bakıldığında hastalık gelişiminde tek başlarına rol oynamadığı ancak hastalık gelişimine katkı sağladığı gösterilmiştir. Bunlar arasında kimyasal ajanlar, virüsler ve gıdalar gibi çeşitli faktörler suçlanmıştır (15-19).

İmmün sistem, organizmayı infeksiyonlarla beraber dış etmenlere karşı korumada özelleşmiş hücreler ihtiva eden bir yapıdır. Normal şartlarda immün sistem kendi antijenlerine karşı yanıt oluşturmamakta ve bu durum antijenlere karşı seçici cevapsızlık (self-tolerans) olarak tanımlanmaktadır. Bu tolerans sistemi bozulduğunda immün sistem yabancı ve otoantijen ayrımı yapamamakta ve sonuçta otoimmün hastalıklar ortaya çıkmaktadır (86,87).

Karbonik anhidraz izoenzimi safra kanalları, pankreatik kanallar, renal tubüller ve tükürük bezi kanallarının epitel hücrelerinde bol miktarda sentezlenmektedir. Bu yüzden KA-I izoenzimi, çeşitli ekzokrin bezlerin epitel hücrelerinden salgılanan yaygın bir hedef antijendir. Bu nedenle otoimmün ekzokrinopati ve otoimmün epitelitis olarak adlandırılan patolojik süreçte rol oynadığı düşünülmektedir (88).

Gözün farklı bölümlerinde bulunan karbonik anhidraz izoenzimleri, buldukları yerleşim yerlerine göre farklı görevler üstlenmektedir (89). KA-I

enziminin korneal endotelyal hücrelerde, lens hücrelerinde, kapiller endotelyal hücrelerde, siliyer cismin stromasında ve koroidde bulunduğu gösterilmiştir (90). KA-II izoenziminin ise gözde siliyer cismin epitelyum hücrelerinde, retinanın müller hücrelerinde, retina pigment epiteli, koryokapillaris, parafoveal konlarda bulunduğu ortaya koyulmuştur (91-97). Özellikle ışığa maruz kalan kon hücrelerinde pH'da düşme meydana gelmektedir. Buna cevap olarak karbonik anhidraz enzimi bikarbonat, klor değişimi yapmaktadır. Bu özellik rod hücrelerinde bulunmamaktadır (98).

Nishimori ve ark.(99) tarafından yapılan bir çalışmada birçok ekzokrin organda en yaygın hedef antijenlerden birisi, duktal epitelde ve salgı bezlerinde yoğun olarak bulunan KA-II izoenzimi olarak rapor edilmiştir. Bu nedenle Sjögren sendromu ve iditopatik otoimmün pankreatit gibi otoimmün ekzokrinopatilerin patogeneğinde KA-II'ye karşı gelişen otoantikörlerin rol oynayabileceği ifade edilmiştir (99).

Sistemik lupus eritamatozus, poliyomyozis, Sjögren sendromu, endometriozis, idiyopatik kronik pankreatit, primer biliyer siroz, tubulointerstisiyel nefrit, otoimmün kolanjitis gibi birçok otoimmün hastalıkta da KA-I ve KA-II otoantikörlerinin varlığı tespit edilmiştir (100-102).

Konuyla ilgili yapılan bir çalışmada, Alver ve ark.(103) Graves ve Hashimoto tiroiditli olgularda sağlıklı kontrol grubu ile kıyaslamalı bir şekilde KA-I ve KA-II otoantikör düzeylerini incelemiştir. Bu çalışmanın sonucunda Graves hastalarında, KA-II otoantikör düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmasına rağmen Hashimoto hastalığı olanlar da ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik izlenmemiştir. Aynı çalışmada KA-I otoantikör düzeyinin ise Graves, Hashimoto ve kontrol grubunda istatistiksel olarak benzer düzeyde bulunduğu görülmüştür (103). Bahsedilen çalışmanın sonucunda KA-II otoantikörlerinin Graves hastalığının patogeneğinde rol oynayabileceği düşünülmüştür.

Alver ve ark (104) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise romatoid artritli hastalarda artmış KA-II otoantikör düzeyleri tespit edilmiştir.

Bir başka otoimmün hastalık olan Tip-I DM etiyopatogeneğinde de KA-II ye karşı gelişen otoantikörlerin rol oynayabileceği Taniguchi ve ark.(101,105) tarafından yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Bu çalışmalarda Tip-I ve Tip-II diyabetik olgular çalışmaya dahil edilmiş ve Tip-I diyabetik olgulardaki KA-II otoantikör düzeylerinin Tip-II diyabetik olgulara göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

Sadece Tip-I DM'li olguları dahil ettiğimiz çalışmamızda KA-II otoantikörlerine ek olarak KA-I otoantikörleri de sağlıklı kontrol grubu ile kıyas edilmiştir. çalışmamızda Taniguchi ve ark.(101,105) tarafından yapılan çalışmalardan farklı olarak gerek KA-I gerekse KA-II otoantikörlerinin Tip-I DM'li olgularda istatistiksel olarak anlamlı farklılık sergilemediği görülmüştür. Çalışmamıza benzer şekilde Di Cesare ve ark.(107) tarafından yapılan bir çalışmada da Tip-I DM'li olgulardaki KA-II otoantikör düzeylerinin sağlıklı kontrol grubu ile anlamlı düzeyde farklılık göstermediği tespit edilmiştir.

KA-II izoenzimine karşı gelişen otoantikörlerin enzim aktivitesini azaltarak intraselüler pH'yı düşüreceği ve bunun sonucunda hücre içi kalsiyum birikimine rol açarak retina hücrelerinde fonksiyon bozukluğuna yol açabileceği bildirilmiştir (106). Dolayısıyla kanaatimizce KA-II karşı gelişen otoantikörler Tip-I DM'ye bağlı gelişen retinopatinin etiopatogenezinde de rol oynayabilir. Bu çalışmada da Tip-I DM'li olgulardan DR'ye sahip olanlarda KA-II otoantikör düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunması kanaatimizi desteklemektedir.

Tip-I diyabetes mellituslu olgularda diyabetik retinopati gelişimi ile KA-I ve KA-II otoantikörleri arasındaki ilişki daha önce araştırılmamıştır. Bu yönüyle literatürde bir ilk olma niteliğindeki çalışmamızda gerek Tip-I DM gelişimi gerekse de DR gelişimi ile KA-I otoantikörleri arasında anlamlı ilişki gözlenmemiştir. KA-II otoantikörlerinin ise sadece diyabetik retinopatiye sahip olan olgularda anlamlı düzeyde yüksek bulunmasına karşılık yapılan regresyon analizinde KA-I ve KA-II otoantikörlerinin diyabetik retinopati gelişimi üzerine etkisinin olmadığı görülmüştür. Çalışmamıza dahil edilen hasta sayısının az olması nedeniyle incelenen korelasyon ve regresyon analizleri etkilenmiş olabilir Dolayısıyla bu ilişkilerin daha net ortaya çıkarılması amacıyla daha geniş katılımlı ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.



## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yaptığımız bu çalışmada, Tip-I diyabetik hastalardan oluşan çalışma grubumuz ile sağlıklı kontrol grubu, karbonik anhidraz otoantikör düzeyleri açısından kıyaslanmıştır. Tip-I diyabet hastaları, kendi içerisinde diyabetik retinopatisi olan ve olmayan olarak iki alt gruba ayrılmıştır. İlk muayenede, hem hasta hem de kontrol grubundan tek sefer olmak üzere venöz kan alınıp karbonik anhidraz otoantikör düzeyleri ölçülmüştür.

Diyabetik grupta, maküler ödemi olan ve olmayan hastalar, kendi içlerinde KA-I ve KA-II otoantikör düzeyleri açısından kıyaslandığında, maküler ödem ile KA-II otoantikör düzeyleri arasında anlamlı ilişki tespit edilmiştir.

Diyabetik retinopatisi grupta, HbA1c düzeyi ile KA-II otoantikör düzeyleri arasında pozitif yönde anlamlı ilişki tespit edilmiştir.

Tip-I DM'li olgularda DR gelişimi ile KA-I ve KA-II otoantikörleri arasındaki ilişki daha önce araştırılmamıştır. Bu yönüyle literatürde bir ilk olma niteliğindeki çalışmamızda gerek Tip-I DM gelişimi gerekse de DR gelişimi ile KA-I otoantikörleri arasında anlamlı ilişki gözlenmemiştir. KA-II otoantikörlerinin ise sadece DR'ye sahip olan olgularda anlamlı düzeyde yüksek olması bize diyabetik retinopati gelişiminde etkili olduğunu düşündürmüştür ancak KA-II otoantikör düzeylerinin regresyon analizinde anlamlı bir sonuç bulamadık.

## TİP-I DİYABET HASTALARINDA SERUM KARBONİK ANHİRAZ I-II OTOANTİKOR DÜZEYLERİ İLE DİYABETİK RETİNOPATİ ARASINDAKİ İLİŞKİ

### ÖZET

**Amaç:** Tip-I Diyabet olgularında serum karbonik anhidraz I-II (KA-I ve II) otoantikor düzeyleri ile diyabetik retinopati arasındaki ilişkiyi incelemek

**Materyal ve Metod:** Çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Ana Bilim Dalı'nda, Eylül 2011- Mart 2013 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Çalışmaya, 37 Tip-I diyabet ve 47 sağlıklı kontrol grubu dahil edildi. Diyabetik grup, diyabetik retinopatisi olan (n=17) ve olmayan (n=20) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Hasta ve kontrol grubundan elde edilen serum örneklerinden, KA-I ve KA-II otoantikor düzeyleri ölçülerek istatistiksel olarak kıyas yapıldı. Ayrıca diyabetik maküler ödem ile KA-I ve KA-II otoantikoları arasındaki ilişki incelendi.

**Bulgular:** Yaş ortalaması diyabetik grupta  $36.02 \pm 9.7$  yıl, kontrol grubunda  $33.9 \pm 10.7$  idi. Diyabetik olgularla sağlıklı kontrol grubu arasında KA-I ve KA-II otoantikor düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık mevcut değildi (sırasıyla  $p=0.264$ ,  $p=0.057$ ). Diyabetik retinopatisi olan grup ile olmayan grup arasında KA-II otoantikor düzeyi açısından anlamlı bir farklılık mevcutken ( $p=0.002$ ), bu farklılık KA-I otoantikor düzeyleri için söz konusu değildi ( $p=0.890$ ). Diyabetik maküler ödem tespit edilen olgular (n=8) ile tespit edilmeyen olgular (n=37) arasında KA-II otoantikor düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık mevcutken ( $p=0.018$ ), bu farklılık KA-I otoantikor düzeyleri için söz konusu değildi ( $p=0.999$ ). Diyabetik hasta grubunda HbA1c düzeyleri ile KA II otoantikor düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki mevcutken ( $r=0.36$ ,  $p=0.027$ ), bu ilişki KA-I otoantikor düzeyleri için anlamlı değildi ( $r=0.12$ ,  $p=0.445$ ).

**Sonuç:** Diyabetik retinopati ile KA-II otoantikoru arasında anlamlı korelasyon tespit ettik. Bununla birlikte bu ilişkinin daha net ortaya koyulması için daha geniş klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Diyabetik retinopati, Karbonik anhidraz otoantikor I-II

## THE RELATIONSHIP BETWEEN SERUM CARBONIC ANHYDRASE I-II AUTOANTIBODY LEVELS AND DIABETIC RETINOPATHY IN TYPE-I DIABETES PATIENTS

### SUMMARY

**Aim:** To investigate the relationship between serum carbonic anhydrase I-II (CA-I and II) autoantibody levels and diabetic retinopathy in subjects with type-I diabetes mellitus

**Materials and Methods:** This study was performed at Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Karadeniz Technical University, Trabzon, Turkey between September 2011 and March 2013. Thirty-seven type-1 diabetic patients and a 47 healthy control group were included in to the study. The diabetic group was divided into two subgroups, with diabetic retinopathy (n=17) and without (n=20). CA-I and CA-II antibody levels in serum specimens from the all study group were measured and compared statistically. Additionally, the correlation between CA-I and CA-II autoantibody levels and the presence of diabetic macular edema was investigated.

**Results:** Mean age was  $36.02 \pm 9.7$  years in the diabetic group and  $33.9 \pm 10.7$  years in the control group. No significant difference was determined in terms of CA-I and CA-II autoantibody levels between the diabetic and the control groups ( $p=0.264$  and  $p=0.057$ , respectively). There was a significant difference in CA-II antibody levels between the diabetic retinopathy and non-retinopathy groups ( $p=0.002$ ), but no such difference in terms of CA-I autoantibody levels ( $p=0.890$ ). A statistically significant difference was found between the subjects with or with out diabetic macular edema in CA-II autoantibody ( $p=0.018$ ) but the difference was not significant in CA-I autoantibody levels ( $p=0.999$ ). There was a statistically significant positive correlation between Hb1Ac and CA-II autoantibody levels in the diabetic group ( $r=0.36$ ,  $p=0.027$ ), but the correlation with CA-I autoantibody levels was not significant ( $r=0.12$ ,  $p=0.445$ )

**Conclusion:** We have determined a significant correlation between diabetic retinopathy and CA2 autoantibody. However, in order to reveal this correlation more explicitly, broader clinical studies are needed.

**Key words:** Diabetic retinopathy, Carbonic anhydrase I-II antibodies

## KAYNAKLAR

1. Güven T: Diabetes Mellitus'lu Hastalarda Yaşam Kalitesi ve Depresyon Etkisinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul 2007, s. 3.
2. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. American Diabetes Association Diabetes Care, 34(1): 64-65, 2011.
3. Watkins PJ, Drury PL, Howell SL: Diabetes and its management. 5 th ed. Blackwell Co., 1996, p:3.
4. Prokofyeva E: Eberhart Zrenner Epidemiology of major eye diseases leading to blindness in Europe: Ophthalmic Research, 47: 171–188, 2012.
5. Salman S ve Satman İ: Diyabete özgü antikorlar ve klinik pratikte kullanımları Turk Jem. 15: 8-12, 2011.
6. Liu C, Wei Y, Wang J, Pi L, Huang J, Wang P: Carbonic anhydrases III and IV autoantibodies in rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus diabetes, hypertensive renal disease, and heart failure. Clinical and Developmental Immunology, Article ID 354594, 2012.
7. Satman İ, Yılmaz C, İmamoğlu Ş: Diabetes mellitus ve komplikasyonlarının tanı, tedavi ve izlem klavuzu. İstanbul, 2009, s. 15.
8. Garber AJ: Diabetes mellitus internal medicine. Stein JH ed. St Lois, Mosby, 1994, p: 1391-92.
9. Centers for disease control and prevention. National Diabetes Fact Sheet UnitedStates, 2003;.(www.cdc.gov).
10. Wild S, Roglic G, Green A: Global prevalence of diabetes estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care, 27: 1047-1053, 2004.

11. Onat A, Yıldırım B, Ceyhan K, Keleş İ, Başar Ö, Sansoy V, Çetinkaya A, Erer B, Uysal Ö: Halkımızda diyabet ve glukoz intolerans koroner mortalite ve morbiditeye prospektif etkisi, prevalansında artma. *Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi*, 5(29): 268-273, 2001.

12. Glastras SJ, Craig ME, Verge CF, Chan AK, Cusumano JM, Donaghue KC: The role of autoimmunity at diagnosis of type 1 diabetes in the development of thyroid and celiac disease and microvascular complications. *Diabetes Care*, 28(9): 2170-5, 2005.

13. Lifshitz F: *Pediatric Endocrinology*. Fourth ed., University of Miami School of Medicine. 5, 2003, pp 611–680.

14. Pociot F, Nerup J: Genetics of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. In: Wass JAH, Shalet SM, Gale E, Amiel SA, eds. *Textbook of Endocrinology and Diabetes*. Oxford University Press., Oxford, 2002, pp 1647-54.

15. MacFarlane AJ, Scott FW: Environmental agents and type 1 diabetes. In Pickup JC, Williams G Eds, *Textbook of Diabetes*, 3rd Blackwell Publishing Co, Oxford, 2003, pp. 17.1-17.16.

16. Yoon JW, Jun HS: Viruses in the pathogenesis of type 1 diabetes. In: Pickup JC, Williams G, eds. *Textbook of Diabetes*, 3rd. Blackwell Publishing Co, Oxford, 2003: pp. 16.1-16.16.

17. Haller MJ, Atkinson MA, Schatz D: Type 1 diabetes mellitus etiology, presentation, and management. *Pediatr Clin North Am*. 52: 1553-78, 2005.

18. Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte R, Tuomilehto J: Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. *Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group*. *Diabetes Care*, 23: 1516-26, 2000.

19. Saka HN: Diabetes Mellitus. In: Günöz H, Öcal G, Yordam N, Kurtoğlu S (eds.): *Pediatric Endocrinology*. 1. Baskı. *Pediatric Endocrinology ve Oksoloji Derneği Yayınları*, Ankara, 2003, s. 415-55.

20. Alemzadeh R, Wyatt DT: Diabetes Mellitus. Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB (eds.), *Nelson Textbook of Pediatrics*. 17 edition. Elsevier Saunders, Pennsylvania, 2004, pp. 1947-72.

21. Norris AW, Wolfsdorf JI: Diabetes Mellitus. Brook GDC, Clayton PE, Brown RS, Savage MO (eds.) Clinical Pediatric Endocrinology. 5 edition. Blackwell Publishing Ltd, Massachusetts (USA), 2005. pp.436-91.
22. Fiallo-Scharer R, Eisenbarth GS: Pathophysiology of insulin-Dependent Diabetes. Pescovitz OH and Eugster EA (eds), Pediatric Endocrinology.1 edition. (USA): Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2004. pp.411-26.
23. Becker DJ: Pediatric Endocrinology. 4th Ed., New York. Marcel Decker inc, 2005,pp. 276-285.
24. Alberti KG: The clinical implications of impaired glucose tolerance. Diabet Med. 13:927-37, 1996.
25. Olefsky JM, Smith LH, Bennet JC: Diabetes Mellitus in wyngoardan JB, Cecil, Textbook of Medicine 19th ed. WB. Saunders Co, p: 1291, 1992.
26. Sperling MA: Diabetes Mellitus. Sperling MA (eds), Pediatric Endocrinology, Pennsylvania (USA), Saunders Elseiver Science, 2nd edition, 2002, pp.323-66.
27. Bhanuprakash Reddy G, Satyanarayana A, Balakrishna N, Ayyagari R, Padma M, Viswanath K, Mark Petrash J: Erythrocyte aldose reductase activity and sorbitol levels in diabetic retinopathy. Molecular Vision. 14: 593-60, 2008.
28. Ishii H, Koya D, King GL. Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complacations in diabetes. J Mol Med. 76: 21-23, 1998.
29. Ferdinando G and Michael B: Oxidative stress and diabetic complications Diabetes Research Center, Departments of Medicine/Endocrinology, Albert Einstein College of Medicine, 1300 Morris Park Avenue, Bronx, New York 10461-1602
30. Marshall S, Bacote V, Traxinger RR: Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. role of hexosamine biosynthesis in the induction of insülin resistance. J. Biol. Chem. 266: 4706-4712, 1991.
31. Dyck PJ, Kratz KM, Karnes JL, Litchy WJ, Klein R, Pach JM, Wilson DM, O'Brien PC, Melton LJ 3rd, Service FJ: The prevalance by staged severity of varioustypes of

diabetic neuropathy, retinopathy and nephropathy in a population based cohort. *Neurology*, 43(4): 817-824,1993.

32. Bayraktar Z. Diabetik retinopati epidemiyolojisi. 2.Baskı. İstanbul: Dilek Ofset, 2000. p.1-9.

33. American Diabetes Association: Economic costs of diabetes in the U.S. in 2007. *Diabetes Care*, 31: 596-615, 2008.

34. Lorenzi M and Gerhardinger C: Early cellular and microvascular changes induced by diabetes in the retina. *Diabetologia*. 44: 791–804, 2001.

35. Harhaj NS and Antonetti DA: Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol*. 36: 1206–37, 2004.

36. Gardner TW, Aiello LP, Flynn HW, Smiddy WE: Pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes and Ocular Disease. Ophthalmology*, pp. 1-17, 2000.

37. Kollias AN and Michael W: Diabetic retinopathy early diagnosis and effective treatment. *Dtsch Arztebl Int*. 107(5): 75–84, 2010.

38. Kanski JJ: Retinal Vasküler Disease. *Clinical Ophthalmology*. Fifth Ed. Butterworth- Heinemann Ltd., 2003, pp. 438-486.

39. Klein R, Klein BEK, Moss SE, Davis MD, DeMets DL: The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch Ophthalmol*. 102: 520-6, 1984.

40. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med*. 329(14): 977-86, 1993.

41. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*. 352(9131): 837-53, 1998.

42. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes. UK Prospective Diabetes Study Group. UKPDS 38. *BMJ*. 317: 703-13, 1998.

43. Parving HH: Benefits and cost of antihypertensive treatment in incipient and overt diabetic nephropathy. *J Hypertens Suppl*. 16: 99-101, 1998.

44. Emily Y. Chew MD, Michael L, Klein MD, Frederick L, Ferris MD, Nancy A, Remaley MS, Robert P, Murphy MD, Kathryn C, Byron J, Hoogwerf MD, Dayton M: Association of elevated serum lipid levels with retinal hard exudates in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*. 114: 1079-84, 1996.

45. Effect of pregnancy on microvascular complications in the diabetes control and complications trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *Diabetes Care*, 23: 1084-91, 2000.

46. Young RJ, McCulloch DK, Prescott RJ, Clarke BF: Alcohol: another risk factor for diabetic retinopathy. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 288: 1035-7, 1984.

47. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL: Glycosylated hemoglobin predicts the incidence and progression of diabetic retinopathy. *JAMA*. 260: 2864-71, 1988.

48. Rand LI, Krolewski AS, Aiello LM, Warram JH, Baker RS, Maki T: Multiple factors in the prediction of risk of proliferative diabetic retinopathy. *N Engl J Med*. 313:1433-8, 1985.

49. Esenülkü C: Diyabetik Retinopatili Hastalarda Panretinal Fotokoagülasyonun Pulsatil Oküler Kan Akıma Etkisi. Uzmanlık Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Trabzon, 2010, s7-10

50. Kanski JJ: Retinal Vasküler Disease. *Clinical Ophthalmology*. Fifth Ed. Butterworth- Heinemann Ltd., 2003, pp. 438-486.

51. Bayraktar Z: Non proliferatif Diyabetik Retinopati. *Tıbbi Retina, Türk Oftalmoloji Derneği Yayınları*, No. 10, 2009, s. 157-162.

52. Gelişken Ö ve Yalçınbayır Ö: Proliferatif Diyabetik Retinopati. *Tıbbi Retina, Türk Oftalmoloji Derneği Yayınları*, No. 10, 2009, s. 167-175.



53. Bresnick GH: Background diabetic retinopathy. *Retina*. Themosby Co., Toronto, pp. 1277-1318, 1994.
54. Çelik E: Diyabetik Retinopatili Hastalarda Klinik Anlamlı Maküla Ödemi Üzerine Etkili Risk Faktörleri. Uzmanlık Tezi, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi I. Göz Polikliniği, İstanbul 2005, s20-23.
55. Guillermo AU, Ariadna SL, Agarwal S, Agarwal A, Apple DJ, Alio JL, Buratto L, Pandey SK, Agarwal A: Diyabetik retinopati. *Retina and Vitreous, Systemic Diseases, Miscellaneous. Textbook of Ophthalmology*, 2002, pp. 2560-2580.
56. Giuliari GP: Diabetic retinopathy: Current and New Treatment Options. *Current Diabetes Reviews*, 8: 32-41 2012.
57. Kapran Z, and Acar N: Proliferatif Diyabetik Retinopati Tedavisi. *Ret-Vit*,16: 85, 2008.
58. Ockrim Z, and Yorston D: Managing diabetic retinopathy. *BMJ Rew*. 25: 341, 2010.
59. Shahsuvaryan ML: Therapeutic potential of intravitreal pharmaco -therapy in retinal vein occlusion. *Int J Ophthalmol*, 5(6): 759-770, 2012.
60. Porta M, Maldari P, Mazzaglia F: New approaches to the treatment of diabetic retinopathy. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 13: 784-790, 2011.
61. Rangasamy S, McGuire PG, Das A: Diabetic retinopathy and inflammation: Novel Therapeutic Targets. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 19(1): 52-59, 2012.
62. Ovalı T: Diyabetik Retinopatide Cerrahi Tedavi. *Ret-Vit*, 18: 71-81, 2010.
63. Sly SW and Hu YP: Human carbonic anhydrase and carbonic anhydrase deficiencies *Annual Reviews*, 64 :375-401, 1995.
64. Supuran CT and Scozzafava A: Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15: 4336-4350, 2007.

65. Pocker Y: Molecular control of carbonic anhydrase activity. ionic effectors, differential modifiers and novel inhibitors. in the carbonic anhydrase from Biochemistry and Physiology and Clinical Medicine. Botre F, Storey BT, Gros G (eds.), Wienheim, VCH Pulishers, pp 75-85, 1991.

66. Keha EE and Küfrevioglu Ö: Biyokimya, Aktif Yayınevi, 2004, s. 641-643.

67. Pastarekova S, Parkkila S, Pastorek J, Supuran TC: Carbonic anhydrases therapeutic applications and future prospects. Current State of the Art. No. 3: 199-229, 2004.

68. Careter MJ: Carbonic anhydrase isoenzymes properties distrubition and functional significore, Biological Review, 42:462-475, 1972.

69. Nogradi A: The role of carbonic anhydrase in tumors. American Journals of Pathology, 153: 1-4, 1998.

70. Epstein DL and Grant WM: Carbonic anhydrase inhibitors side effects serum chemical analysis, Arc.Ophthalmol, 85:1387, 1977.

71. Dailey RA, Brubaker RF, Bourne WM: The effects of timolol maleate and acetazolamide on the rate of aqueous formation in normal human subjects. Am J Ophthalmol, 93: 232, 1982.

72. Aykut M:Aktif Üveit Atağı Esnasında ve İyileşme Döneminde Serum Karbonik Anhidraz I-II Otoantikör Düzeyleri. Uzmanlık Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Trabzon 2011, s. 19-21.

73. Ian R, Mackay MD, Fred S, Rosen M: Autoimmun diseases. N Engl J Med. 345 (5), 2001.

74. Baskın Y, Afacan G, Erkunt S, Yiğitbaşı T: Sistemik otoimmun hastalıkların tanısında yeni bir yöntem mültipleks test sistemi ve yöntem performansları. Türk Biyokimya Dergisi, 33(1): 19-24, 2008.

75. Epstein O, Chapman RW, Lake-Bakaar G, Foo AY, Rosalki SB, Sherlock, S: The pancreas in primary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. Gastroenterology, 83: 1177, 1982.

76. Strarand V and Talal N: Advances in the diagnosis and concept of Sjögren's syndrome (autoimmune exocrinopathy). *Bull. Rheum. Dis.* 30: 1046, 1980.
77. Inagaki Y, Jinno-Yoshida Y, Ueki H: A novel autoantibody reactive with carbonic anhydrase in sera from patients systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *J Dermatol Sci.* 2: 147-154, 1991.
78. Nishimori I, Okazaki, K, Morita M, Tamura S, Yamamoto Y: Identification of autoantibodies to a pancreatic antigen in patients with idiopathic chronic pancreatitis and Sjogren's syndrome. *J. Clin. Immunol.* 13: 265, 1993.
79. Ueno Y, Ishii M, Takahashi T, Toyota T, Larusso N.F: Different susceptibility of mice to immune-mediated cholangitis induced by immunization with carbonic anhydrase II, *Lab Invest.* 78: 629-637, 1995.
80. Kino-Ohsaki J, Nishimori I, Momarita M: Serum antibodies to carbonic anhydrase I and II in patients with idiopathic chronic pancreatitis and Sjögren syndrome. *Gastroenrology*, 110: 1579-86, 1996.
81. Kiechle FL, Quattrocioni-Longe TM, Brinton DA: Carbonic anhydrase antibody in sera from patients with endometriosis. *Am J Clin Pathol.* 101: 611-615, 1994.
82. Bartolome M.J, Heras G, Lopez-Hoyos M: Low-avidity antibodies to carbonic anhydrase-I and -II in autoimmune chronic pancreatitis. *Scientific World Journal*, 112: 1560-1568, 2002.
83. Frulloni L, Bovo P, Brunelli S, Vaona B, Di Francesco V, Nishimori I, Cavallini G: Elevated serum levels of antibodies to carbonic anhydrase I and II in patients with chronic pancreatitis. *Pancreas.* 20(4): 382-388, 2000.
84. Hosoda H, Okawa-Takatsuji M, Tanaka A, Uwatoko S, Aotsuka S, Hasimoto N: Detection of autoantibody against carbonic anhydrase II in various liver diseases by enzyme-linked immunosorbent assay using appropriate conditions. *Clin Chim Acta*, 342: 71-81, 2004.
85. Zhang L, and Eisenbarth GS: Prediction and prevention of type 1 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes*, 3: 48-57, 2011.

86. Delves PJ and Roitt IM: The immune system. First of two parts. *N Eng J Med.* 343: 37-49, 2000.
87. Kamradt T and Mitchison NA: Tolerance and autoimmunity. *N Eng J Med.* 344: 655-664, 2001.
88. Nishimori I, Akisawa N, Miyaji E, Kohsaki T, Iwasaki S, Onishi S: Serum antibody to carbonic anhydrase II in patients with chronic viral hepatitis: a review of its prevalence in liver diseases. *Hepatology Research*, Vol. 30: 210-213, 2004.
89. Gregory S, Hageman O, Xin L, Abdul W, William S: Localization of carbonic anhydrase IV in a specific capillary bed of the human eye *Proc. Natl. Acad. Sci. Cell Biology USA.* Vol. 88: 2716-2720, 1991
90. Wistrand PJ, Schenholm M, Lönnerholm G: Carbonic anhydrase isoenzymes CA I and CA II in the human Eye. *Ophthalmol Vis Sci.* 27: 419-428, 1986.
91. Linser PJ, and Plunkett JA: A role for carbonic anhydrase in early eye morphogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 30(4): 783-785, 1989.
92. Linser P, Moscona AA: Carbonic anhydrase C in the neural retina: transition from generalized to glia-specific cell localization during embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78(11): 7190–7194, 1981.
93. Vardimon L, Fox LE, Moscona AA: Developmental regulation of glutamine synthetase and carbonic anhydrase II in neural retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(23): 9060-9064, 1986.
94. Scott WJ, Lane PD, Randall JL, Schreiner, CM, Ann. NY: The inhibitory effects of integrin antibodies and the RGD tripeptide on early eye development *Acad. Sci.* 429: 447-456, 1984.
95. Holló G: Use of topical carbonic anhydrase inhibition in glaucoma treatment. *Pharmacotherapy in Glaucoma.* Orgül S, Flammer J. Germany Verlag Hans Huber: 145-152, 2000.

96. Dobbs PC, Epstein DL, Anderson PJ: Identification of isoenzyme C as the principal carbonic anhydrase in human ciliary process. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 18: 867-870, 1979.
97. Wistrand PJ and Garg LCL: Evidence of a high-activity C type of carbonic anhydrase in human ciliary processes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 18: 802-806, 1979.
98. Wisfrand J, Schenholm M, Lönnerholm G: Carbonic anhydrase isoenzymes CA I and CA II in the human eye. *Ophthalmol Vis Sci.* 27: 419-428, 1986
99. Nishimori I, Miyaji E, Morimoto K, Kohsaki T, Okamoto N, Onishi S: Diminished cellular immune response to carbonic anhydrase II in patients with Sjogren's syndrome and idiopathic chronic pancreatitis. *Jop.* 5:186-192, 2004.
100. Botre F, Botre C, Podesta E, Podda M, Invernizzi P: Effect of anti-carbonic Anhydrase antibodies on carbonic anhydrases I and II. *Clin Chem.* 49(7):1221-3, 2003.
101. Taniguchi T, Okazaki K, Okamoto M, Seko S, Tanaka J, Uchida K, Nagashima K, Kurose T, Yamada Y, Chiba T, Seino Y: High prevalence of autoantibodies against carbonic anhydrase II and lactoferrin in type 1 diabetes concept of autoimmune exocrinopathy and endocrinopathy of the pancreas. *Pancreas,* 27: 26-30, 2003.
102. Hiroshi N, Akihiro T, Maristela L, Onozato R, Jimbo M, Nangaku H, Uozaki K, Hiroyuki I, İrano M, Omata S: Anti-carbonic anhydrase II antibody in autoimmune pancreatitis and tubulointerstitial nephritis *Am J Surgery,* 189: 369-372, 2005.
103. Alver A, Mentеше A, Karahan S, Erem C, Keha E, Arikan M, Eminağaoğlu S, Deger O: Increased serum anti-carbonic anhydrase II antibodies in patients with Graves' disease. *Exp Clin Endocrinol Diabete.* 115: 287-291, 2007.
104. Alver A, Şentürk A, Çakırbay H, Mentеше A, Gökmen F, Keha E, Uçar F: Carbonic anhydrase II autoantibody and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Clinical Biochemistry,* 44: 1385-1389, 2011.
105. Taniguchi T, Okazaki K, Okamoto M, Seko S, Uchida K, Seino Y: Presence of autoantibodies to carbonic anhidrase II and lactoferrin in type 1 diabetes proposal of the concept of autoimmune exocrinopathy and endocrinopathy of the pancreas. *Diabetes Care,* 24(9): 1695-6, 2001.

106. Grazyna A and Landon K: Autoimmunity against carbonic anhydrase II affects retinal cell functions in autoimmune retinopathy. *J Autoimmun.* 32(2): 133–139, 2009.

107. Di Cesare E, Previti M, Lombardo F, Mazzù N, di Benedetto A, Cucinotta D: Prevalence of autoantibodies to carbonic anhydrase II and lactoferrin in patients with type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* 1037:131-2, 2004.