

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

Prof. Dr. NAZMÎ ZENGİN
ANABİLİM DALI BAŞKANI

**TİP II DİABETİK HASTALARDA DİABETİK RETİNOPATİ İLE İLİŞKİLİ
ENDOTELYAL NİTRİK OKSİT SENTAZ GEN POLİMORFİZMİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. SİBEL İNAN

Danışman
Prof. Dr. NAZMÎ ZENGİN

KONYA - 2007

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. RETİNA.....	4
2.1.1. ANATOMİ VE EMBRİYOLOJİ.....	4
2.2. DİABETES MELLİTUS.....	13
2.3. DİABETİK RETİNOPATİ EPİDEMİYOLOJİ VE SINIFLAMASI.....	14
2.4. DİABETİK MAKULA ÖDEMİ.....	22
2.5. DİABETİK RETİNOPATİ PATOGENEZİ.....	24
2.6. NİTRİK OKSİT.....	32
2.6.1. Nitrik Oksit Sentezi.....	33
2.6.2. Nitrik Oksidin Biyokimyasal Etkisi	34
2.6.3. Gözde Nitrik Oksit Sentaz Izoenzimlerinin Lokalizasyonu.....	35
2.6.4. Nitrik Oksidin Gözdeki Fizyolojik ve Patolojik Durumlardaki Rolü.....	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	43
4. BULGULAR.....	49
5. TARTIŞMA.....	59
6. SONUÇ.....	70
7. ÖZET.....	71
8. SUMMARY.....	72
9. KAYNAKLAR.....	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Nonproliferatif diabetik retinopati

Şekil 2. Proliferatif diabetik retinopati

Şekil 3. Diabetik retinopatinin patogenezi

Şekil 4. Nitrik oksidin enzimatik olarak sentezlenmesi

Şekil 5. NOS –II'nin uyararı, NO üreten hücre ve NO'nun hedef hücredeki olası etkileri

Şekil 6. Diabette serbest oksijen radikalleri oluşumunun nedenleri ve sonuçları

Şekil 7. Heterozigot GT aleline ait melting piki (DNA dizinindeki kırılmaya bağlı olarak iki sıcaklık noktasında verilen ışımaya pikleri)

Şekil 8. Retinopati gruplarında G894T eNOS gen polimorfizminin genotiplerinin retinopati gruplarına göre dağılımı

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.Diabetik retinopatinin sınıflaması

Tablo 2.Diabetik retinopatinin klinik bulguları

Tablo 3.Nitrik oksidin hedef molekülleri ve etkileri

Tablo 4.Gözde NOS-I ve NOS-III lokalizasyonu ve bu izoenzimlerle oluşan NO'nun etkileri

Tablo 5.Gözde NOS-II enziminin lokalizasyonu, bazı hastalıklarla ilişkisi ve etkisi

Tablo 6. Gruplarda biyokimyasal parametre değerleri

Tablo 7. Diabetik hastalarla kontrol grubu arasında genotip dağılımının karşılaştırılması

Tablo 8. Diabetik hastalarla kontrol grubu arasında genotip dağılımının karşılaştırılması

Tablo 9. Diabetik retinopati grupları ile diğer gruplar arasında genotip dağılımının karşılaştırılması

Tablo 10. Alt gruplarda G ve T aleli sıklığı

Tablo 11. Diabetik retinopatili gruplarda makula ödemi varlığı ile genotip sıklığı ilişkisi

Tablo 12. Tüm grupta farklı genotiplere sahip hastaların açlık glikoz ve HbA1c düzeyleri ve anlamlı diğer parametreler ile ilişkisi

Tablo 13. Diabetik hastalarda farklı genotiplere sahip hastaların açlık glikoz ve HbA1c düzeyleri ve anlamlı diğer parametrelerle ilişkisi

Tablo 14. HbA1c düzeyine göre genotip sıklığı

Tablo 15. HbA1c düzeyine göre G ve T alel sıklığı

KISALTMALAR

- DR: Diabetik Retinopati
NPDR: Nonproliferatif diabetik retinopati
PDR: Proliferatif diabetik retinopati
PVR: Proliferatif vitreoretinopati
RPE: Retina pigment epiteli
NO: Nitrik oksit
NOS: Nitrik oksit sentaz
eNOS: Endotelyal nitrik oksit sentaz
iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
nNOS: Nöronal nitrik oksit sentaz
ETDRS: Diabetik retinopati erken tedavi çalışması
NVD: Disk neovaskülarizasyonu
NVE: Retinada neovaskülarizasyon
AKŞ: Açlık kan şekeri
FFA: Fundus floresein anjiografi
LDL: Düşük dansiteli lipoprotein
HDL: Yüksek dansiteli lipoprotein
VLDL: Çok düşük dansiteli lipoprotein
TG: Trigliserid
SRV: Santral retinal ven
SRA: Santral retinal arter
VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetik retinopati (DR) 20-74 yaş arasında körlüğün en sık nedenlerinden birisidir. DR günümüzde gelişmiş ülkelerde tüm yaş grupları içinde yaşa bağlı makula dejenerasyonundan sonra ikinci, üretken çağıdaki nüfus içinde ise birinci sırada körlük nedenidir. Tanının konmasından sonra 15 yıl içinde birçok hastada diabetik retinopati proliferatif evreye ulaşmaktadır.

DR'nin patogenezi hala tam olarak açıklanamamış değildir, birçok araştırma halen devam etmektedir. Günümüzde periyodik izlem, erken tanı ve zamanında tedavi (fotokoagülasyon) ile DR'nin körlükle sonuçlanmasının önemli ölçüde azaltılabileceği bilinmektedir. Diabetes mellitusun göze ait komplikasyonlarının tedavisinde medikal tedaviye ek olarak, cerrahi tedavi de yapılmaktadır. Pars plana vitrektomi diabetik retinopati komplikasyonlarının tedavisinde en sık uygulanan cerrahi tedavidir (1-5).

DR gelişen hastalarda antioksidan savunmanın bozulduğu, serbest radikallerin arttığı ve lipit peroksidasyon ürünlerinin diabetik retinopatinin vasküler hasarından sorumlu olabileceğinden söz edilmektedir (6). Bunlara ek olarak son yıllarda birçok hastalığın patogenezinde rolü olduğu kanıtlanan nitrik oksidin (NO) proliferatif vitreoretinal hastalıklarda da rol alabileceği savunulmaktadır. Özellikle nitrik oksit sentaz-II enzimi tarafından oluşturulan NO'nin in vivo ve in vitro çalışmalarda sitokinler tarafından kontrol edildiği ve oluşan NO'nin lipit peroksidasyon ürünlerine dönüştüğü gösterilmiştir. Organizmada fizyolojik birçok olayda NO'nin faydalı etkileri olmakla birlikte zararlı etkileri de olabilir (7,8). Vasküler tonüs ve yapının korunmasında endotelin önemli rolü olduğuna dair kanıtlar vardır. En önemli endotel türevi vazoaaktif mediatörlerden biri NO'tir (9). NO, kardiyovasküler sistemin düzenleyici mekanizmalarının geniş bir kısmı ile ilişkilidir. Vazodilatasyonu uyarmasının yanında trombositlerin agregasyon ve adezyonunu inhibe eder. Bununla beraber monosit ve lökositlerin endotele adezyonunu ve düz kas hücre proliferasyonunu da engeller. Ayrıca NO, süperoksit radikalinin vasküler üretimini azaltarak LDL oksidasyonunun bir inhibitörü gibi davranır (9,10). NO, vasküler ve kardiyak

kasılmayı azaltan ana düzenleyicidir (11). NO bu etkilerini guanilat siklaz üzerinden, hedef hücrede cGMP konsantrasyonunu artırarak gösterir (12).

Nitrik oksit sentaz'ın (NOS) en az 3 izoenzimi vardır:

- 1- İndüklenebilir NOS (iNOS): Makrofajlarda bulunur. Patolojik olaylarda görev alır.
- 2- Yapısal nöronal NOS (nNOS): Beyinde bulunur.
- 3- Yapısal endotelial NOS (eNOS): Farklı kromozomlarda bulunan gen ailesince oluşturulur ve farklı hücrelerden sentezlenir (13).

Diabetik retinopati erişkin körlüğünün en sık nedeni olarak gösterilmektedir (14). Ek olarak diabetik retinopatinin herhangi bir evresinde görülen diabetik makülopati veya makula ödemi görsel bozulmanın en önemli nedenidir (14,15). Makula ödeminin gelişmesinde en önemli rolü oynayan patofizyolojik basamak kan-retina bariyerinin bozulmasıdır (15,16). Hem retinal kapiller endotel hücreleri tarafından oluşturulan iç bariyer hem de retinal pigment epitel hücrelerinin sıkı bağlantılarıyla oluşan dış bariyer makula ödeminin gelişimi sırasında etkilenebilir. NO vasküler tonüs ve vasküler düz kas hücrelerinin antiproliferatif düzenlenmesinde anahtar role sahip çok fonksiyonlu bir moleküldür (17,18). iNOS tarafından üretilen yüksek miktarlardaki NO, toksik ve hasar yapıcı olarak gösterilse de yapısal olarak düşük düzeyde NO sağlayan eNOS endotel fonksiyonunun korunmasında gereklidir (18). Dolayısıyla diabetin mikrovasküler komplikasyonlarının ve de kardiyovasküler hastalığa yatkınlığın belirlenmesinde eNOS ilgi çekici görünmektedir. eNOS geninde çeşitli polimorfizmler tanımlanmıştır (19,20). Özellikle promotor bölgesindeki T-786C, 4. intron bölgesinde 27-bp tekrarı ve 7. eksondaki Glu298Asp dikkat çekmiştir. Bu polimorfizmler koroner arter hastalığı, hipertansiyon, beyin infarktı ile ilişkilendirilmiş olsa da bulgular kimi zaman çelişkilidir (21). Tip I DM'da 27-bp tekrarının 'b' aleli yüksek diabetik retinopati riski ile ilişkili bulunmuştur (22,23). Tip II DM'lu hasta grubunda eNOS gen polimorfizmi (T-786C, promotor bölgede ve intron 4 deki 27bp tekrarı) makula ödeminin oluşumu ile direkt ilişkili bulunmuştur. Daha önceki çalışma sonuçları ile göz önüne alındığında polimorfizm ile ilgili retinadaki defektif eNOS ekspresyonu makula ödemi gelişimine katkıda bulunabilir (24).

Bu alışmamızda amaç diabetik retinopatili hastalarda retinopati şiddeti ve makula ödemi varlığı ile eNOS gen loküsünde G894T ekson 7 gen polimorfizminin ilişkisini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. RETİNA

2.1.1. RETİNA EMBRİYOLOJİSİ VE ANATOMİSİ

2.1.1.1. Embriyoloji

Retina optik vezikülün distal bölümündeki nöral ektodermden invajinasyon sonucu gelişir. İntrauterin hayatın birinci ayında optik vezikül yüzey ektoderme yaklaşır ve lens vezikülü belirmeye başlar. Aynı anda optik vezikülün de kendi içine gömülmesi ile ikincil optik vezikül oluşur. İkincil optik vezikülün dış gömleği retina pigment epitelini, iç gömleği de retinanın diğer katlarını oluşturmaktadır (25).

2.1.1.2. Anatomi

Retina dıştan içe doğru 10 tabakaya ayrılmıştır:

1. **Retina pigment epiteli (RPE)** nöral retina ile koroid arasında uzanır.
2. **Fotoreseptör tabaka** koni ve basilleri içerir (26).
3. **Dış limitan membran** komşu fotoreseptörlerin yapışıklıkları ve Müller destek hücrelerinin sitoplazmik uzantılarından oluşur, gerçek bir membran değildir. Koni ve basiller bu membranı delerek geçerler. Bol miktarda fenestrasyonları vardır. Periferik retinadaki dış limitan membran ora serrata da pigment epiteli ile birleşir (27).
4. **Dış nükleer tabaka** koni ve basil çekirdeklerini içerir.
5. **Dış pleksiform tabaka** retinanın 1. sinaptik tabakasıdır. Fotoreseptörlerin sinaptik cisimleri ile horizontal ve bipolar hücreler arası sinapsları içerir. Makula bölgesinde basil ve konilerin aksonları daha uzun ve foveada oblik seyrettikleri için dış pleksiform tabaka daha kalın ve daha fibrözdür. Bu bölgeye Henle tabakası denir. Sistemik hipertansiyon gibi durumlarda lipid ve diğer kan ürünlerinin yıldız paterninde birikmesi Henle tabakasının bu özelliği nedeniyledir.
6. **İç nükleer tabaka** bipolar hücreler, Müller hücreleri, horizontal ve amakrin hücrelerin nükleuslarını içerir.

7. **İç pleksiform tabaka** bipolar ve amakrin hücre aksonları ile ganglion hücrelerinin dendritlerini ve bunların sinapslarını içerir.
8. **Ganglion hücreleri tabakası** ganglion hücrelerinin nukleuslarından oluşur.
9. **Sinir lifi tabakası** ganglion hücrelerinin aksonlarından oluşur.
10. **İç limitan membran** gerçek bir membran değildir. Müller hücrelerinin uzantıları ve bazal laminaya yapışıklıklarından oluşur (27).

2.1.1.2.1. RETİNA PİGMENT EPİTELİ

Nöral retina ile koroid arasında uzanan melanin içeren epitelyal tabakadır ve fotoreseptör tabaka için hayati rol oynar. RPE' nin en önemli görevleri; dış kan-retina bariyerini oluşturmak ve devamlılığını sağlamak, A vitamini metabolizmasını ve rodopsin sentezini düzenlemek, elektriksel hemostaz ile ışık absorpsiyonunu, fotoreseptörlerin dış segment fagositozunu, subretinal alandaki sıvı ve besin kontrolünü ve retina adezyonunu sağlamaktadır (27,28).

RPE tek tabakalı hegzagonal hücrelerden oluşur. Makula bölgesinde hücreler 10-14 µm çapında, uzun ince yapıda olup daha fazla melanozom içerirler. Perifere doğru gittikçe hücreler düzleşir, daha az pigment içerir ve çapları 60 mikronun üzerine çıkar. Yeni doğanda 4-6 milyon RPE hücresi vardır ve göz yüzey alanı yaşla birlikte artmasına rağmen RPE hücrelerinin sayısı göreceli olarak daha az artar. Komşu RPE hücreleri birbirlerine zonula okludens ve zonula adherens olarak adlandırılan bağlantı kompleksleri ile bağlanırlar ve bu kompleksler dış kan-retina bariyerini oluştururlar (27). Zonula okludensler su ve iyonların serbest geçişini önlemektedirler (28).

Retina pigmentleri

Melanin: Melanozom adı verilen stoplazmik granüller içinde bulunurlar. Embriyolojik olarak RPE vücutta ilk pigmente olan dokudur. Melanin serbest radikal stabilizatörü olup toksinleri tutabilen ajandır. Potansiyel retinotoksik maddeleri de tutar. Melaninin optik yolların ve foveanın gelişiminde rolü olduğu düşünülmektedir (28).

Lipofuskin: Lipofuskin yaşlanma ile birlikte biriken bir RPE pigmentidir. Lipofuskinin RPE hücreleri tarafından alınıp sindirilen fotoreseptörlerin dış segmentleri ya

da fotopik veya oksidatif hasara uğrayan membran formasyonları olabileceği düşünülmektedir (28).

2.1.1.2. 2. NÖROSENSORYAL RETİNA

- 1- Fotoreseptörler
- 2- Bipolar hücreler
- 3- Ganglion hücreleri
- 4- Amakrin ve horizontal hücreler
- 5- Nöronlar dışında nöroglial hücrelere benzeyen destek hücreleri

Fotoreseptörler

Koni ve basil olarak adlandırılan 2 tip fotoreseptör vardır ve bunlar RPE ile dış limitan membran arasında yer alırlar. Her bir fotoreseptörün iç ve dış olmak üzere iki segmenti vardır. Işığa duyarlı dış segment, mukopolisakkarit matriks ile sarılmış ve RPE apikal uzantıları ile temas halindedir. Fotoreseptör hücrelerinin dış segmentleri ile RPE arasında sıkı bağlantılar ve diğer intersellüler bağlantılar yoktur. Bu iki tabakanın apozisyonundan sorumlu faktörler henüz tam anlaşılmamıştır, fakat aktif transportla ilişkili olduğu düşünülmektedir (27).

Basiller: Çapları 2–5 µm, boyları 100–120 µm olan, alaca karanlıkta ve gece görmeden sorumlu olan basiller foveada hiç bulunmaz ve perifere doğru sayıları hızla artar, uç periferde hafifçe azalır (26).

Koniler: Boyları 65–75 µm olan, kalınlıkları 5–8 µm ve foveada 1,5 µm olan silindirik şeklinde hücrelerdir. Toplam sayıları 6.3- 6.8 milyon kadardır. Parlak ışıkta görme, renkli görme ve keskin görmeden sorumludurlar. İnsan retinasındaki koniler 419 nm (mavi), 531 nm (yeşil), 558 nm (kırmızı) olmak üzere üç ışık spektrumu içindeki fotonları absorbe ederler (26).

Bipolar hücreler

Radyal yerleşimli olan bu hücrelerin, dendritleri dış pleksiform tabakada koni ve basiller ile sinaps yapar, aksonları ise iç pleksiform tabakada ganglion ve amakrin hücrelerle sinaps yapar (26).

Ganglion hücreleri

Retinanın iç kısmında bulunurlar ve görme yolunun 2. nöronlarıdır. Periferden makülaya doğru ganglion tabaka sayısı artar, foveaya doğru tekrar azalır ve foveada tamamen kaybolur. Ganglion hücreleri multipolar hücrelerdir, dendritleri bipolar hücreler aksonları ve amakrin hücreler ile sinaps yapar (26).

Amakrin ve horizontal hücreler

Horizontal hücreler basil ve konilerin terminal genişlemelerinin yakınlarında yer alan multipolar hücrelerdir, bir adet uzun ve çok sayıda kısa uzantıları retina yüzeyine paralel uzanır. Horizontal hücrelerin görme stimulusunun integrasyonunda ve horizontal iletide rol oynadıkları düşünülmektedir.

Amakrin hücreler bol stoplazmalı, parçalı nukleuslu ve çok sayıda dendritleri olan aksonsuz hücrelerdir (26).

2.1.1.2.3. NÖRAL RETİNANIN ÖZGÜL ALANLARI

Umbo

Makulanın tam santralindedir. Retinanın en yüksek görme keskinliğine sahip bölgesidir. Oftalmoskopik olarak fovea reflexinden sorumludur. Foveola ve umboda başlıca fotoreseptörler konilerdir (29). Konilerin en yüksek konsantrasyonu umbodadır.

Foveola

Fovea santralindeki depresyondur. Foveola merkezi optik disk santralinden 4 mm temporalde ve 0.8 mm altındadır. Retinanın en ince kısmıdır ve burada ganglion hücreleri yoktur. Foveola, Müller hücreleri, glial hücreler ve fotoreseptörleri içerir (27). Santral koni demetini çevreleyen foveola 350 µm çap ve 150 µm kalınlıktadır. Avasküler alan uzamış ve eksternal limitan membran ile bağlantılı yoğun koni paketlerini içerir. Dış segmentlerin uzaması sonucu dış limitan membran dışı doğru çıkıntı yapar, bu durum "fovea eksterna fenomeni" olarak adlandırılır (29).

Fovea

Makulanın merkezinde 1500 µm çapında ve 22°'lik eğimli kenarı olan bir alandır. Dış kenar kalınlığı 0,55 mm, foveola kalınlığı 0,13 mm'dir. İç limitan membran kalınlığı vitreal yapışıklık gücü ile ters orantılıdır, yapışıklıklar foveolada en güçlüdür. Parafovea fovea kenarını çevreleyen 0,5 mm kalınlığında olan bölgedir ve 4–6 tabaka ganglion hücresi ve 7–11 tabaka bipolar hücre içerir. Perifovea, parafoveayı çevreleyen 1,5 mm kalınlığında olan bölgedir. Birkaç ganglion hücre tabakası ile yaklaşık 6 bipolar hücre tabakası içerir (29).

Makula

Umbo, foveola, fovea, parafovea ve perifovea birlikte makulayı oluşturur. Makulada ganglion hücre tabakaları birkaç hücre kalınlığında iken perifer retinada sadece bir hücre kalınlığındadır. Makula sınırı; major temporal arkadlar ile belirlenir ve çapı yaklaşık 5.5 mm dir. Fovea çapı (1.5 mm) + 2 x parafovea kalınlığı (2x 0,5 mm) + 2 x perifovea kalınlığı (2x 1.5 mm) makula çapını oluşturur (5.5 mm) (29).

Perifer retina

Yakın, orta, uzak ve uç perifer olmak üzere 4 bölgeye ayrılır. Perifer retina ora serrataya yaklaştıkça incelik sonlanır ve pars plana nonpigmente epiteli ile devam eder. Ora serrata temporalde 2.1 mm, nazalde 0.7-0.8 mm genişliğindedir. Ora serrata nazalde temporal kadrarla karşılaştırıldığında daha öndedir. Nazal ora, limbusun 6 mm arkasında, temporal ora ise 7 mm arkasındadır. Ekvator ora serratanın 6–8 mm arkasındadır ve makula ekvatorun 18-20 mm arkasındadır. Ora serratadan optik sinire ortalama mesafe temporalde 32.5 mm, nazalde 27 mm ve üst ve altta 31 mmdir. Perifer retina patolojileri genellikle saat kadrana göre belirlenir. Posterior vitreus tabanı nedeniyle çoğu periferik patoloji bu segmentte olur. Ora serrata ve pars plana uç perifer olarak tanımlanır (29).

Optik disk

1.5 mm çapında soluk pembe–beyaz renkli ve çevre retinadan daha soluk olan optik disk makulanın 3 mm medialinde bulunur. Optik sinir lifleri sklerayı delerek geçer ve

bu bölge lamina kribrosa olarak tanımlanır. Göreceli olarak zayıf bir bölgedir, göz içi basıncının artması ile dışarıya protrude olabilir. Optik diskte basil ve koni yoktur, ışığa duyarsızdır ve bundan dolayı bu bölge görme alanında 'kör nokta' olarak tanımlanır (26).

2.1.1.2.4. RETİNANIN VASKÜLER YAPISI

Retina, optik diskin yakınındaki büyük dallar dışında gerçek arter ve ven içermemektedir. Retina arterleri anatomik olarak uç-arter olup arteriovenöz anastomoz göstermemektedirler. Hem retina hem de koroid tabakalarının drenajı büyük oranda santral retinal ven (SRV) ve dalları ile olmaktadır (30).

Retina birim ağırlık başına oksijen tüketiminin yüksekliği açısından insan vücudundaki diğer dokulardan farklıdır. Bu metabolik dolaşımı sağlamak için iki ayrı dolaşım sistemi mevcuttur. Dış pleksiform ve dış nükleer tabakalar, fotoreseptörler ve pigment epitelinden oluşan retinanın 1/3 dış kısmı koroid dolaşımından, 2/3 iç kısmı ise santral retina arterinden beslenir. Bu iki sistemin anatomik ve fizyolojik ilişkileri tamamıyla farklıdır. Koroid dolaşımı daha yüksek akımlı ve değişken olup metabolitlerin koroid ve çevre dokulardaki serbest transferine izin verir. Retina dolaşımı daha düşük akımlı ancak daha sabit bir sistemdir ve daha fazla oksijen sağlar. Koroid dolaşımı hem besleyici hem de soğutucu sistem olarak görev yapar (25). Retina kan damarlarının otonom sinir sistemi innervasyonu yoktur. Özellikle CO₂ gibi metabolik ürünleri birikimi, pH değişiklikleri ve O₂ ihtiyacı retina dolaşımını etkileyebilir.

Retina intrauterin 4. aya kadar avaskülerdir. Retina damar sisteminin gelişimi, retinanın kendi gelişimini tamamlamasından sonra, intrauterin hayatın 4. ayında göz içinde mevcut olan hyaloid arterden başlamaktadır. Bu damar sistemi papilladan başlar ve vitreus içinde tek bir damar halinde lens arkasına doğru uzanır. Hyaloid arter çıkış yerinde ve arterin etrafında birikmiş bulunan hücreler, papilla etrafında ve retina içine doğru gelişen küçük damar tomurcukları papilladan periferde doğru her yönde retina içinde gelişerek retina damarlarını meydana getirirler. İntrauterin 6. ve 7. ayda arter, ven ve kapillerler derinlemesine iç nükleer tabakaya, ekvatora kadar uzanırlar. Sekizinci ayda ise damarlar ora serrataya kadar uzanır ve bu aşamada primitif kapiller ağ gelişir.

Postnatal 3. ayda retina damar yapısı erişkin düzeyine erişir. Santral retina arteri retina dolaşımı için esas kaynaktır, ancak normal gözlerin %25'inde diskin yanındaki küçük bir alan silioretinal arter tarafından beslenir (25).

Arterler

İnternal karotid arterden ayrılan oftalmik arter, optik kanalda optik sinirin alt ve dış yanından geçerek optik siniri üstten çaprazlar, iç yana geçer ve dallanır. Santral retina arteri globun 8–15 mm gerisinden optik sinire penetre olur ve optik sinirin ortasından geçerek glob içine doğru uzanır (30).

SRA lamina kribrozadan geçince retina içinde dallara ayrılır ve bu dallar genellikle sinir ağına uygun dağılım gösterir. SRA lamina kribrozadan geçtikten sonra internal elastik tabaka hızla kaybolur ve kas tabakası inceliyor ortadan kalkar. SRA optik sinir başında SRV nin nazalindedir ve optik sinire SRV ile aynı düzeyde veya önünde penetre olur (30).

SRA nin optik sinir içindeki seyri sırasında iç çapı 200 mikron, duvar kalınlığı 35 mikrondur. Diğer muskuler arterlerde olduğu gibi aterom plakları ve dev hücreli arterit, arterin sinir içindeki bölümünde kısmi veya tam tıkanma meydana getirebilirler. Ateroskleroz, arterin hem sinir içi, hem de göz içi bölümlerinde ortaya çıkabilir. Hyalinizasyon ise arterin göz içi bölümlerinde meydana gelir. İkinci darlık olan lamina kribroza bölgesi trombosit agregasyonu yönünden önemli bir bölgedir. Retina boyunca sinir lifleri tabakasında iç limitan membranın hemen altında ve genellikle venlerin üzerinde seyrederek.

Retina arterleri aralarında kapiller düzeyi dışında anastomoz bulunmayan uç arter özelliğindedir (26). Oftalmik arterin major dalları, santral retinal arter, posterior silyer arterler ve göz kaslarına giden dallardır. Medial ve lateral olmak üzere iki posterior silyer arter vardır, bazen superior posterior silyer arter de bulunabilir (31). Posterior silyer arterler çok sayıda kısa posterior silyer arter ve 2 uzun posterior silyer arterlere ayrılır. Posterior koriokapillaris kısa posterior silyer arterlerden, anterior koriokapillaris uzun posterior silyer ve anterior silyer arterlerden beslenir. Koroid sulama alanı her bir

posterior silyer arterin beslediği alanlar arası mesafe olarak tanımlanır. Koroid, vorteks venöz sistemi tarafından drene edilir. Bunlar genellikle 4–7 (ortalama 6) major damardır. Ekvator bölgesinde her alanda 1 veya 2 olarak bulunur. Vorteks venleri superior ve inferior orbital venlere, oradan da kavernöz sinüs ve pterygoid pleksusa drene olurlar. Superior ve inferior orbital venler arasında genellikle kollateraller vardır (32).

Tipik olarak optik diskten çıktıktan sonra santral retina arteri superior ve inferior papiller dallara ayrılır, bu dallar da daha sonra temporal ve nazal dallara ayrılır. Retina arterlerinin superior ve inferior dallara ayrılması genellikle retina boyunca devam eder. Normal retina damarları nadiren horizontal hattı geçer. Kollaterallerin orta hattı geçmesi venöz okluzif hastalığın bir bulgusudur. Major dal arterleri disk sınırını çaprazlarken yaklaşık 100 µm çapındadır. Arterler retinanın sinir lifi ve ganglion hücre tabakası içerisinde seyrederek. Genellikle birinci ayırmadan sonra elastik fibril ve internal limitan membran içermezler, bu yüzden de arteriol terimi daha uygundur. Retina arterleri ve arteriollerini iç tabakada kalır, sadece kapillerler derinleşerek iç nükleer tabakaya geçer. Retina venöz drenajı genellikle arteriyel dallanmayı takip eder. Retina venleri (başlıca venüller) iç retinada bulunurlar, bazen eşlik ettikleri arterlerin arasında bulunurlar. Arteriovenöz çaprazlanma noktalarında genellikle arter veni önden çaprazlar. Çaprazlaşma bölgeleri en sık retina ven oklüzyon bölgeleri olduğu için önemlidir (32).

Venler

Optik sinir içinde arterin temporalinde yer alan santral retina veninin göz küresine giriş yerinde çapı 200 mikron ve duvar kalınlığı 35 mikrondur. Duvarı tek tabaka endotel hücresi, subendotelyal bağ dokusu tabakası, media ve ince bir adventisyadan oluşur. Lamina kribrosa bölgesi tıkanmanın en sık rastlandığı bölgedir. Lamina kribrosa seviyesinde santral retinal arter ve ven bağ dokusu ile sarılıdır ve duvarlarının bir kısmı ortaktır, her iki damar lümeni bu noktada daralır. Bu bölgedeki arter ve ven arasındaki bağ dokusunun düzensiz kalınlaşması ven üzerine bası yaparak azalmış arter akımı varlığında tromboz için gerekli türbülansı oluşturur. Optik diskte retina ve koroid dolaşimleri arasında potansiyel anastomozlar mevcuttur. Santral retinal ven

tıkanıklığında bu anastomozlar genişleyerek oftalmoskopik olarak görülebilen optosilyer şantlar halini alırlar. Optik sinir içindeki santral retina veni pia venleriyle birleşir ve bu bölümde daha fazla sayıda potansiyel kollateral mevcuttur. Retina periferine doğru gittikçe ven duvarındaki kas hücrelerinin yerini perisitler alır ve bunlar kas hücrelerinin kasılma özelliğini göstermediklerinden akımın yavaşladığı ya da kan viskozitesinin arttığı durumlarda venöz dolgunluğa neden olurlar (33).

Venlerin çapı eşlik ettikleri arterlerin çapından daha büyüktür ve genellikle arterler daha yüzeysel seyrederek ve venleri üstten çaprazlama eğilimindedirler (30). Bu çaprazlaşma bölgelerinde arter ve ven tunika adventisya olarak adlandırılan ortak bir kılıf ile sarılır (33). Venler de arterler gibi perifere gittikçe daralır ve venül halini alırlar. Dallanmaları genelde ikiye ayrılma şeklinde olur. Arteriol ve venül arasında bağlantı kapillerler aracılığı ile olur (25). Retina venleri santral retina venine drene olurlar. Santral retina veni ise ya superior oftalmik ven yolu ile veya direk olarak kavernoöz sinüse drene olur (30).

Kapillerler

Arter ve ven arasında bağlantıyı sağlayan yapı kapiller damarlardır. Retinada kapillerlerin olmadığı 3 bölge mevcuttur:

- 1- Ora serratadan 1.5 mm gerisine kadar olan bölge
- 2- Fovea santralinde ortalama 0.5 mm'lik bölge (foveal avasküler zon)
- 3- Büyük arterlere ve daha az oranda venlere komşu bölgeler

Kapiller duvarı tek katlı endotel hücre tabakası, perisit ve bazal membrandan oluşur. Endotel hücreleri birbirleri ile sıkı bağlantı yaparlar. Bu sıkı bağlantı iç kan-retina bariyerini oluşturur. Endotel hücrelerinin mitoz yapma potansiyeli olduğu gösterilmiştir. Böylece vasküler hasardan sonra kan-retina bariyerinin yeniden oluşmasına yardımcı olur. Kapiller ağ afferent arteriol, efferent venül ve arada kalan kanaldan meydana gelir. Retina dolaşımında iki ayrı kapiller ağ mevcuttur. Derin kapillerler iç nükleer tabakada, yüzeysel kapillerler ise sinir lifleri ve ganglion hücre tabakaları arasında yer alırlar (30). Retina

kapillerleri laminer ağ biçiminde düzenlenirler. Laminer ağ kalınlığı retina kalınlığı ile bağlantılı olarak arka kutupta 3 tabakadan periferde 1 tabakaya kadar değişir.

2.2. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus, klinik tablo ve patogenez açısından heterojen, kendine özgü hümoral ve dokusal bulgu ve değişimlerle karakterize, kronik hiperglisemi tablosuyla seyreden bir metabolizma hastalığıdır. Bu hiperglisemi durumunun temelinde, çevresel ve genetik etkenler bulunmaktadır. Hiperglisemi pankreas hücrelerinin salgıladığı insülin yokluğuna veya insülin etkisine zıt etkenlerin fazlalığına bağlı olarak ortaya çıkar (34).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından evrensel bir sağlık sorunu olarak kabul edilen Diabetes mellitus, günümüzde artık sorgulanan ve tekrar gözden geçirilen iki tipte incelenir.

Tip I Diabetes Mellitus: Pankreas hücrelerinin zedelenmesi ya da total kaybına bağlı olarak gelişen insülin eksikliği ile ortaya çıkan ve insüline bağımlı olarak sürüp giden diabet tipidir. Etyopatogenezinde pek çok faktör tanımlanmıştır. Bunların içerisinde en önemlisi, otoimmün aktivasyon sonucu ortaya çıkan hücre zedelenmesidir. Tip I diabet tanısı için, insülin bağımlı başlangıç şekli gereklidir.

Tip II Diabetes Mellitus: Daha büyük sıklıkta görülen tiptir. Genellikle başlangıçta insülin gereksinimi olmadan kontrol edilebilen bir hastalıktır. Patogenezinde, hastalığın genetik ve çevresel bileşenlerinin bulunduğu üzerinde fikir birliği mevcuttur.

WHO' nun, 1997 yılındaki raporunda, bu hastalığa yakalanmış olanların sayısının 135 milyon olduğu, 2005 yılında bu sayının 300 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. (Gelişmiş olan ülkelerde artışın %40, gelişmekte olan ülkelerde ise %170 olacağı düşünölmektedir.)

Diabete özgü klasik semptomların ve komplikasyonların varlığında hastalığın tanısı kolaylıkla konulabilir. Ancak gerçek anlamda ve erken tanı, bazı laboratuvar yöntemlerinin doğru bir şekilde kullanılması ve sonuçlarının değerlendirilmesine dayanmaktadır. 1998 yılında Amerikan Diabet Birliği (ADA) ve Avrupa Diabet Yönetim

Grubu (EDPG) tarafından tanı ve göstergeleri gözden geçirilerek yeni kurallar getirilmiştir. Buna göre, aşağıda belirtilen üç kriterden herhangi birinin varlığında diabet tanısı konulabilir (35).

1) Diabet semptomları ile birlikte herhangi bir anda ölçülen plazma glukoz düzeyinin 200 mg/dl olması.

2) Açlık plazma glukoz değerinin (en az 8 saat hiç kalori alınmadan) >126 mg/dl olması.

3) 75 gram glukoz ile yapılan oral glukoz tolerans testi sırasında ilk iki saat içinde glukoz değerinin > 200 mg/dl olması.

2.3. DİABETİK RETİNOPATİ

2.3.1 Diabetik Retinopatinin Epidemiyolojisi

Tüm dünyada 20–65 arası yaş grubunda görülen önlenebilir ve / veya tedavi edilebilir en önemli körlük nedeni olan diabetik retinopati (DR), diabetes mellitusun en önemli komplikasyonlarından biridir. Genel popülasyona göre körlük riski 25 kat daha fazladır. Dünya nüfusunun resmi olarak %1.5–2'sinde diabet vardır. Türkiye' de tahmini rakam 2 milyon kişidir. Bu nüfusun %25'inde herhangi bir seviyede DR mevcuttur (36). DR gelişiminde hastalığın süresi öncelikli kriterdir. İnsüline bağımlı olmayan diabetli hastalarda DR insidansı 11–12 yılda %23, 16 ve üstü yılda %60, ve 16 ve üzeri yılda proliferatif diabetik retinopati (PDR) insidansı %3 bulunmuştur (37). DR, 20–75 yaşlarında tüm insanlarda körlük nedenleri arasında önemli bir yer tutar. Körlük nedeni genelde, çözölemeyen vitre içi kanaması, traksiyonel retina dekolmanı veya diabetik makula ödemidir. 10 yıllık oran %20 iken 25 yıllık diabetlide %85'e yükselmektedir (38).

Diabetik retinopati gelişimindeki risk faktörlerinin en önemlisi kuşkusuz diabetin varlığıdır. Diabete ait tüm komplikasyonların gelişiminde, diabetin süresinin en önemli risk faktörü olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Tip II diabetes mellitus'lu hastalarda, diabet süresi 5 yıldan az olanlarda nadiren diabetik retinopatiye ait bulgular saptanır. 5 -

10 yıl arasında %27, 10 yıldan fazla diabetiklerde %71-90 oranında diabetik retinopati görülür. 20-30 yıl arasında insidans %95'e çıkar ve bunların %30-50'si proliferatif diabetik retinopatidir.

Kronik hiperglisemi, diabetik retinopati oluşumu ve ilerlemesinde en önemli etkenlerden biridir. Diabet Kontrol ve Komplikasyonları Çalışma Grubu'nun sonuçları ve deneysel çalışmalar iyi bir glukoz kontrolünün diabetin komplikasyonlarını azaltıcı etkisinin olduğunu göstermiştir. Glikolize hemoglobin (HbA1c) değerleri normalin üstünde olanlarda, normal olan olgulara göre retinopatinin 2.5 kat yüksek oranda görüldüğü bildirilmiştir.

Diabetin tipi de retinopati gelişiminde etkilidir. İnsülin kullanan Tip II diabetik hastalarda %10, insülin kullanmayanlarda ise %3 oranında proliferatif diabetik retinopati saptanmıştır (39).

Bazı küçük popülasyonlu çalışmalarda kadın ya da erkek lehine küçük farklılıklar bildirilmesine rağmen, retinopati sıklığı ve seyri üzerinde cinsiyetin rolü olduğu düşünülmemektedir.

Hipertansiyon, diabetik retinopati gelişme riskini arttıran bir başka faktördür. Bununla beraber diabetin önemli bir mikroanjiopatik komplikasyonu olan nefropati; kan basıncı ve fibrinojen düzeylerini yükselterek, lipoprotein profilini değiştirip proliferatif retinopati gelişme riskini artırır.

Travma ve inflamatuvar hastalıklar nedeniyle geniş korioretinal skarlaşması olan hastalarda, diabetik retinopati prevalansı ve şiddetinin az olduğu saptanmıştır. Bu olayın nedeni tam olarak açıklanamamakla birlikte, retinal metabolik ihtiyaçların, özellikle de oksijen ihtiyacının azalması sonucu vazoproliferatif faktör salımının azalması en çok taraftar bulan hipotezdir. Bu gözlemden yola çıkılarak ortaya atılan panretinal fotokoagülasyonun amacı, benzer durumu iatrojenik olarak yaratabilmektir. Panretinal fotokoagülasyonun proliferatif diabetik retinopatideki progresyonu azaltıcı etkisi tartışmasızdır (40).

2.3.2. Diabetik Retinopatinin Sınıflandırılması

Diabetik retinopati, retina kapiller damarları, venülleri ve arteriollerinin tutulduğu özel bir anjiopatidir. Oluşturduğu retinopati tabloları nonspesifik olup tüm retinopatilerin bir özeti gibidir. Progressif olan bu retinopati tablosu her zaman aynı hızla ilerlemez, zaman zaman remisyonlar gösterir. Retinanın bir bölgesinde düzelmeler olurken başka bölgelerde bozulmalar ortaya çıkabilir. Spontan regresyon görülse dahi bu oran %10' u geçmez (41).

Diabetik retinopatinin erken tanı ve tedavi endikasyonlarının belirlenmesi için iyi bir klasifikasyonun yapılması zorunludur. Günümüzde, ETDRS grubunun oluşturduğu, Airlier-House sınıflandırmasının geliştirilmesi ile elde edilen, diabetik retinopatideki 19 lezyonu standart fundus fotoğraflarına göre ayrı ayrı derecelendiren sistem en uygun sınıflandırma olarak görülmektedir (42).

Diabetik retinopati; NPDR ve PDR olmak üzere iki grupta değerlendirilir (Tablo 1). NPDR devresinde lezyonlar sadece retina içinde sınırlı iken, PDR devresinde retinal lezyonlara ek olarak vitreus içine doğru ilerleme söz konusudur (43). Klinik bulgular Tablo 2' de gösterilmiştir.

2.3.2.1. Non-Proliferatif Diabetik Retinopati (NPDR)

Lezyonların ağırlığına göre hafif, orta, ağır ve şiddetli olmak üzere klinik olarak dört alt grup içinde değerlendirilir (Tablo 1).

1- Hafif NPDR

Retinopatinin başlangıç dönemidir. Mikroanevrizmalar, az sayıda ufak retinal hemorajiler görülür. Bir yıl içinde PDR gelişme riski %5, beş yıl içinde yüksek riskli PDR gelişme riski %15' tir.

2- Orta NPDR

Mikroanevrizmalar ve/veya retinal hemoraji sayısı artmış, dört retinal kadranın en az birinde yaygın şekilde mevcuttur. Yumuşak eksudalar, venöz boğumlanmalar ve

intraretinal mikrovasküler anomaliler (İRMA) görülmeye başlamıştır. Bir yıl içinde PDR gelişme riski %12-27, 5 yıl içinde yüksek riskli PDR riski %33' dür.

Tablo1. Diabetik retinopati sınıflaması

NONPROLİFERATİF DR	PROLİFERATİF DR	DİABETİK MAKULOPATİ
Background DR <ul style="list-style-type: none">• Hafif NPDR• Orta NPDR Preproliferatif DR <ul style="list-style-type: none">• Ağır NPDR• Şiddetli NPDR	<ul style="list-style-type: none">• Erken PDR• Yüksek Riskli PDR	<ul style="list-style-type: none">• Fokal• Diffüz• İskemik• Mikst

3-Ağır NPDR

Mikroanevrizmalar, hemorajiler, venöz değişiklikler, İRMA tabloya hakimdir. Yumuşak eksudalar da saptanır. Hemorajiler ve mikroanevrizmalar tüm retinal kadranda, venöz kalibrasyon değişiklikleri en az iki retinal kadranda, İRMA en az bir retinal kadranda saptanabilir düzeydedir. Bir yıl içinde PDR gelişme riski %52, 5 yıl içinde yüksek riskli PDR gelişme riski %60' tır.

4- Şiddetli NPDR

Ağır NPDR' nin daha yaygın ve daha yoğun şeklidir. Yaygın arterioler tıkanıklıklar, yumuşak eksudalar, venöz değişiklikler ve özellikle İRMA yoğunluğu ve genişliğinde artış görülür. Bir yıl içinde PDR gelişme riski %75' tir.

Nonproliferatif diabetik retinopatiyi oluşturan lezyonlar:

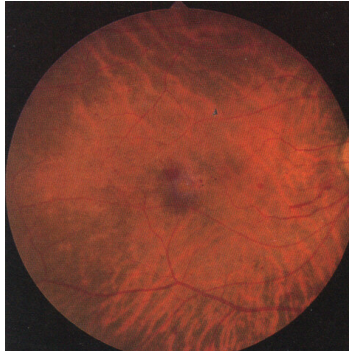
Mikroanevrizmalar

DR'in ilk klinik bulgusudur. Retina kapillerlerden gelişir ve genellikle, tıkanmış kapiller bölgelerde bulunur. 12–125 mikron çapındadırlar. 125 mikrondan büyükleri kanama olarak adlandırılır. Küçük anevrizmalar kapiller duvarda perisit kaybının yol açtığı

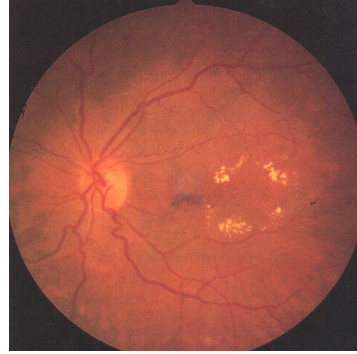
zayıflık ve keseleşme sonucu oluşur. Fundus floresein anjiografide (FFA) mikroanevrizmalar boyanır, kanamalar boyanmaz (44).

Retina içi kanamalar

Mikroanevrizmaların yırtılması, dekompanse kapillerler ve İRMA'lar, retina kanamalarına neden olur. Bunların klinik görünümü retinada yerleştiği yere göre değişir. Dış pleksiform ve iç nükleer tabakalardaki kanamalar yuvarlak ve pençe şeklinde görülürken, yüzeysel sinir lifleri tabakasındakiler alev şeklinde görülür. Bu kanamalar 6 hafta ile 4 ay arasında rezorbe olur (45).



1a. Erken dönem NPDR, retinal hemorajiler.



1b. Orta derecede NPDR, retinada leke tarzında hemorajiler, makulada halka oluşturmuş sert ekudasyonlar ve makula ödemi

Şekil 1. Nonproliferatif diabetik retinopati

Sert eksuda

Sarı-beyaz renkte, keskin sınırlı, lipid/lipoprotein birikimleridir. Dış pleksiform tabakada yer alırlar. Kümeler halinde veya mikroanevrizmaları çevreleyen sirsine halkalar şeklinde olurlar. FFA'da druzen gibi boyayı maskeleyemezler. Kendiliğinden veya lazer tedavisi sonucu rezorbe olurlar. Kronik olarak sert eksudalar sert plaklara dönüşerek diskiform tip skar oluştururlar. (46).

Makula ödemi

Mikroanevrizmalardan, kapillerden ve İRMA'lardan sızan serum lipoproteinleri ve diğer plazma elemanları ekstrasellüler boşlukta birikerek makula ödemine yol açarlar (44).

Yumuşak eksudalar

Atılmış pamuk görünümlü eksudalar sinir fibrillerindeki küçük infarktlardır. Bölgesel hipoksi sonucunda aksonlardaki iletimin yavaşlaması ile aksonlarda hücre artığı organeller birikir ve kistoid cisimler oluşur. Ortalama 6 haftada sinir lifi ve ganglion hücre kaybına bağlı atrofik bir alan bırakarak iyileşirler. FFA'da hiperfloresans gösterirler (46).

Arteriollerde tıkanma

Önce uç arteriollerden başlar, sonra büyük arterioller tutulur. İplik gibi beyaz renkte tıkanmış damarlar gözlenir. Makulanın tutulumu geri dönüşümsüz görme kayıplarına neden olur.

Venöz bozukluklar

Diabette görülen venöz bozukluklar; venlerde boncuklanma, halka oluşumu, kılıflanma, ven civarında eksudasyon ve ven tıkanıklıklarıdır. Venöz boncuklanma ven duvarında incelmeye birlikte olan fokal venöz genişleme alanlarıdır. Halka oluşumu, venin normal seyrinden sapmasıdır. Retina dal ve kök tıkanıklıkları diabetli kişilerde daha sık görülür (44).

İntra Retinal Mikrovasküler Anormallikler (İRMA)

İRMA arteriol ve venüller arasındaki genişlemiş, kıvrımlı ve telenjektazik kanallardır. Yeni damar oluşumundan ziyade, var olan damarların endotelial proliferasyonu ve sonucunda nonperfüze alana doğru şant oluşumunu gösterirler. Çok sayıda İRMA varlığı NPDR'nin şiddetli dönemini ve kısa sürede hafif neovaskülarizasyon (NV) başlayacağını gösterir (47).

2.3.2.2. Proliferatif Diabetik Retinopati (PDR)

Retina yüzeyinde ve/veya optik disk üzerinde yeni damar oluşumu ve birlikte fibröz doku proliferasyonu görülmesi ile karakterizedir. Esas bulgu olan neovaskülarizasyonlar retina yüzeyinde özellikle temporal kadranda ve optik disk üzerinde yerleşirler. Neovaskülarizasyonların özelliği, büzüşme yeteneği olan fibröz doku ile çevrili olmasıdır. PDR tanısı koyabilmek için retina yüzeyinde ve/veya optik disk üzerinde yeni damar oluşumunun ve birlikte fibröz doku proliferasyonunun olması şarttır (46). PDR diabetik

populasyonunun yaklaşık %5-10 unda görülür. Otuz yıllık diabetik olguların yaklaşık %60'ında PDR mevcuttur. Ağır NPDR' si olan olgular PDR gelişme riski en yüksek olgulardır (37). Klinik olarak iki dönemde incelenir (Tablo 2).

1-Erken PDR: Retinal neovaskülarizasyonlar ve minimal fibröz doku proliferasyonu ile karakterizedir.

2- Yüksek Riskli PDR: Neovaskülarizasyonlar vitreusa doğru ilerlemiş ve beraberindeki fibröz doku belirginleşmiştir. Bunlara preretinal ve vitre içi hemorajiler eşlik eder.

Klinik Bulgular

Neovaskülarizasyon (NV)

Görünüm olarak araba tekerleği şeklinde veya belirgin radyal paterni olmayan düzensiz şekilli damarlardır. Son derece naziktirler, geçirgenlikleri fazladır ve mezankim kaynaklı, kontraktıl özelliği olan (içerdiği fibroblastlar nedeniyle) fibröz bir doku tarafından sarılıdırlar. Başlangıçta belirgin olmayan bu fibröz doku, zamanla matlaşarak görünür hale gelir. NV, optik disk üstünde ve/veya retinanın herhangi bir yerinde gelişebilir. Retina yüzeyine yerleşen NV'lar sıklıkla arka kutupta ve ana temporal arkadlar boyunca lokalize olurlar. PDR' li olguların %15' inde NV optik disk üstünde veya bir disk çapı uzaklıktaki mesafede, %40' ında bu alan dışındaki retina yüzeyinde, %45' inde ise her iki bölgede yerleşim gösterir. PDR' nin geç evresinde bu damarlar gerileyebilir (46-48).



2a. Retinal neovaskularizasyonlar, sert eksudalar, preretinal hemoraji



2b. İleri dönem PDR; retinal çekintilere neden olan fibrovasküler bantlar ve retinal hemorajiler

Şekil 2. Proliferatif diabetik retinopati

Hemoraji

DR'de hemoraji neovasküler dokudan kaynaklanır. İki tip hemoraji görülür. Retina önü hemoraji, mevcut vitreus dekolmanı boyunca dekole vitreus ile retina yüzeyi arasında yerleşim gösterir. Rezorbe olabileceği gibi, vitreusun içine de yayılabilir. Vitre içi kanama, ağır görme kaybına yol açar. Vitreus içine doğru büyüyen NV'a ya da oluşmuş retina önü kanamanın yayılmasına bağlı olarak gelişir. İlk vitreus kanamalarında olgunun durumuna göre ilk üç aylık sürede kendiliğinden rezorpsiyon beklenir (48,49). Laser tedavisinin uygulanmamış olması, kanama ile birlikte traksiyonel dekolmanın varlığı ve olgunun özel durumu (tek göz olması, genç olması) erken vitreoretinal cerrahiye gerektirir.

Vitreus dekolmanı

PDR' nin seyri sırasında vitreus dekolmanının gelişmesi, klinik seyrin değişmesine yol açar. Vitreusun veya fibrovasküler proliferasyonun kontraksiyonu vitreoretinal yapışıklığın yoğun olduğu bölgelerde retinanın dekole olmasına yol açar. Nadiren proliferasyonun yanında tam kat retina yırtığı gelişebilir ve yırtıklı retina dekolmanının gelişimine yol açabilir. PDR' de total vitreus dekolmanı gelişirse, PDR involusyonel evreye girer (burned-out) ve nadir de olsa mevcut NV'ların gerilemesine yol açar. Eğer makula dekole olmadan kalabilmişse, görme az da olsa korunabilir (49).

Tablo 2. Diabetik retinopatinin klinik bulguları

NONPROLİFERATİF DR	PROLİFERATİF DR	İLERİ DÖNEM DİABETİK GÖZ
<ul style="list-style-type: none">• Mikroanevrizma• Hemoraji<ul style="list-style-type: none">◦ Mum alevi◦ Noktasal• İRMA• Sert eksuda• Yumuşak eksuda• Venöz değişiklik<ul style="list-style-type: none">DilatasyonBoğumlanma• Arterial tıkanma	<ul style="list-style-type: none">• Neovaskülarizasyon• Disk (NVD)• Retina (NVE)• Fibröz Proliferasyon• Disk (FPD)• Retina (FPE)• Hemoraji• Preretinal• Vitreus içi	<ul style="list-style-type: none">• Retina dekolmanı• Rubeozis iridis• Neovasküler Glukom

2.4. MAKULA ÖDEMİ

2.4.1. Tanımlanma

2.4.1.1. Epidemiyoloji

Diabetik makula ödemi prevalansı %10'dur. Diabetin süresiyle ilişkilidir ve 20 yılda prevalans %25'e yükselmektedir. DR'nin şiddetiyle de doğrudan ilişkilidir. DR ilerledikçe makula ödemi insidansı artar (37). Erken NPDR olan olgularda en önemli görme kaybı nedeni makula ödemidir. NPDR evresindeki görme kaybının %80'inden sorumludur. Genç diabetiklerde makula ödemi tanıyı takiben ilk 9 yılda nadir olarak görülürken yaşlı diabetiklerde daha erken görülür ve daha fazla görme kaybına neden olur.

2.4.1.2. Patogenez

Makula ödemi makula bölgesindeki retina içinde ekstrasellüler alanda sıvı birikimidir. Makula ödemine katkıda bulunan birçok faktör vardır. Bunların başında iç kan retina bariyerinde bozulmaya neden olan retina kapillerlerin fonksiyonel hasarı ve nekrozu gelmektedir. Mikroanevrizmaların ve kapillerlerin anormal şekilde geçirgen retina endotel hücreleri ve intraretinal mikrovasküler anormallikler serum lipoproteinlerinin sızmasına neden olur. Vitreusun makula ödemine etkisi olduğu kabul edilmektedir. Nitekim arka vitreus dekolmanı olan olgularda makula ödemi seyrek olarak görülür. Makula ödemi fokal ve diffüz olmak üzere iki farklı tipte görülür.

2.4.1.3. Semptomlar

Görme keskinliği el hareketleri ile 10/10 arası bir düzeyde olabilir. Görme keskinliği ile ödemin şiddeti arasında her zaman bir paralellik bulunmaz (38). Makula ödemi bulunan diabetiklerde görme keskinliği spontan olarak düzelebileceği gibi gün içinde bile değişebilir. Ancak, görme keskinliğindeki dalgalanmalar kan şekeri düzeyindeki değişmelerle de ilgili olabilir.

2.4.1.4. Tanı

Direkt ve indirekt oftalmoskopi (Goldmann 3 aynalı kontakt lensi) ile yapılan muayene en hassas yöntemdir. Makulayı merkez alan 30 derecelik renkli fundus fotoğrafları ve kırmızıdan yoksun fotoğraflar tanıda kullanılabilir. FFA makula ödemi ve

tipinin belirlenmesinde faydalıdır. Makula merkezinden bir disk çapı uzaklıkta yerleşmiş retina kalınlaşması veya sert eksuda, tek başına makula ödemi tanısını koydurur. Ama FFA' da görülen sızıntıya retina kalınlaşması ve sert eksuda eşlik etmezse tek başına tanı konamaz (50).

2.4.2. Makula Ödemi Sınıflaması

2.4.2.1. Fokal Makula Ödemi

Makula merkezinden itibaren bir disk çapı uzaklıktaki bir alanda yer alan herhangi bir retina kalınlaşması ya da sert eksuda oluşumları fokal diabetik makula ödemi olarak adlandırılır. Fokal makula ödemi genellikle, mikroanevrizma ve dilate kapillerlerden oluşan sızıntılardan kaynaklanır. Bu sızıntıların sıvı komponentlerinin zamanla rezorbe olması ile içindeki lipit ve lipoprotein türevleri retinanın içi ve dış pleksiform tabakalarında birikir ve sert eksudaları oluşturur (4).

Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) tarafından klinik uygulamada fokal bir ödemin şiddet ve düzeyini belirlemek ve tedavi kriterlerini daha kolay saptamak için klinik olarak anlamlı makula ödemi (KAMÖ) tanımı teklif edilmiştir. KAMÖ için bütün tanımlanmalarda retina kalınlaşması esas alınmıştır. Buna göre fokal bir makula ödeminin KAMÖ kabul edilebilmesi için;

1. Makula merkezinde ya da merkezin 500 mikron çevresinde retina kalınlaşması,
2. Makula merkezinde ya da merkezin 500 mikron çevresinde, bitişiğindeki retinanın kalınlaşmasıyla birlikte olan sert eksudalar.
3. Herhangi bir bölümü makula merkezinden bir disk çapı uzaklıktaki bir alanda yerleşmiş, bir disk çapı büyüklükte ya da daha büyük retina kalınlaşması bölgesi olması gereklidir (50).

2.4.2.2. Diffüz Diabetik Makula Ödemi

Makula merkezini, yani foveal avasküler zonu da içine alan iki ya da daha fazla disk çapı büyüklüğündeki retina kalınlaşmaları diffüz diabetik makula ödemi olarak adlandırılır. Diffüz diabetik makula ödemi ile kontrolsüz hiperglisemi, renal yetmezlik, yüksek diastolik kan basıncı gibi bazı sistemik faktörler yakından ilişkilidir. Fizyopatolojik olarak RPE pompa fonksiyonu bozukluğu katkıda bulunabilir. Bu tip ödemde mikroanevrizmalara ek olarak retina içi mikrovasküler anormallikler de sızıntılara neden olur.

Fokal diabetik makula ödeminden farklı olarak diffüz tipte kan-retina bariyeri (KRB) büyük moleküllerin geçişine engel olduğundan sert eksuda plakları nadir olarak görülür. Ayrıca diffüz tipte makulada kistoid değişikliklerde mevcuttur. Bu tip ödemde retinanın dış pleksiform katında (Henle katı) biriken sıvının buradaki sinir liflerinin oblik gidişi nedeniyle potansiyel boşluklarda birikmesi sonucunda kistoid bir görünüm ortaya çıkabilir. Diffüz diabetik ödemi ayıran başka bir özellikte FFA'de erken fazda retina kapiller yatağın görünürlüğünün artmış olmasıdır. Anjiyografide tıkalı kapillerlerin yanı sıra bu alanlara komşu dilate kapillerler de belirginleşmiş olarak görünürler. Diffüz diabetik makula ödeminin kendiliğinden gerileme ihtimali yoktur. Diabetik makula ödeminde erken teşhis ve tedavi ile görmede iyileşme ve stabilizasyon sağlanabilir.

2.5. DİABETİK RETİNOPATİNİN PATOGENEZİ

Retina kapillerlerinde oluşan hastalığa sekonder olarak gelişen iskemik retina oluşumu, yeni damar oluşumunu teşvik edici anjiyogenik madde salınımını uyarır. Böylece iskemik retina alanının periferinden ve büyük çoğunlukla retina venüllerinden kaynaklanan neovasküler doku, retina yüzeyi ile vitreus arasına ilerler. Başlangıçta internal limitan membranın altında olan damarsal yapılar, ileri dönemlerde membranı delerek vitreus içine doğru kabarır.

Optik disk üstünde gelişen damarlar, optik disk bölgesinde internal limitan membranın olmaması yüzünden çok daha erken dönemlerde vitreusa doğru ilerler (46).

2.5.1. Kronik Hiperglisemi

Diabetik Kontrol ve Komplikasyon Çalışma Grubu'na göre, diabetin mikrovasküler komplikasyonların gelişiminde en önemli faktör hiperglisemidir. Diğer risk faktörleri içinde; insülin direnci ve hiperinsülinemi, değişmiş olan yağ asidi ve protein metabolizması, ozmotik etki, hipertansiyon, bozulmuş metabolik sempatik aktivasyon sayılabilir.

İn vivo ve in vitro çalışmalar hipergliseminin genetik ve çevresel faktörler eşliğinde biyokimyasal değişiklikleri başlattığını, oluşan metabolik yollar ve yıkım son ürünlerinin organ ve dokularda fonksiyonel hasar oluşturduğunu ortaya koymaktadır.

Kronik Hiperglisemiye Bağlı Oluşan Değişiklikler:

A) Biyokimyasal

- 1-Glikozilasyon- İlerlemiş glikozilasyon son ürünü (AGE) üretimi
- 2-Polyol (sorbitol) yolunun aktivasyonu
- 3-Protein kinaz C aktivasyonu
- 4-Oksidatif stres
- 5-Gen ekspresyonizmin değişmesi

B) Fonksiyonel

- 1- Sinirsel iletimin bozulması
- 2-Kapiller sızıntı
- 3-Büyüme faktörlerinin artışı

C) Yapısal

- 1-Matriks değişimi
- 2-İntimal proliferasyon
- 3-Endotel değişiklikleri

Kronik hipergliseminin bu sonuçlara yol açmasında glikozillenmiş son ürünlerin (advanced glycation end products-AGEs) artışı önemli rol oynar. Yüksek konsantrasyonda glukoz moleküllerinin lizin moleküllerinin epsilon amino grubuna bağlanarak "amodori ürünü" denilen bir ara ürün oluşturduktan sonra glikolize proteinler birbirleriyle çapraz bağlar yaparak "ilerlemiş glikozilasyon son ürünü" (AGEs) adı verilen yapıyı oluştururlar. Bu yapı, katıldığı metabolik olaylarda önemli değişikliklere yol açar. Oksidasyon ve glikozilasyon reaksiyonu sürdükçe inaktif metabolitler oluşamaz. Glukoz alımı insülden bağımsız olan dokularda (lens, endotel, nöron) ise ancak glukoz sorbitole dönüştürülerek enerji için kullanılabilirdiğinden polyol (sorbitol) yolunun aktivitesi artar (51).

Sorbitol yolu; aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimlerinin rol aldığı biyokimyasal bir yoldur. Hiperglisemi durumunda aldoz redüktaz, glukozu sorbitole çevirir. Sorbitol, daha sonra sorbitol dehidrogenaz yardımıyla fruktoza okside olabilir, fakat bu reaksiyon yavaş gelişen bir reaksiyondur. Bu nedenle sorbitol konsantrasyonu hücre içinde yüksek düzeylere çıkabilir (51).

Sorbitol ve galaktitolün neden olduğu hücre içi artmış olan ozmolarite, oksijen taşınmasını bozarak hücrenin yaşamsal fonksiyonlarına devam edebilmesine engel olur.

Sorbitol yolunun aktivasyonu, hiperglisemik psödohipoksi denilen ve iskeminin hücrede neden olduğu fonksiyonel ve yapısal bozukluklara benzer değişikliklere neden olur. Hücre içinde artan indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP), başta serbest oksijen radikallerinin yapım artışı olmak üzere, diabetik retinopatinin patogeneğinde sorumlu olduğu düşünülen, birbiriyle ilişkili ve karmaşık mekanizmalı pek çok yolun aktive olmasına zemin hazırlar.

Yapılan çalışmalarda, hiperglisemik durumda hücre içi sorbitol konsantrasyonu artan birçok hücrede protein kinaz C aktivitesinin arttığı ve Na-K ATPaz aktivitesinin azaldığı saptanmıştır (52). Bunun sonucu olarak da serbest oksijen radikali üretiminde artış, nitrik oksit sentezinde azalma, prostaglandin metabolizmasında bozukluk, kanın

hücresel elemanlarında fonksiyonel değişiklikler gibi diabetin mikroanjiopatik komplikasyonlarına yol açabilecek bozukluklar meydana gelmektedir.

Glikolize Hemoglobin (HbA1c)

Retinal vasküler bozukluğa neden olan faktörlerden biri de, hemoglobin yapısında meydana gelen değişikliklerdir. Normal yetişkin bir insanda bulunan hemoglobinlerin %97' si Hb-A' dır. Bunun da %3-6 kadarını minör komponentler denen HbA1c, HbA1b ve HbA1a oluşturur. Minör komponentler, hemoglobinin enzimatik olmayan glikozillenmesi ile oluşur. Glukohemoglobinin en fazla bulunan komponenti olan HbA1c, hemoglobinin 6 zincirindeki son valin aminoasidinin glikozillenmesi sonucu meydana gelir. Bu reaksiyon, ancak hiperglisemi durumunda gerçekleşir, nonenzimatik ve tek yönlüdür. Hemoglobin glikozillendikten sonra içinde bulunduğu eritrosit ile beraber ortalama 90 gün dolaşımda kalır ve son 2-3 ayı içeren dönem için hastanın hiperglisemik durumu hakkında bilgi verir.

Normal popülasyonda HbA1c seviyesi %5-6 düzeyindeyken diabetiklerde bu oran %14-20' ye kadar çıkabilmektedir. Diyet, egzersiz ve ölçüm zamanından etkilenmez. Glikohemoglobin düzeyinin diabetik hastalarda arttığı ve HbA1c' nin tanıda oral glukoz tolerans testinden daha iyi bir laboratuvar bulgusu olduğunu kabul eden araştırmacıların sayısı gün geçtikçe artmaktadır.

2.5.2. Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidan Ajanlar

Serbest radikal reaksiyonları, normal metabolik yolların işleyişinin doğal bir sonucudur. Oksidan moleküller, organizmada başlıca glukozun oksidasyonu olmak üzere tüm anabolik ve katabolik reaksiyonlar sırasında ve sonrasında sürekli bir oluşum halindedir. Bununla eş zamanlı olarak, serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bu oluşum ve etkisizleştirme olayları bir denge halindedir. Serbest radikal molekülleri, belirli bir düzeyde kaldıkları sürece organizmanın yabancı maddelere ve infeksiyöz ajanlara karşı savunmasında önemli rol oynarlar. Ancak belirli düzeyin üzerinde oluşur ve antioksidanlar

yetersiz kalırsa hücrenin yapı elemanları olan protein, lipid, nükleik asit ve bazı enzimleri bozarak zararlı etkilere neden olurlar. Biyokimyasal açıdan en önemli serbest radikaller, oksijen kökenli olanlardır.

Serbest radikaller, hücre ve dokularda birçok zararlara yol açarlar. Bu etkiler şu şekilde özetlenebilir (53): 1-DNA' nın tahrip olması, 2-Nükleotid yapılı koenzimlerin yıkımı, 3-Tiollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, 4-Protein ve lipidlerle kovalan bağlar yapması, 5-Enzim aktiviteleri ve lipid metabolizmasında değişiklikler, 6-Mukopolisakkaritlerin yıkımı, 7-Membran proteinlerinin tahribi, taşıma sistemlerinin bozulması, 8-Kollajen, elastin gibi proteinlerin yapısını bozarak, aterosklerotik değişikliklerin oluşması, 9-Lipit peroksidasyonu, membran yapı ve fonksiyonlarının değişmesi.

2.5.3. Diabet ve Oksidatif Stres

Diabette oksidatif stres pek çok mekanizmaya bağlı olarak artabilmektedir, ancak bu mekanizmaların diabetik komplikasyonlara katkısı tam olarak ispatlanmış değildir. Deneysel bulgular, artan reaktif oksijen türlerinin oluşumunun ve zayıflayan antioksidan savunmanın bu karmaşık mekanizmaların temelini oluşturduğunu göstermektedir.

Diabetes mellitusta oksidatif stresin olası kaynakları:

1-Serbest radikal üretiminin artışı

- Hiperglisemi
- Karbonhidrat, yağ ve proteinlerin otooksidasyonu

2-Antioksidan savunma sisteminde bozulma

- Antioksidan enzim sistemlerinin inaktivasyonu
- Glutatyon gibi antioksidan maddelerin konsantrasyonunun azalması

3-Enzimatik yollardaki değişiklikler

- Polyol (sorbitol) yolunun aktivasyonu
- Mitokondriyal oksidatif metabolizmada değişiklikler

- Prostaglandin, lökotrien, NO metabolizmasında değişiklikler

4-Diğer

- İskemi-reperfüzyon hasarı
- Hipoksi ve psödohipoksi

Hiperglisemide, artmış plazma serbest radikal konsantrasyonunun nedenini açıklayabilecek birbiri ile bağlantılı pek çok yol vardır. Retina, lens, nöron ve endotel hücrelerinde yüksek glukoz konsantrasyonuna maruz kalınması sonucu intrasellüler sorbitol ve fruktoz artışı (sorbitol→polyol yolu aktivasyonu) olur. Sorbitol yolunda rol alan aldoz redüktaz, hücrede NADPH kullandığı için, NADPH depolarında azalmaya neden olur ve buna bağlı olarak çalışan nitrik oksit sentetaz ve glutatyon redüktaz enzim aktivitelerini azaltır. Azalmış glutatyon redüktaz seviyesi, hidrojen peroksit tarafından hasara uğrayan endotel hücrelerinin sayısını artırır. Oksidatif stres, NO sentez ve salınımını azaltma yanında NO'un etkilerini de inaktive ederek diabetik hastalarda endotel hasarı ve bozulmuş vazodilatatör cevap mekanizmalarına neden olur (54).

Hiperglisemi, insülin aktivitesi ve sensivitesini bozar ya da azaltır. Normalde, insülin hücrelere glukoz girişim ve metabolizmasını düzenler, glikojenez ve yağ dokusunda lipolizi inhibe eder. İnsülin aktivitesinin bozulması insülin rezistansı ve hiperinsülinemiye neden olur. Hiperinsülinemiye bağlı olarak sempatik sinir sistemi aktivasyonu gerçekleşir. Diabetik hayvanlarda, katekolaminlerin metabolik hızı ve otooksidasyonu arttırarak serbest radikal ürünlerinde artışa yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca lipoliz inhibisyonunun ortadan kalkmasına bağlı serbest yağ asidi seviyesi artmakta ve bunların peroksidasyonu sırasında oksijen radikalleri açığa çıkmaktadır. Parçalanmış yağ asitleri ve toksik radikalleri, hücresel enerji dengesi ve endotelial bariyer fonksiyonlarını düzenleyen membran Na-K ATPaz gibi pompa fonksiyonlarını bozmakta, endotelde glutatyon konsantrasyonunu azaltmaktadır.

Oksidatif stresin önemli hedeflerinden biri de proteinlerdir. Reaktif oksijen radikalleri proteinlerin aminoasit dizilimlerinde modifikasyonlara neden olarak protein

karbonil formlarının oluşumuna yol açarlar. Protein karbonil seviyelerinin artışı ve bu maddelerle diabet komplikasyonlarının arasındaki ilişkiler deneysel çalışmalarla gösterilmiştir.

Protein ve lipit oksidasyonu, hastalarda DNA hasarına yol açar. Diabetik hastalarda artışı saptanan 8 hidroksi-deguanozin'in, DNA' daki oksidatif hasarın indikatörü olduğu ve mikroanjyopatik komplikasyonların gelişmesine neden olduğu çalışmalarla gösterilmiştir (55).

2.5.4. Endotel Disfonksiyonunun Rolü

2.5.4.1. Oküler Kan Akımı Artışı ve Endotel Disfonksiyonu

Diabet hastalarında retinopatinin klinik bulguları başlamadan tanımlanan retina perfüzyon anomalileri vardır. Retina kan akımında artışın kendisi de diabetik retinopati patogeneze katkıda bulunabilir. Retina perfüzyonunda artışın damar lümeninde gerilme yaparak endotel hasarın artırdığı varsayılmaktadır. Değişen retina otheregülasyonu retinanın hiperperfüzyonunu uyararak endotel hasarına katkıda bulunabilir. Sistemik hipertansiyon varlığında diabetik retinopati sıklığı ve progresyon hızında artış bu hipotezi destekler.

2.5.4.2. Nitrik Oksit ve Endotelin

NO, vasküler endotelde L-argininden sentezlenen güçlü bir vasodilatör ajandır. Bazı hayvan ve insan çalışmalarında endotel kaynaklı NO, koroidin kan dolaşımında gerekli bulunmuştur. İnvitro olarak çalışılmış birçok araştırma NO'nun retina damar tonüsünü kontrol ettiğini göstermektedir. Diabetik ratlarda yapılan çalışmada retinada artmış NOS enzim aktivitesi gözlenmiştir. Diabetik retinadaki total NO miktarının çoğunun iNOS tarafından sentezlendiği bildiriliyor. NOS inhibitörü olan aminoguanidinin ratlarda oküler kan akımında artışı tersine çevirdiği görülmüştür (56).

Endotelin-1 endotel tarafından salınır. Güçlü vazokonstrüksiyon yapan endotelin varlığı retina ve koroid dokusunda gösterilmiştir. Tip I ve tip II diabetli ve retinopatisi olan

hastalarda plazmada endotelin-1 konsantrasyonunda artış gözlenmiştir. Endotelin-1'in hiperoksiye cevap olarak vazokonstrüksiyon yaptığı ileri sürülmektedir (56).

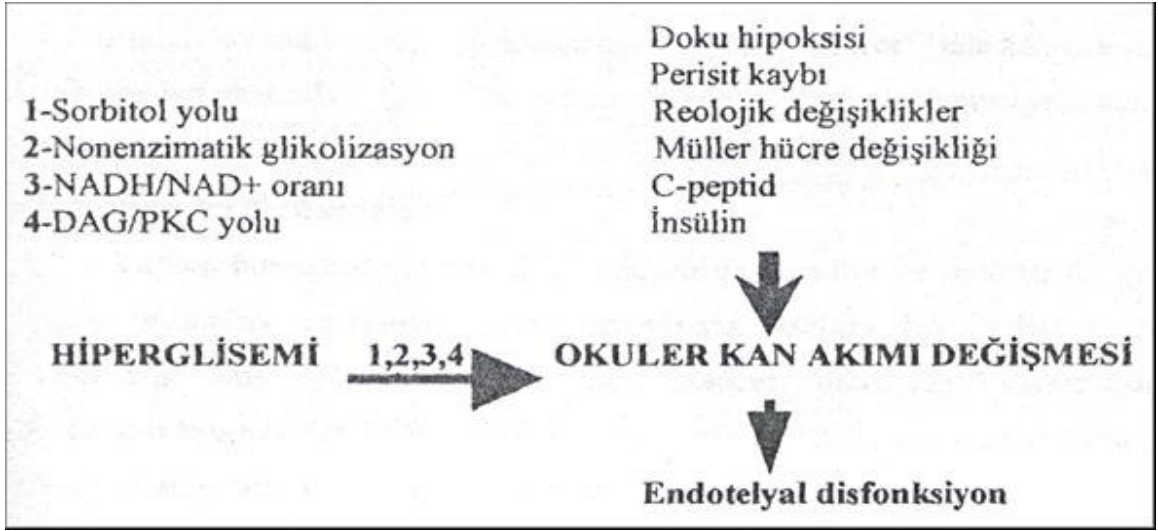
2.5.5. VEGF (Vasküler endotelial büyüme faktörü) ve Diğer Büyüme Faktörleri

Anjiogenezis kapillerlerden yeni damar büyümesidir ve vasküler hasar, tümör, lokal inflamasyon ve sitokinler ile proteolitik enzimleri açığa çıkaran proliferasyon, hücre migrasyonu ve yeni damar elementlerinin büyümesi ile başlatılabilir. Anjiogenezis vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) ve anjiotensin tarafından uyarılmakta, alfa interferon (INF α), anjiostatin ve endostatin tarafından baskılanmaktadır (3,57). VEGF, PDR nin gelişiminde önemli rolü olan bir büyüme faktörüdür ve diabette retina perfüzyon bozukluğuna katkıda bulunur. VEGF'nin retina perisit ve endotel hücrelerinde spesifik bağlanma reseptörleri bulunur. Bu reseptörlerin inhibisyonu neovaskülarizasyonu baskılar. Deneysel olarak VEGF'nin vitreus içine verilmesi retinada iskemi ve mikroanjiyopati oluşturmaktadır. Erken diabetik retinopati evresinde VEGF sentezi artmakta, fotokoagülasyon sonrası bazal düzeye geri dönmektedir (56). VEGF'den başka PDR patogenezinde rol oynayan PDGF , RPE hücre ve glial hücre göçü ve proliferasyonunu uyarak mikrovasküler yapıda anjiogenezis yapar. PDR'li hastalardan alınan vitreus örneklerinde VEGF düzeyi kadar PDGF düzeyi de yükselmiş olarak bulunmaktadır. PDR' de VEGF yanı sıra IGF-I miktarı da vitreusta artmış olarak bulunmuştur. Her iki faktöründe kaynağı iskemik retina olarak kabul edilmektedir, ancak kan retina bariyerinin bozulmasından dolayı bu faktörlerin serumdan geldiğini kanıtlar bulgular mevcut değildir. Yapılan çalışmalar sonucu VEGF ve IGF-1'in gözden kaynaklandığı gösterilmiştir. Ancak bu iki faktör arasında nasıl bir ilişki olduğu bilinmemektedir (58).

2.5.6. Büyüme Hormonu (GH)

Proliferatif diabetik retinopatinin patogenezinde büyüme GH' un rolü bilinmektedir. Alzaid ve ark, diabetli ve GH eksikliği olan hastalarda proliferatif retinopatinin sıklığını %12, kontrol grubunda ise proliferatif retinopati sıklığını %62.5 olarak görmüşlerdir (3).

Akromegali ve diabeti olan hastalarda prospektif olarak proliferatif retinopati sıklığında artış olmadığı görülmüştür. Bütün bunlara dayanarak GH'un retinopatinin oluşmasında gerekli olduğu ancak kendisinin etken faktör olmadığı kabul edilmiştir. Diabetiklerde ve sağlıklı insanda, serum bazal GH, ILGFBP-3 (insülin benzeri büyüme faktörü bağlayan protein-3), IGF-1 düzeyleri ölçülmüş, PDR'li hastalarda IGF-1, ILGFBP-3 düzeyleri anlamlı olarak artmış bulunmuştur. PDR'li hastalarda IGF-1 lokal olarak üretildiğinden dolayı bu parametreler PDR patogenezinde rol oynayabilirler (59). Şekil 3'de diabetik retinopati patofizyolojisi özetlenmiştir.



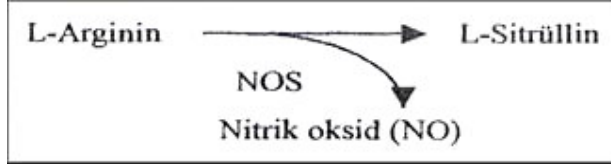
Şekil 3. Diabetik retinopati patogenezi

2.6. NİTRİK OKSİT

NO fiziksel olarak gaz yapıda bulunan, çoğu hücrede enzimatik olarak sentezlenen, hücre içinde plazma membran proteinlerini aktive ederek sekonder haberci olarak davranan, hücreler arasında bilgi taşıyan ve parakrin etki gösteren mediatördür. Etkisi sonucu vasküler tonüs değişmesi, nörotransmisyon, immün sitotoksitate ve birçok biyolojik ve biyokimyasal olay gerçekleşir. NO'in gözde fizyolojik ve patofizyolojik rolü olduğunu gösteren veriler mevcuttur. NO sentezinin inhibe edilmesi ve NO donörlerinin oftalmolojide tedavi edici etkileri olabileceğinden bahsedilmektedir (7,60).

2.6.1. Nitrik Oksit Sentezi

NO, L-argininin L-sitrülline dönüşmesi sırasında ortaya çıkar. Bu enzimatik yolu nitrik oksit sentaz (NOS) kontrol eder. Diğer nörotransmitterler gibi NO konvansiyonel regülatör mekanizmalarla salgılanmaz ve depolanmaz, bu nedenle NO biyosentezinin kontrolü önem taşımaktadır (61).



Şekil 4. Nitrik oksidin enzimatik olarak sentezlenmesi.

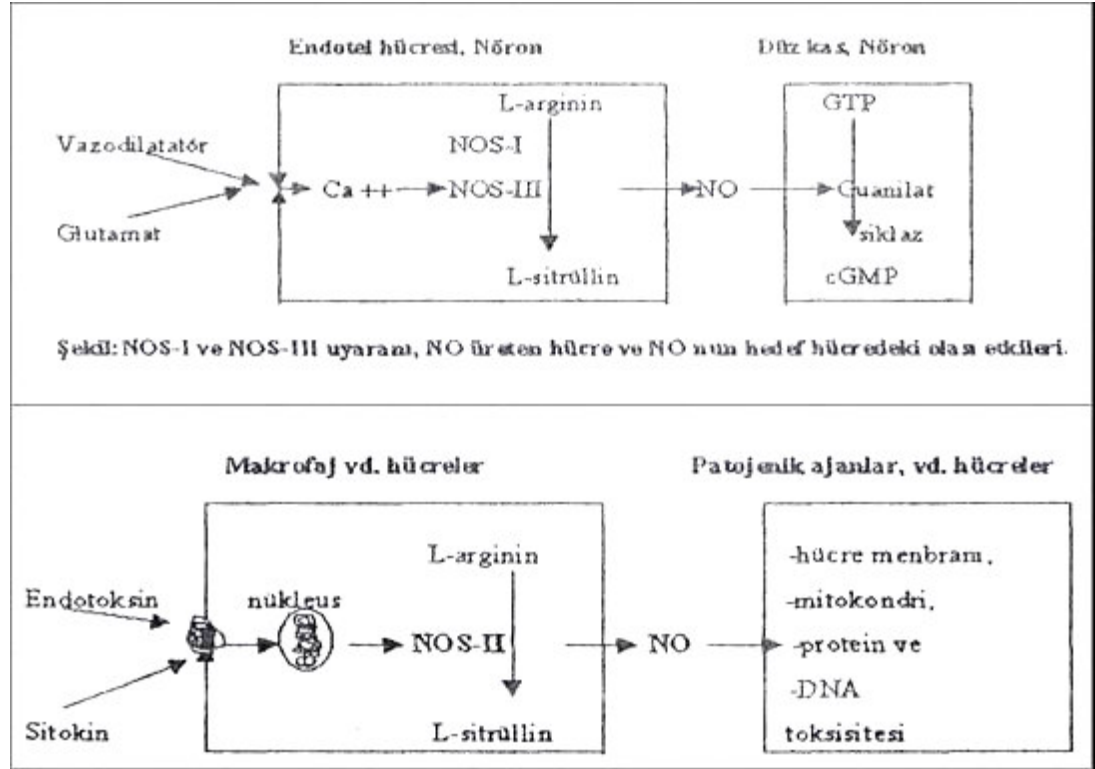
NO sentezi yapan üç tür NOS izoenzimi vardır. İki NOS izoenzimi dokularda devamlı olarak bulunmakta ve yapısal (konstitütif) NOS olarak adlandırılmaktadır. İlk NOS izoenzimi NOS-I adını alır, temel olarak periferik ve santral sinir sisteminin bazı nöronlarında bulunur; bu nedenle nöronal NOS (nNOS) olarak ta adlandırılır. İkinci NOS izoenzimi NOS-III adını almakta ve temel olarak vasküler endotelde bulunmaktadır; bu nedenle endotelial-NOS (eNOS) olarak ta adlandırılır. Nitrik oksidin az bir kısmı bu iki NOS izoenzimi tarafından oluşturulur ve biyolojik ortamda çok kısa bir sürede yıkılır. Üçüncü izoenzim olan NOS-II, immünolojik ya da bir uyarı sonucu spesifik olmayarak birçok hücreden sentezlenebilir; bu nedenle uyarılabilir (inducible) NOS (iNOS) adını alır. iNOS kalsiyuma bağımsız bir şekilde etki eder, iNOS ile oluşan NO'nun biyolojik ortamlardaki yarı ömrü daha uzundur. Biyolojik ortamlarda sentezlenen total NO miktarının büyük kısmı da iNOS izoenzimi tarafından açığa çıkmaktadır (60-62).

N-mono-metil-L-arginin (L-NMMA), N-nitro-L-argininmetil ester (L-NAME) ve N-nitro-L-arginin (L-NA), gibi bazı L-arginin analogları NO sentezini inhibe eder. Son zamanlarda NOS inhibitörü olarak tanımlanmış, farklı etki mekanizmaları ile NO sentezini inhibe eden aminoguanidin, nitroindazol, izothioüre gibi nonaminokaid ajanlar ve thiositrüllin, N-iminoetil-lisin gibi ajanlar tanımlanmıştır.

Gözde NO sentez yolları araştırılmış ve NOS-I, II, III izoenzimleri gösterilmiştir. İmmünoreaktif yöntem olan NADPH-diaforaz boyaması NOS lokalizasyonu ve izotiplerini tanımlamada en uygun yöntem olmaktadır. Son zamanlarda revers transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile NOS-I, NOS-II ve NOS-III mRNA lokalizasyonu daha spesifik olarak tespit edilmiştir (62).

2.6.2. Nitrik Oksidin Biyokimyasal Etkisi

Biyojik sistemlerde NO oksijen, superoksit anyon ve geçiş metalleri ile reaksiyona girerek nitrit ve nitrat, peroksinitrit (ONOO⁻) ve metal-nitrik oksit bileşiği oluşur. Nitrik oksit, tiol grubu ile reaksiyona girerek nitröz (NO⁺) ürüne dönüşebilir (63).



Şekil 5. NOS-II ve III'nin uyarımı, NO üreten hücre ve NO'nun hedef hücredeki olası etkileri

NO'nun fizyolojik miktarı NOS-I ve NOS-III izoformları ile ortaya çıkar, bu fizyolojik konsantrasyon nöral sistemde ve kardiovasküler sistemde sinyal iletiliminde görev alır. Buna rağmen NOS-II ile oluşan NO sitotoksik/sitostatik etkiye katkıda bulunur. NO'nun nörotransmisyon, vasodilatasyon gibi etkileri guanilat siklaz ve sonradan miktarı artan cGMP üzerinden gerçekleşir. NO ile hemoglobin, siklooksijenaz, sitokrom p450 gibi diğer demir içeren proteinlerle olan etkileşimi bilinmektedir. NO yapısında geçiş metali içeren proteinleri etkiler, sitrik asit siklüs enzim akonitaz, kompleks I (NADH-ubiquinon) ve kompleks II (suksinat-ubiquinon oksidoredüktaz) gibi mitokondriyal elektron taşıma zincirindeki enzimleri etkileyerek mitokondrial solunumu baskılar (60). NO'in, DNA sentezi ve tamirinde hız kısıtlayıcı bir enzim olan ribonikleotid-redüktazı baskıladığı gösterilmiştir. Bazı durumlarda NO, proteinlerin serbest sistein (SH) grupları ile reaksiyona girerek bu proteinleri inaktif moleküllere dönüştürmektedir. NO'nun superoksit anyonu (O₂⁻) ile reaksiyonu sonucunda oksidatif hasarda önemli rolü olan peroksinitrit (ONOO⁻) meydana gelir. NO, (ADP-riboz) polimeraz enzimini uyararak DNA hasarı gelişir, hücre nükleusunda artan NAD⁺ baskısı ile hücre ölümü gerçekleşir (63). Tablo 3'te NO'in etkilediği biyokimyasal moleküller ve etkileri gösterilmiştir.

2.6.3. Gözde Nitrik Oksit Sentaz Izoenzimlerinin Lokalizasyonu

2.6.3.1. Yapısal NOS (NOS-I ve NOS-III)

NOS aktivitesi retinada ve izole edilmiş rod dış segmentinde gösterilmiştir. NOS-I izoenziminin amakrin hücrelerde, retinanın iç nükleer tabakasında ve fotoreseptörlerde varlığı gösterilmiştir. NOS-III izoenzimi, NADPH-diaforaz boyama yöntemi ile ön segment vasküler endoteli, koroid ve retinada tespit edilmiştir. Siliyer kas, trabeküler ağ ve Schlemm kanalında NOS-III için fazla miktarda NADPH-diaforaz boyanması tespit edilmiştir (64). Tablo 4 ve 5'te gözde NOS izoenzimlerinin lokalizasyonu ve etkileri gösterilmiştir.

2.6.3.2. İndüklenebilir NOS (iNOS veya NOS-II)

Retinada, retina Müller hücreleri endotoksin ve sitokin uyarısından sonra NOS-II izoenzimi açığa çıkar. İnsanda, sığırdada ve sığırdada retina pigment epitelinde NOS-II bulunmuştur. İnsan RPE hücrelerinde interferon-gamma ve interlökin-1-beta (IL-1-β) uyarısı NOS-II üretimi için şarttır. Son zamanlarda in vitro ortamda sitokin verildikten sonra NOS-II retina perisitlerinde ve kapiller endotel hücrelerinde tespit edilmiştir (64).

Tablo 3. Nitrik oksidin hedef molekülleri ve etkileri

Hedef	Oluşan Etki
Heme içeren proteinler	Guanilat siklaz aktivasyonu Siklooksijenaz aktivasyonu ve inhibisyonu Hemoglobin inhibisyonu
SH grupları geçiş metali içeren proteinler	GAPDH inhibisyonu (*) NADH-ubiquinone oksidoredüktaz inhibisyonu NADH-süksinat oksidoredüktaz inhibisyonu (**) Cis-akonitaz inhibisyonu
Tiosil radikali içeren proteinler	Ribonükleotid redüktaz inhibisyonu
DNA	Deaminasyon
Oksijen	Nitrit ve nitrat oluşumu
Süperoksit anyonu	Peroksinitrit oluşumu

*GAPDH= Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz,

**NADH= Redükte nikotin amid dinükleotid

Sitokinler ve büyüme faktörleri NOS-II enziminin regülasyonunda önemli rol oynarlar. Fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β) hücrelerden NO üretiminin kontrolünde ters etki gösterir. Sığır RPE hücrelerinde FGF-1 ve FGF-2, transkripsiyonel düzeyde NOS uyarısını inhibe ederken, insan ve rat RPE hücresi ve rat Müller hücresinde FGF NOS-II uyarısını inhibe etmez. İnsan RPE hücresi, rat RPE ve Müller hücresinde NO oluşumunu inhibe eden TGF- β , NOS-II uyarısında immünoşüpresör ajan olarak rol oynar. NOS-II, retina kapiller endotel hücrelerinde ve perisitlerde, Müller hücrelerinde ve RPE hücrelerinde immünohistokimyasal olarak lokalize edilmiştir (62).

Tablo 4. Gözde NOS-I ve NOS-III lokalizasyonu ve bu izoenzimlerle oluşan NO'nun etkileri

Doku	Fonksiyon
Kornea	Bilinmiyor
Konjonktiva	vazodilatasyon vasküler permeabilite artışı
Lens epiteli	Bilinmiyor
Siliyer ve retina vasküler endoteli	Vazodilatasyon
Siliyer cisim, trabeküler ağ	Göz içi basıncı regülasyonu
Nöral retina	
Amakrin hücreler	Nörotransmisyon
Horizontal hücreler	Nörotransmisyon
Fotoreseptörler	Nörotransmisyon

2.6.4. Nitrik Oksidin Fizyolojik ve Patolojik Durumlardaki Rolü

2.6.4.1. Nitrik Oksit ve Ön Segmentteki Rolü

Nitrik oksidin lens ve korneadaki etkileri bilinmemektedir. NO'in konjonktivitlerde muhtemelen vazodilatasyon, kan akımı artışı ve ödem oluşumu üzerine etkili olduğu sanılmaktadır.

Gözde nitrovazodilatatörler ve nitrik oksit dönerlerinin siliyer kas, trabeküler ağ ve aköz drenaj sistemindeki endotel ve vasküler düz kas hücrelerinde çok yönlü etkileri olduğu öne sürülmüştür. Siliyer prosesler ve aköz çıkış yolu ve pterigopalatin gangliondan gelen bazı sinir liflerinde NOS-I izoenzimi gösterilmiştir. Ayrıca, siliyer kas (özellikle ön longitudinal kısım) ve aköz çıkış yolunda (trabeküler ağ, Schlemm kanalı ve toplayıcı kanallarda) fazla miktarda NOS-III izoenzimi bulunmuştur. Açık açılı glokomlu hastalarda trabekülum ve Schlemm kanalında NADPH-diaforaz boyanmasında azalma ve NADPH-diaforaz boyanmasında dağılım bozukluğu görülmüştür. Glokomda artmış göz içi basıncı longitudinal silyer kas liflerinde azalma veya kaybolma yapabilir. Bu kas liflerinin kasılması aköz çıkış yolunda direnci azaltarak göz içi basıncı düşmesine neden olabilir (65).

2.6.4.2. Nitrik Oksit ve Üveit

Endotoksin uyarılı üveit insanda oküler inflamasyonların bazı tipleri için model olarak kullanılabilir. Tavşanlara intravitreal lipopolisakkarid enjeksiyonu, farelere sistemik olarak lipopolisakkarid enjeksiyonu korioretina ve ön segmenti tutan inflamasyon tablosu meydana getirir. İnsanlarda, sitokinler iris damarlarında dilatasyon, aköz humör içine serum sızıntısı, aköz hümanın ve uveal dokunun lökositlerle infiltrasyonu ile karakterize endotoksin uyarılı üveit tablosunun gelişmesine katkıda bulunur. Parks ve ark (66), son zamanlarda NOS inhibitörü olarak kullanılan L-NAME'nin (N-nitro-L-arginin metil ester) tekrarlayan periton içi enjeksiyonları sonucu lipopolisakkarid uyarılı üveit tablosunda azalma kaydetmişler ve NO'nun endotoksin uyarılı üveit tablosunda proinflamatuvar mediatör olarak rol aldığını kabul etmişlerdir. Ayrıca, endotoksin uyarılı üveit tablosunda

artan hemodinamik ve permeabilite değişikliğinin artmış NO etkisinden olabileceği kabul edilmektedir.

Tablo 5: Gözde NOS-II enziminin gözde lokalizasyonu, bazı hastalıklarla ilişkisi ve etkisi

Doku ya da Hücre	Hastalık	Etki
İris ve silyer cisim	üveit (in vivo)	proinflamatuvar ? sitotoksisite
Nöral retina	üveitis (invivo) fotik dejenerasyon (invivo) CMV-retiniti (invivo)	proinflamatuvar ? sitotoksisite sitotoksisite/antiviral ? proinflamatuvar?
Retina Müller hücreleri	endotoksin ve sitokin uyarısı invitro	proinflamatuvar ? immün modulasyon ?
Retina pigment epitelini	endotoksin ve sitokin uyarısı in vitro	Antifagositik aktivite antiproliferatif proinflamatuvar ? immün modulasyon ?
Perisit, endotel hücreleri	endotoksin ve sitokin uyarısı in vitro	vazodilatasyon, kan akımı kontrolü

Lipopolisakkaridin tekrarlayan enjeksiyonları sonucu hayvanlarda vitreus ve aköz hümörde nitrit miktarında artış kalsiyumdan bağımsız NOS aktivitesinde artışa bağlanmıştır. Son olarak endotoksin uyarılı üveit oluşturulmuş hayvan modelinde polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile retina ve siliyer cisimde NOS-II izoenzim ekspresyonu artışı kaydedilmiştir. Bu modelde in situ hibridizasyon yöntemi ile retinada ve ön segmentteki NO kaynağının iris-siliyer cisim epitelini, bu dokuları infiltre eden hücreler (makrofaj, PNL) olduğu görülmüştür. Özellikle NOS-II, endotoksin uyarılı üveit tablosunun gelişmesine katkıda bulunmaktadır. Oluşan NO proinflamatuvar ya da sitotoksik etki ile dokularda harabiyetin gelişmesine yardım edebilir (60-67).

2.6.4.3. Nitrik Oksit ve Retina

NOS, sinirlerde pre ve post sinaptik olarak bulunur. Retinada farklı çalışmalara göre NO'nun nöronal iletimde (nörotransmisyon), horizontal hücrelerde elektriksel eşleşme, bipolar hücrelerde cGMP aktivasyonu ve ganglion hücrelerinde cGMP aracılı iletimin kontrolünde görev aldığı gösterilmiştir. Işığın nöral sinyallere dönüştürme işlemi olan fototransdüksiyonda, NO fotoreseptörlerdeki bazı iyon kanallarında ileti değişikliği yaparak görsel işleme katkıda bulunur (61,67).

Retina iskemisinde NO'nun patogeneze olan katkıları tartışmalıdır. Yeni araştırmalar NO'nun iskemik hasar mekanizmasında etkilenen önemli bir ajan olduğunu, serbest radikal üretilmesi ile nöronal hücre ölümünü kolaylaştırdığını ve N-metil-D-aspartat-reseptör aracılı toksisiteye neden olduğunu bildirmektedirler. Retina iskemik dönem esnasında hasar görür, ancak iskemiden sonra paradoksal olarak serbest oksijen radikalleri oluşabilir. İskemiden sonra retinada süperoksit anyon varlığı bunun kanıtıdır, oluşan serbest radikaller NO ile birleşip peroksinitrit oluşturabilir. Bu nedenle farklı serbest radikallerin kombinasyonu retinada iskemi sonrası reperfüzyonda hücelere toksik etki gösterebilir. Bununla birlikte NO, iskemi esnasında veya iskemiden hemen sonra kan akımını düzeltmeye, hasarlı doku miktarını azaltmaya çalışmaktadır (63).

2.6.4.4. Vitreoretinal Proliferasyon ve Nitrik Oksit

İn vitro ortamda NO'nun RPE hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Nitrik oksit donörlerinin verilmesiyle veya lipopolisakkarid ve sitokin uyarısı ile endojen olarak NO elde edilmektedir. Proliferatif retinal hastalıklarda RPE hücre proliferasyonu ile birlikte olan retina patolojilerinde NO'nun rolü olabileceği, hatta NO'nun hücre büyümesini kontrol edebileceği bildirilmiştir. Proliferatif vitreoretinopati (PVR) hastalardan elde edilen vitreus örneklerindeki NO düzeyi ile hastalık arasındaki ilişkinin, PVR patolojisinin (enflamasyon, hücre proliferasyonu) anlaşılmasında önemli olabileceği vurgulanmaktadır.

Retinada NO'nun primer kaynağının Müller hücreleri veya RPE hücreleri veya gözü infiltre eden makrofajlar olup olmadığı bilinmemektedir. NO, oksijen türevleri ile

birleşebilen serbest radikalleri etkileyebilir ve yüksek sitotoksitesi olan peroksinitrit anyonu oluşturur. RPE ve nöroretinayı etkileyen metabolik hastalıklardan sonra ışık algılaması, karanlık adaptasyonu, kontrast duyarlılık ve renk görme patogenezinde NO rol oynayabilir (63,68).

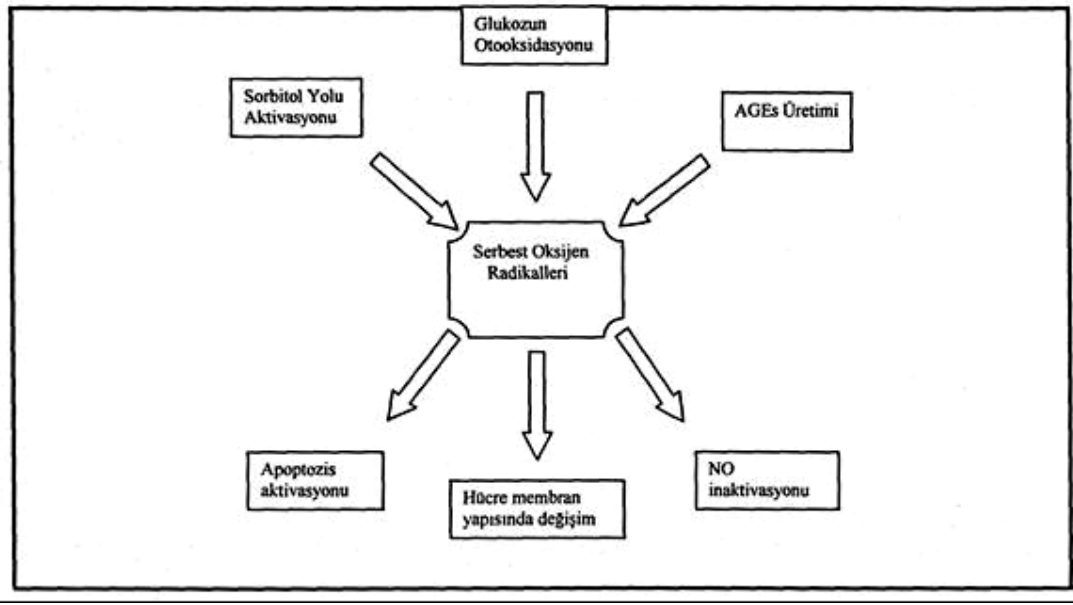
2.6.4.5. Fototoksisite ve Nitrik Oksitin Rolü

İnvivo ortamda endojen NO üretimi veya ekzojen NO verilmesi RPE fagositoz aktivitesini azaltır. Retinada NO'nun fazla miktarda üretimi rod dış segment membranında debris oluşumuna neden olmaktadır. Fotoreseptörlerle RPE hücreleri arasında bu debrisin birikimi fotoreseptör dejenerasyonu ile sonuçlanmaktadır (68). Işık aracılığı ile oluşan serbest oksijen radikalleri retina fotik hasarında mediatör olarak rol oynayabilir. Serbest radikal savunucuların koruyucu etkileri olduğu ortaya konmuştur. Işıkla oluşan fotoreseptör dejenerasyonunda NO'in etkisi olabileceği ileri sürülmektedir. NOS inhibitörü ajanların hayvanlarda sistemik olarak kullanılması fotoreseptör tabaka ve nükleer tabaka kalınlığında azalmayı durdurmaktadır.

2.7. Nitrik Oksitin Gen haritasındaki Lokusu : 7q36

Nitrik oksit, endotel kaynaklı gevşeme faktörünün (endothelium-derived relaxing factor, EDRF) biyolojik aktivesinden sorumludur (69,70). EDRF, düz kas salınımını ve trombosit birikimini engelleyerek, vazomotor tonüsün ve kan akışının düzenlenmesinde önemlidir. Janssens ve ark., insan vasküler nitrik oksit sentazı kodlayan bir cDNA izole etti. Translasyonu bitmiş bu insan proteini 1294 amino asit uzunluğundaydı ve beyindeki NOS ile, aminoasit sekansının %52'si ortaktı (71). eNOS geni, 21 kilobazlık bir genomik DNA'ya yayılıp, 26 eksondan oluşmakta ve 4052 nükleotidlik bir mRNA' yı kodlamaktadır. NO'in pek çok sistemdeki önemli fizyolojik düzenleyici fonksiyonu göz önüne alınarak Science dergisi tarafından 1992'de 'yılın molekülü' seçilmiştir (72). İnsanlarda, 3 farklı NOS izoenzimini kodlayan 3 farklı genin varlığı tanımlanmıştır; nNOS izoformunu kodlayan gen 12. kromozomda, iNOS'u kodlayan gen 17. kromozomda ve eNOS'u kodlayan gen 7. kromozomda tespit edilmiştir (73). Endotel hücre kültürlerinde eNOS

aktivitesi protein kinaz C (PKC) tarafından düzenlenmektedir. PKC nin aktivasyonu NO salınımının azalmasına neden olurken, PKC inhibisyonu eNOS aktivitesini arttırır (74). Yarı ömrü birkaç saniye kadar kısa olan NO, biyolojik membranlardan kolayca diffüze olabilir. Son yörüngesindeki eşleşmemiş elektron sayesinde ortamda bulunan diğer serbest radikallerle çok kısa süre içinde reaksiyona girebilir (72).



Şekil 6. Diabette serbest oksijen radikalleri oluşumunun nedenleri ve sonuçları

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Eylül 2005 ve Mayıs 2006 tarihleri arasında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı polikliniğinde muayene olan tip II DM' lu 107 olguda yapıldı. Çalışma için Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun onayı alındı. Olguların 54'ü kadın (%50,5), 53'ü erkekti (%49,5). Yaşları 34 ile 82 yıl arasında değişmekteydi. Kontrol grubu ise normal göz muayenesi için polikliniğimize başvuran, göz hastalığı ve diyabeti olmayan; yaşları 41 ile 72 yıl arasında değişen 25'i erkek 20'si kadın olmak üzere toplam 45 sağlıklı olgudan oluşturuldu.

Olgular tam bir oftalmolojik muayeneden geçirildiler. Snellen eşeli kullanılarak tashihli ve tashihsiz görme keskinlikleri tespit edildi. Goldmann applanasyon tonometresi ile göziçi basınçları ölçüldü.

Olguların ön segment muayeneleri biyomikroskopla yapıldı. Siklopentolat %1 damlatılarak pupil dilatasyonu sağlandı. Direkt oftalmoskopiye takiben Goldmann üç aynalı kontakt lensi ile ayrıntılı fundus muayenesi yapıldı. Renkli fundus fotoğrafı ve fundus fluoresein anjiografisi çekildi (Topcon ImageNet, Japonya).

Olgular, diabetik retinopati tipleri açısından 3 gruba ayrıldı. Birinci grup, retinopatisi olmayan 36 hastayı; ikinci grup, nonproliferatif diabetik retinopatili 41 hastayı ve üçüncü grup proliferatif diabetik retinopatili 30 hastayı kapsayacak şekilde oluşturuldu.

Airlie House sınıflandırmasının modifiye şekli gözden geçirilerek, diabetik retinopatinin varlığının ve şiddetinin belirlenmesinde, kapiller kayıp ve dilatasyon, arter anormallikleri, retina ve makuler alanda ödem ve hemorajiler, sert ve yumuşak eksudaların varlığı, makulada kistoid değişiklikler, retinal hemorajiler, diskte ve/veya disk harici retina alanlarında neovaskularizasyon varlığı, retina önünde ya da vitreus içinde fibroproliferatif materyalin bulunması dikkate alındı. Nonproliferatif ve proliferatif evredeki hastalar ayrıca diabetik makula ödemi varlığına göre A ve B grubu olarak ikiye bölündüler.

Yukarıdaki sınıflama kriteri dikkate alınarak hastalar aşağıdaki gruplara bölündü:

Grup 1: Hiçbir patolojik fundus değişikliği bulunmayan 36 hasta, diabetik retinopati olmayan gruba dahil edildi.

Grup 2A: Mikroanevrizma, mikrohemoraji, sert ve/veya yumuşak eksuda, arteryel ve venöz deformasyon görülen ancak yeni damar oluşumu, fibrovasküler proliferasyon, vitreus hemorajisi, proliferatif vitreoretinopati bulunmayan 19 hasta nonproliferatif diabetik retinopati grubuna alındı.

Grup 2B: Grup 2A kriterleri beraberinde diabetik makula ödemi saptanan 22 hasta bu gruba alındı.

Grup 3A: Özellikle yeni damar oluşumu ve proliferatif vitreoretinopati görülen 10 hasta, proliferatif diabetik retinopati grubuna dahil edildi.

Grup 3B: Grup 3A kriterleri beraberinde diabetik makula ödemi saptanan 20 hasta bu gruba dahil edildi.

Grup 4: Tip II diabetes mellitus dahil herhangi bir sistemik hastalık tanısı olmayan 45 sağlıklı birey kontrol grubu olarak bu gruba dahil edildi.

Diabetik retinopati her iki gözde ayrı ayrı evrelendirilmiş olgularda DR evresi, retinopati ağır olan gözdeki evre olarak kabul edildi.

Hastalardan gen polimorfizminin çalışılması için kan örnekleri alınmadan önce tüm hastalar bilgilendirilerek imzalı onamları alındı.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

- 1- Tip II DM tanısı dışında hiçbir sistemik patolojisi olmayanlar
- 2- Göz içi basıncı 11-21 mmHg arasında olanlar
- 3- Glokom anamnezi olmayan ya da glokom tiplerinden herhangi birisinin saptanmadığı olgular
- 4- Fundusun görüntülenmesini engelleyecek ortam opasitesi olmayanlar (nefelyon, lökom, katarakt vb.)
- 5- Fakik olan olgular

6- Diabetik retinopati dışında retina patolojisi olmayanlar (yaşa bağlı makula dejenerasyonu, retinitis pigmentoza, retinal skar, dejeneratif miyopi vb)

eNOS Nokta Mutasyonunun Değerlendirilmesi

DNA izolasyonu 2 cclik EDTAlı tam kan tüpü örneklerinden (Roche,İsviçre) High Pure PCR Emplate Kiti kullanılarak yapıldı. Kullanılan PCR karışımının içeriği aşağıdaki gibiydi: dd H₂O→12,4 µl, Mg Cl₂→0,8 µl, Hybridizasyon→2 µl, (dNTP, Taq Polimeraz vb.), Primer Forward (NOSF (5'-CACTCCCCACAGCTCTGCAT-3')→1µl, Primer Reverse (NOSR (5'-CAATCCCTTTGGTGCTCACG-3')→1 µl, Anchor probes (5'-CCTTCTGCCCCCGAGCTGGTCC-3')→0,4 µl, Detection probes (5'- CCCCAGATGATCCCCCAGAACTC- 3')→0,4 µl

Analiz LightCycler 2.0 (Roche Diagnostik, İsviçre) cihazıyla gerçekleştirildi. G894T polimorfizmi e-NOS için PCR kullanılarak tespit edildi. Yüksek hızda genotipleme metodu kullanıldı. Bu sistem sayesinde mikrovölümdeki ampliconlardan florimetrik ölçümler real-time (gerçek zamanlı) olarak gözlemlenebildi. Bu teknoloji ampliconlara spesifik oligonikleotid problemlerin hibridizasyonunu temel alır. İşaretlenmiş dizayn edilmiş problemler floresan rezonans enerji transferi (FRET) yaparak ışımaya yaparlar ve bu ışımada (Lightcycler) kullanılan brom silikat kapiller ve havanın ısıtılması ile çalışmaktadır. Dizayn edilen işaretli problemler işaretlenmemiş iki primerin arasındadır. "Detection probes" (Sensor probes) nadir alel dizisine spesifiktir. 3' ucundan fluorescein (FLU) boyayla işaretlidir. Diğer "anchor probes" ise 5' ucundan Lightcycler kırmızı floresan boyası olan (LC-640) ile işaretlidir. Cihaz LED yardımıyla 470 nm' de ışık yaymaktadır. FLU 530 nm' de, LC-RED 640 boyası da 640 nm' de ışımaya vermekte ve böylece bu ışımalarındaki cihazın spesifik 6 kanalından ikisinden tespit edilmektedir.

Kullanılan Fast Start DNA hybridization probe kiti (Roche,İsviçre) Taq polimeraz enzimi fast start yani oda sıcaklığında aktive olmamakta 95 C° de aktive olmaktadır. Bu sayede non-spesifik bağlanmalar engellenmektedir.

Protokol 95 C° 30s DENATURASYON (Fast start için) I. Aşama
AMPLİFİKASYON II. Aşama

95 C° 0s → Denaturasyon

62 C° 10s → Bağlanma (Primerlerin bağlanması)

72 C° 12s → Uzama

Bu işlemler 20 C°/saniye hızla gerçekleşmektedir.

95 C° 0s

52 C° 30s MELTING CURVE (Pik oluşan safha) III. Aşama

75 C° 1s

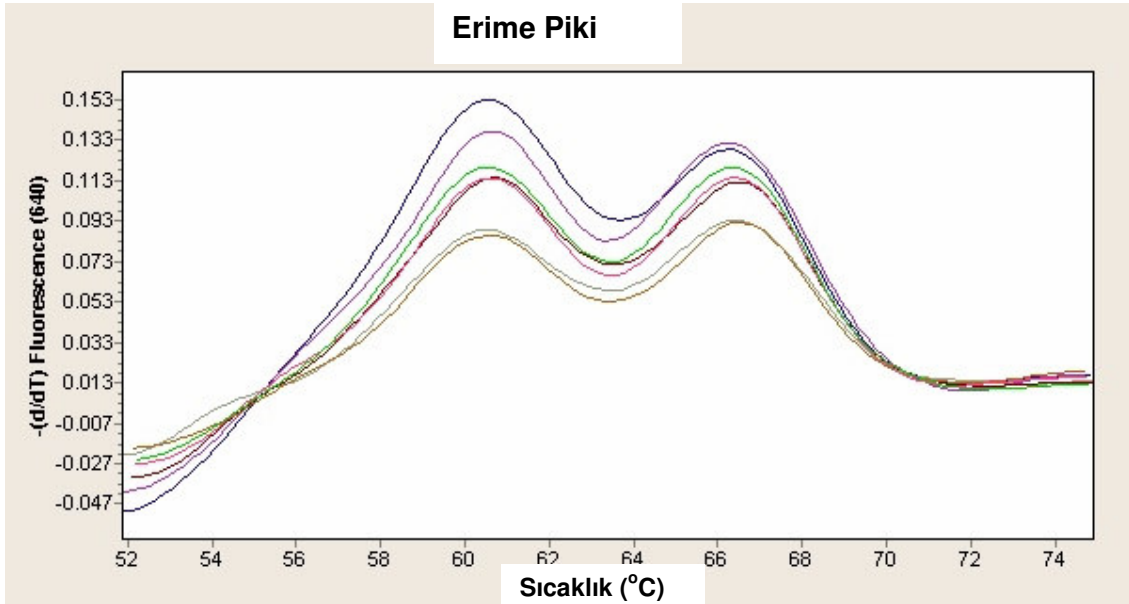
40 C° 3 dakika COOLING IV. Aşama

Erime piki (kırılmanın gerçekleştiği nokta)

GG 60,5°C

GT 60,5 – 65,5°C (iki pik)

TT 65,5°C



Şekil 7. Heterozigot GT aleline ait erime piki (DNA dizinindeki kırılmaya bağlı olarak iki sıcaklık noktasında verilen ışımaya pikleri).

Çalışmada aşağıdaki parametreler de saptanarak istatistiksel analizde değerlendirildi:

a) Cinsiyet: Olgular kadın ve erkek olarak iki gruba ayrıldı

b) Yaş

c) DM süresi: Diabet tanısının konduğu tarihten itibaren geçen süre olarak alındı.

d) Tedavi şekli: Diyet, oral antidiabetik ilaç (OAD) ve insülin kullanımı dikkate alındı

e) Açlık kan şekeri (AKŞ) : Olguların AKŞ seviyeleri 12 saatlik açlık periyodundan sonra antekubital venlerinden alınan 5 ml kan örneklerinden Synchron LX20 cihazında glukoz oksidaz yöntemiyle ölçüldü.

f) HbA1c seviyesi: Olguların HbA1c seviyeleri antekubital venlerinden alınan 5 ml'lik kanların BIORAD D10 cihazında HPLC metoduyla çalışılmasıyla elde edildi.

g) Kan basıncı: Olguların arteriyel kan basıncı istirahat halindeyken oturur pozisyonda üç defa ölçüldü ve ölçümlerin aritmetik ortalamaları alınarak sistolik ve diyastolik kan basınçları sonuçları kaydedildi.

h) Vücut kütle indeksi (VKİ): Vücut ağırlığının kilogram cinsinden büyüklüğünün, boy uzunluğunun metre biriminin karesine bölünmesiyle elde edildi.

ı) Hemoglobin (Hb) ve hematokrit (Htc) miktarı: Olguların kan Hb ve Htc düzeyleri antekubital venlerinden alınan 5 ml kanın Gen-S cihazında laser flow cell metodu ile tespit edildi.

i) Serum lipit düzeyleri: Olguların serum HDL, LDL ve VLDL kolesterolü ile trigliserit (TG) düzeyleri 12 saatlik açlık periyodundan sonra antekubital venlerinden alınan 5 cc'lik kanların Synchron LX 20 cihazında enzimatik analizi ile ölçüldü.

j) Serum Na, K, Cl, Ca düzeyleri olguların 12 saatlik açlık periyodundan sonra alınan kan örneklerinin Synchron LX20 cihazında ISE yöntemiyle çalışılmasıyla ölçüldü.

k) Fruktozamin düzeyi: Olguların antekubital venlerinden alınan 5 ml kan örneklerinden Synchron LX20 cihazında kalorimetrik yöntemle çalışıldı.

l) Sigara kullanımı

İstatistiksel değerlendirme

İstatistiksel analiz için SPSS 11.0 programı kullanıldı. Gruplar arasında genotip farklılıkları X^2 (ki kare) testi ile analiz edildi. Gruplar arasında biyokimyasal farklılıklar posthoc düzeltmeli varyans analizi (ANOVA) ve Student t testi ile karşılaştırıldı. Pearson korelasyon analizi ile biyokimyasal parametreler arasındaki korelasyon irdelendi. İstatistiksel anlamlılık $\alpha= 0.05$ düzeyinde ($p<0.05$) değerlendirildi.

4. BULGULAR

Olguların yaşları 34–82 yıl arasında olup 79'u erkek 73'ü kadın idi. Diabetli olgularda diabet süresi 1-41 yıl arasında değişmekte idi ve 34'ü insülin tedavisi almakta idi. İnsülin tedavisi alanlarda insülinle tedavi süresi 1 ile 25 yıl arasında değişmekte idi. Olguların ağırlığı 50 ile 130 kg arasında, boyları 1.48 ile 1.83 m arasında değişmekte idi. Görme keskinliği sağ gözde 0.02 ile 1.0 arasında, sol gözde ise 0.05 ile 1.0 arasında değişmekte idi. Göz içi basıncı sağ gözde 10 ile 22 mmHg, sol gözde 10 ile 20 mmHg arasında değişmekte idi. Sistolik kan basıncı 90 ile 160 mmHg, diastolik kan basıncı 60 ile 90 mmHg arasında değişmekte idi. Açlık kan şekeri 59 mg/dl ile 562 mg/dl arasında değişmekte idi. Gruplarda yaş, boy, kilo, vücut kitle indeksi (VKİ), görme keskinlikleri, göz içi basıncı ve kan basınçları Tablo 1'de verilmiştir.

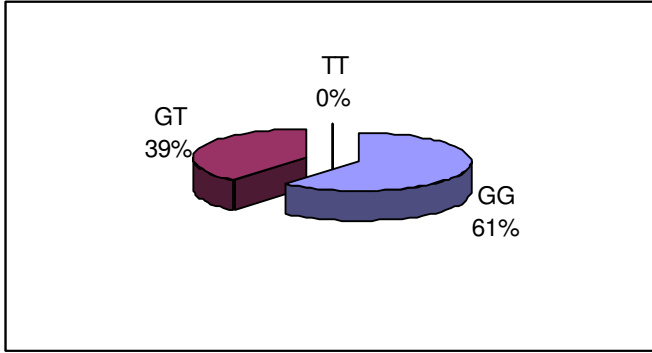
Gruplar arasında yaş açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. AKŞ, fruktozamin, kolesterol, HbA1c ve VLDL, LDL, TG, Na, K açısından diabetik grup ile kontrol grubu arasında fark vardı.

Görme keskinlikleri retinopatili grup ile retinopatisiz grup arasında farklı iken retinopatisiz grup ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p > 0.05$). HbA1c üç grup arasında da farklı idi ($p < 0.05$). Kolesterol düzeyleri retinopatili grupta retinopatisiz grup ve kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı idi ($p < 0.05$). VLDL diabetik grup ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak farklı idi. HDL gruplar arasında farklı değildi. LDL sadece retinopati grubunda diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi. TG ise kontrol grubu ile diabetik 2 gruptan istatistiksel olarak anlamlı farklı idi ($p < 0.05$).

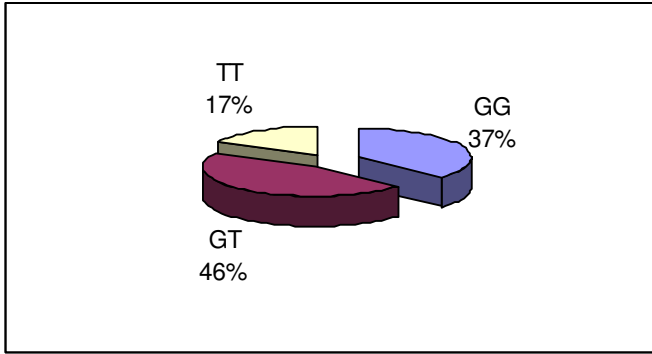
Tablo 6. Gruplarda biyokimyasal parametre değerleri

	Tüm Örneklem	Kontrol	Diabetik Retinopatisiz Grup	Nonproliferatif Diabetik Retinopati Grubu	Proliferatif Diabetik Retinopati Grubu
Yaş (Yıl)	54,4±9.7	55.0±9.7	56.3±7.6	59.8±9.1	58.0±8.8
Diabet Süresi (Yıl)	12.0±7.5	-	5.5±4.4	15.3±6.9	15.7±5.7
Ağırlık (Kg)	75.1±11.8	74.8±11.7	78.1 ±12.2	71.1±9.8	76.4±12.8
Boy (cm)	165.7±8.5	166.4±7.9	164.7±8.3	163.3±8.9	164.0±8.9
Vücut Kitle İndeksi	27.8±4.7	26.9±3.7	28.9±4.3	26.8±4.2	28.7±6.2
Görme (Sağ Göz)	0.79±0.3	0.99±0.01	0.98±0.04	0.67±0.3	0.44±0.3
Görme (Sol Göz)	0.79±0.3	0.99±0.01	0.98±0.04	0.66±0.3	0.43±0.3
GİB Sağ (mmHg)	15.0±2.5	14.5±2.2	14.5±2.4	15.2±2.7	16.0±2.7
GİB Sol (mmHg)	15.1±2.4	14.8±2.2	14.7±2.3	15.2±2.8	15.9±2.4
Sistolik KB (mmHg)	123.0±10.4	120.9±8.3	119.8±6.5	125.3±11.5	127.2±13.3
Diastolik KB (mmHg)	79.1±5.9	77.3±5.6	78.6±6.0	79.6±6.2	81.5±5.5
AKŞ (mg/dl)	169.3±90.3	88.8±16.1	166.5±75.6	227.7±95.9	209.0±82.8
Fruktozamin (µmol/l)	441.7±105.9	377.5±77.9	445.1±107.4	488.5±102.3	469.1±10.8
HbA1C	8.09±2.4	5.5±0.6	8.1±2.5	9.8±1.6	9.5±1.7
Kolesterol	192.4±45.2	174.0±31.8	184.4±42.3	198.5±47.8	220.1±47.6
VLDL	35.8±27.5	22.4±11.8	37.1±24.2	39.2±35.3	47.6±30.5
HDL	46.8±12.7	45.8±11.6	45.2±11.2	50.0±15.7	46.6±12.2
LDL	111.1±35.6	100.8±29.8	104.9±29.6	116.3±33.4	126.3±46.3
TG	165.5±114.2	102.9±53.2	180.4±122.5	173.5±108.2	218.3±135.3
HB	13.5±1.4	13.7±1.4	13.7±1.5	13.3±1.5	13.3±3.7
HCT	39.4±4.2	40.6±4.2	39.9±4.3	38.3±4.2	38.7±3.3
NA	136.9±3.3	138.7±2.4	136.4±3.7	136.4±3.3	136.1±1.1
K	4.3±0.4	4.1±0.3	4.2±0.3	4.5±0.5	4.4±0.5
CA	9.2±0.4	9.2±0.3	9.2±0.4	9.3±0.4	9.2±0.4

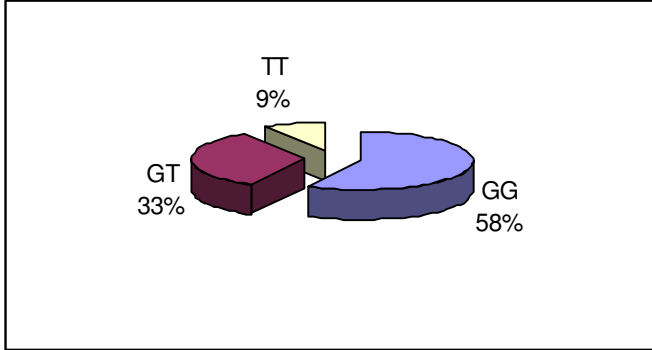
GİB: Göziçi basıncı, AKŞ: Açlık kan şekeri



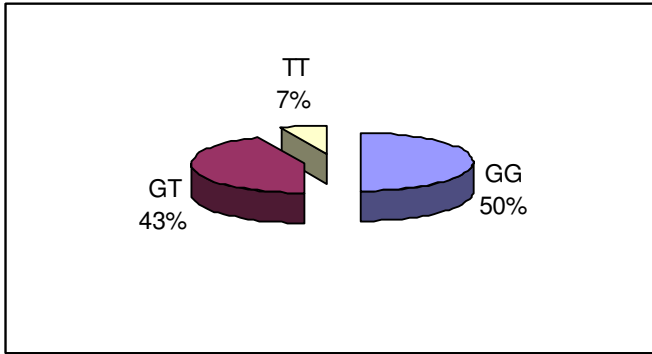
Diabetik retinopatisiz grupta genotip dağılımı



Nonproliferatif Diabetik retinopatili grupta genotip dağılımı



Proliferatif Diabetik retinopatili grupta genotip dağılımı



Nonproliferatif Diabetik retinopatili grupta genotip dağılımı

Şekil 8. Retinopati gruplarında G894T eNOS gen polimorfizminin genotiplerinin retinopati gruplarına göre dağılımı

Tablo 7. Diabetik hastalarla kontrol grubu arasında genotip dağılımının karşılaştırılması

Grup	Genotip			Toplam
	GG n (%)	GT n (%)	TT n (%)	
Diabetes mellitus'lu Hastalar	52 (48.6)	46 (43.0)	9 (8.4)	107 (100.0)
Kontrol Grubu	26 (57.8)	15 (33.3)	4 (8.9)	45 (100.0)
Toplam	78 (51.3)	61 (40.1)	13 (8.6)	152 (100.0)

Olgularımızda genotip dağılımının Hardy Weinberg eşitlik dağılımına uygun olduğu saptandı. GG, GT ve TT genotipleri açısından diabetik hastalarla kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı. Aynı şekilde Nonproliferatif DRP ile proliferatif DRP arasında ve retinopati grupları ile retinopati olmayan grup arasında G894T gen polimorfizmi genotipleri arasında anlamlı fark izlenmedi ($p>0.05$, Ki kare testi).

Tablo 8. Diabetik hastalarla kontrol grubu arasında genotip dağılımının karşılaştırılması

Grup	Genotip			Toplam
	GG n (%)	GT n (%)	TT n (%)	n (%)
Retinopatisiz diabetes mellitus	22 (62.9)	13 (37.1)		35 (100.0)
Diabetik retinopati	30 (41.7)	33 (45.8)	9 (12.5)	72 (100.0)
Kontrol	26 (57.8)	15 (33.3)	4 (8.9)	45 (100.0)
Toplam	78 (51.3)	61 (40.1)	13 (8.6)	152 (100.0)

G ve T aleli sıklığı değerlendirildiğinde diabetik hastalarla kontrol grubu arasında G veya T aleli açısından fark yoktu ($p = 0.267$, odds ratio = 0.805, G aleli için %95 güven aralığı (CI %) = 0.811 – 1.093 , T aleli için güven aralığı = 0.778 – 1.760).

Diabetik hastalar kendi içinde değerlendirildiğinde G aleli retinopati olmayanlarda %80 (n=88) sıklıkta saptanırken T aleli %19.4 (n=14), nonproliferatif diabetik retinopati grubunda G aleli %59.8 (n=49) ve T aleli %40.2 (n=33) ve proliferatif diabetik retinopati grubunda G aleli %71.7 (n=43) ve T aleli %28.3 (n=17) sıklıkta bulundu. Gruplar arasında alel sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$).

Tablo 9. Diabetik retinopati grupları ile diğer gruplar arasında genotip dağılımının karşılaştırılması

Grup	Genotip			Toplam
	GG n (%)	GT n (%)	TT n (%)	
Retinopati Yok	22 (61.1)	14 (38.9)	-	36 (100.0)
Nonproliferatif diabetik retinopati	15 (36.6)	19 (46.3)	7 (17.1)	41 (100.0)
Proliferatif diabetik retinopati	15 (50.0)	13 (43.3)	2(6.7)	30 (100.0)
Kontrol	26 (57.8)	15 (33.3)	4 (8.9)	45 (100.0)
Toplam	78 (51.3)	61 (40.1)	13 (8.6)	152 (100.0)

Tablo 10. Altgruaplarda G ve T aleli sıklığı

Alt grup	Alel		Toplam
	G n (%)	T n (%)	
Diabetik Retinopati Yok	58 (80.6)	14 (19.4)	72 (100.0)
Nonproliferatif Diabetik Retinopati- Makula Ödemi (+)	29 (76.3)	9 (23.7)	38 (100.0)
Nonroliferatif Diabetik Retinopati Grubu- Makula Ödemi(-)	20 (45.5)	24 (54.5)	44 (100.0)
Proliferatif Diabetik Retinopati Grubu- Makula Ödemi(+)	16 (80.0)	4 (20.0)	20 (100.0)
Proliferatif Diabetik Retinopati Grubu- Makula Ödemi(-)	27 (67.5)	13 (32.5)	40 (100.0)
Kontrol Grubu	67 (74.4)	23 (25.6)	90 (100.0)
Toplam	217 (71.4)	87 (28.6)	304 (100.0)

Nonproliferatif retinopati grubunda makula ödemi olanlarda GG aleli %52.6 oranında saptanırken makula ödemi olmayanlarda %22.7 oranında saptandı. GT genotipi ise sırasıyla %38.9 ve %47.4 oranında saptandı. TT genotipi makula ödemi olanlarda izlenmezken ödemi olmayanlarda %31.8 (n= 7) oranında saptandı. Proliferatif retinopati grubunda makula ödemi olanlarda GG aleli %80 (n =8) TT genotipi %20 (n=2) saptanırken GT genotipi saptanmadı. Ödem bulunmayan hastalarda GG genotipi %35 (n= 7) GT genotipi %65 (n=13) izlendi ve TT genotipi saptanmadı. Hem nonproliferatif hem de proliferatif grupta GG genotip polimorfizmi makula ödemi ile ilişkili bulundu (Ki kare testi, $p<0.05$) (Tablo 10,11).

Tablo 11. Diabetik retinopatili gruplarda makula ödemi varlığı ile genotip sıklığı ilişkisi

Gruplar	Genotip			Toplam
	GG n (%)	GT n (%)	TT n (%)	
Nonproliferatif Diabetik Retinopati Makula ödemi (+)	10 (52.6)	9 (47.4)	-	19 (100.0)
Nonroliferatif Diabetik Retinopati Makula ödemi (-)	5 (22.7)	10 (45.5)	7 (31.8)	22 (100.0)
Proliferatif Diabetik Retinopati Makula ödemi (+)	8 (80.0)	-	2 (20.0)	10 (100.0)
Proliferatif Diabetik Retinopati Makula ödemi (-)	7 (35.0)	13 (65.0)	-	20 (100.0)

Proliferatif diabetik retinopati grubunda makula ödemi olanlar ile olmayan G ve T aleli açısından karşılaştırıldığında arada anlamlı fark bulunmadı (Ki kare testi, $p=0.24$, odds ratio=1.92, G aleli için %95 GA=0.872-1.611 ve T aleli için %95 GA=0.230-1.646).

Tablo 12. Tüm grupta farklı genotiplere sahip hastaların açlık glukoz ve HbA1c düzeyleri ve anlamlı diğer parametreler ile ilişkisi

Genotip	AKŞ	HbA1c	HDL	Görme	
				Sağ Göz	Sol Göz
GG	150±78.2	7.5±2.2	45.0±11.0	0.87±0.2	0.85±0.2
GT	190.6±100.8	9.0±2.6	49.9±14.6	0.71±0.3	0.72±0.3
TT	193.2±91.9	7.5±1.7	44.7±12.2	0.79±0.3	0.68±0.3
P ve F değeri	P:0.033 F: 3.478	P:0.003 F:4.002	P:0.042 F: 4.312		

Nonproliferatif diabetik retinopati grubunda ise makula ödemi olanlar ile olmayanlar arasında G ve T aleli sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlendi.

Makula ödemi olanlarda G aleli %76.3 (n=29), T aleli %23.7 (n=9) ve makula ödemi olmayanlarda G aleli %45.5 (n=20) ve T aleli %54.5 (n=24) olarak bulundu (Ki kare testi, p=0.004, odds ratio=3.86, G aleli için %95 GA=0.872-1.611 ve T aleli için %95 GA=0.230-1.646). G aleli nonproliferatif diabetik retinopatili hastalarda makula ödemi ile ilişkili gözükmetedir (Tablo 10, 11) . Makula ödemi olan tüm retinopatili hastalarda GG genotipi %62.1, GT %31 ve TT %6.9 oranında saptanırken makula ödemi olmayan tüm retinopatili hastalarda GG %28.6, GT %54.8 ve TT %16.6 oranında saptandı. Diabetik retinopatili hastalarda makula ödemi ile GG genotipi arasında anlamlı bir ilişki saptandı (p=0.017, Ki kare testi).

Tablo 13. Diabetik hastalarda farklı genotiplere sahip hastaların açlık glukoz ve HbA1c düzeyleri ve anlamlı diğer parametreler ile ilişkisi

Genotip	AKŞ (mg/dl)	HbA1c	HDL	DM Süresi (yıl)	Görme	
					Sağ Göz	Sol Göz
GG	178.5±79.6	8.5±2.1	43.8±9.6	12.1±10.1	0.81±0.2	0.79±0.3
GT	215.7±96.3	9.8±2.2	51.7±15.3	11.8±7.2	0.63±0.3	0.64±0.4
TT	251.6±55.5	8.8±0.7	44.5±15.2	13.0±4.1	0.56±0.3	0.53±0.3
ANOVA	p=0.035 F=3.487	p=0.013 F=4.521	p=0.015 F=4.379	p=0.005 F=0.912	p=0.019 F=4.116	p=0.048 F=3.138

AKŞ, HbA1c ve HDL değerleri için GG ve GT genotipine sahip hastalar arasında istatistiksel anlamlılık p=0.023(AKŞ) , p=0.010(HbA1c), p=0.012(HDL) (Tukey posthoc testi)

Hastalar genotiplerine göre sınıflandırıldıklarında GT ve TT genotipine sahip bireylerde AKŞ'nin GG genotipine sahip bireylerden anlamlı olarak daha yüksek olduğu, TT genotipine sahip bireylerde ise HbA1c'nin diğer bireylerden daha yüksek olduğu saptandı. Sadece diabetik hastalar kendi içinde genotiplerine göre sınıflandırıldıklarında GT ve TT genotipine sahip diabetiklerde AKŞ'nin daha yüksek olduğu, GT genotipine sahip diabetiklerde ise HbA1c'nin diğer diabetiklere göre daha yüksek olduğu görüldü (Tablo 12,13).

Tablo 14. HbA1c düzeyine göre genotip sıklığı

HbA1c	Genotip			Toplam
	GG n (%)	GT n (%)	TT n (%)	
Grup 1 HbA1c >8	22 (68.8)	9 (28.1)	1 (3.1)	32 (100.0)
Grup 2 HbA1c <8	30 (40.0)	37(49.3)	8 (10.7)	75 (100.0)
Toplam	52 (48.6)	46 (43.0)	9 (8.4)	107 (100.0)

Diabetik hastalar kendi içinde HbA1c düzeyi 8'in altında ve üstünde olanlar olarak 2 gruba ayrıldığında HbA1c'nin 8'in üstünde olduğu grupta GG genotipi düşük olanlardan daha yüksek sıklıkta saptanırken HbA1c'nin düşük olduğu kan şekerinin daha kontrollü olduğu grupta GT genotipi daha yüksek sıklıkta saptandı (p=0.002) (Tablo 14).

Tablo 15. HbA1c düzeyine göre G ve T alel sıklığı

HbA1C	ALEL		Toplam
	G n (%)	T n (%)	
Grup 1 HbA1c >8	53 (82.8)	11 (17.2)	64 (100.0)
Grup 2 HbA1c <8	97 (64.7)	53 (35.3)	150 (100.0)
Toplam	150 (70.1)	64 (29.9)	214 (100.0)

Yine G ve T alellere göre diabetik hastalarda HbA1c düzeyine göre karşılaştırma yapıldığında G aleli HbA1c'nin 8' in üstünde olduğu hastalarda %82.8 (n=53), T aleli %17.2 (n=11), HbA1c'nin 8'in altında olduğu hastalarda G alleli %64.7(n=97) ve T aleli %35.3 (n=53) olarak bulunurken fark istatistiksel olarak anlamlı idi (Tablo 15). Bu analiz ile kan şekerinin uzun süreli olarak regüle edilemediği hastalarda GG genotipi ve G aleli ile anlamlı bir ilişki olduğu sonucu çıkmaktadır.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda eNOS gen polimorfizmi ile diabetik retinopatinin evreleri ve diabetik makula ödemi arasında ilişki olup olmadığını ortaya çıkarmak amacıyla 107 diabetik ve 45 kontrol bireyde kandan G894T gen polimorfizmi analiz edildi. Çalıştığımız gen polimorfizmi ile diabetik retinopati şiddeti arasında herhangi bir ilişki bulunamazken diabetik makula ödemi gelişimi ile G894T gen polimorfizmi ile muhtemel bir ilişki olduğu tespit edildi. Yine kronik hiperglisemi ve kontrolsüz kan şekeri düzeyi ile çalıştığımız gen polimorfizmi arasında muhtemel bir ilişki olduğu gözükmemektedir.

Diabetik retinopatinin bazı bireylerde çok hızlı ilerleme gösterirken bazı bireylerde sakin seyretmesi, retinopati gelişimi ve ilerlemesinde kan şekeri düzeyi dışında başka faktörlerin de rol oynadığını düşündürmektedir. İlerlemede multifaktöryel etkenler etkili olsa da son yıllarda genetik faktörlerin başlıca rol oynadığı düşünülmekte ve bu yönde çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Genetik çalışmalarda diabetik retinopatinin patogenezinde rol oynayan biokimyasal mekanizmalara katılan maddelerin kromozomlardaki genetik şekil değişiklikleri araştırılmaktadır. Bu maddelerden birisi de nitrik oksittir. Son yıllarda nitrik oksitin sistemik hastalıklardaki rolü ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Nitrik oksitin etiyopatogenezinde rol aldığı en önemli hastalıklardan birisi diabetes mellitusdur. Diabetes mellitusun en önemli komplikasyonlarından biri olan diabetik retinopati erişkin körlüğünün en sık nedeni olarak gösterilmektedir (14). Ek olarak diabetik retinopatinin herhangi bir evresinde görülen diabetik makulopati veya makula ödemi görsel bozulmanın en önemli nedenidir (14–16).

Genellikle hiperglisemi, kötü metabolik kontrol, sitokinler, vazoaktif hormonlar ve insüline direnç diabetik mikrovasküler hastalıkta ilerlemeden sorumlu faktörlerdir. Artmış kan akımı, retinal perisitlerin selektif kaybı, bazal membran kalınlaşması, endotelial hücre kaybı ve küçük kapillerin tıkanması birbirlerini tamamlayıcı etki ile retinopatiye yol açarlar (75). “Diabet Kontrol ve Komplikasyonları Çalışma Grubu” araştırması diabetik hastalarda retinopatinin başlamasında genetik faktörlerin etkili olduğunu göstermiştir (76).

NO oldukça reaktif bir intersellüler sinyal molekülü olup antitrombojenik ve antiplatelet regülatuar aktivitelerine ek olarak vasküler tonüs ve vasküler düz kas hücrelerinin antiproliferatif düzenlenmesinde de anahtar role sahip çok fonksiyonlu bir moleküldür (17-18)

Çalışmamızda önce eNOS genlerinin diabetik retinopati ile muhtemel ilişkilerini değerlendirdik. Daha önce birçok aday genlerin diabetik retinopati ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Özellikle aldoz reduktaz enzimi geni detaylı bir şekilde araştırılmış ve 5' bölgesindeki ve C-106T dinukleotid polimorfizminin diabetik retinopati ile direk ilişkili oldukları tespit edilmiştir. Bazı çalışmalarda VEGFün 5' kodlanmamış bölgesinde C-634G olarak tanımlanan genel bir polimorfizmin diabetik retinopati mevcudiyeti ile doğrudan ilişkili olduğu ve fonksiyonel olarak önemli olduğu sonucuna varılmıştır. eNOS geninde çeşitli polimorfizmler tanımlanmıştır (19-20). Özellikle promotör bölgesindeki T-786C, 4. intron bölgesinde 27-bp tekrarı ve 7. eksondaki Glu298Asp dikkat çekmiştir. Bu polimorfizmler koroner arter hastalığı, hipertansiyon, beyin infarktı ile ilişkilendirilmiş olsa da bulgular kimi zaman çelişkilidir (21). Tip I DM' da 27-bp tekrarının 'b' alleli yüksek diabetik retinopati riski ile ilişkili bulunmuştur (22,23).

nNOS, iNOS ve eNOS genleri sırasıyla 12q24.2, 17cen-q12 ve 7q35 – 36 kromozomal bölgelerinde yerleşiktir. Göz içinde NO muhtemelen fotoreseptörler ve bipolar hücrelerde nNOS tarafından, vasküler endotelial hücrelerde eNOS tarafından ve Müller hücreleri ve retina pigment epitelinde iNOS tarafından üretilir.

Gözde üretilen iNOS fotoreseptör dış segmentlerinin fagositozu, enfeksiyonlar, enflamasyon, iskemik prosesler ve diabetik retinopatinin patogenezinde yer alırlar (77,78). Vücutta vasküler düz kas ve kalp kası dahil değişik dokular diğer 2 proteine kıyasla büyük miktarda iNOS üretimi yapar. iNOS tümör nekroz faktör ve İL 1 gibi sitokinler tarafından indüklenir. iNOSun sitokinlere cevap olarak üretimi enflamatuvar cevabın bir parçasıdır ve doku hasarına yol açan vazodilatasyon vasküler sızıntıya katkıda bulunur, bu durum oküler anjiyogenezisin regülasyonundaki muhtemel rolünü de akla getirir (79). Dolayısıyla

oluşan nitrik oksit, VEGF dahil vazodilatatör peptidlerin büyümeyi arttırıcı etkisini uyaran potent anjiyogenik bir mediatör olarak davranabilir (80).

Kanda nitrik oksidin yüksek bulunması HT, diabet, hiperlipidemi, ülseratif kolit, kardiyomiyopati, septik şok gibi hastalıklarla ilişkili bulunmuştur (81,82). Tüm faktörlerin iNOSun diabetik retinopatideki önemli rolü olabileceğini düşündürmesi nedeniyle değişik çalışmalarda iNOS gen polimorfizmi çalışılmıştır. iNOS gen polimorfizminin Kuzey İrlanda toplumunda diabetik retinopati ile ilişkisi bildirilmiştir (75).

Endotelial NOS insülinin vasküler etkilerine aracılık eder (83). Nitrik oksit üretimini, vazodilatasyon ve dolayısıyla iskelet kaslarına glukoz ve insülin ulaşımını arttırır. NO aynı zamanda hepatik glukoz metabolizmasında da rol oynar (84). eNOS' dan yoksun bırakılan farelerde periferik ve hepatik insülin duyarlılığı azalır (85). Bununla birlikte tip II DMli hastaların insüline dirençli birinci derece akrabalarında NO aracılığıyla gerçekleşen cGMP üretiminin azalmış olduğu gösterilmiştir (86). Tanımlanmış olan eNOS gen polimorfizmleri arasında promotor bölgede T786C polimorfizminin (- T786C), intron 4' de 27 baz çifti tekrarının (in4a/ b) ve ekson 7 deki G894T polimorfizminin (G894T) NO seviyelerini etkilediği bildirilmiştir (87,88). T786Cnin insüline dirençle ilişkisi ve G894Tnin diabetes mellitus ve metabolik sendromla ilişkisi kontrollü çalışmalarda bildirilmiştir (89,90). eNOS gen zinciri 1993'te ortaya çıkarılmış ve kromozom 7q35-36 da haritalandırılmıştır. Gen, 1203 aminoasit içeren 135-kDa bir proteini kodlayan 26 eksondan oluşmaktadır. Değişik çalışmalarda NOS3 polimorfizminin koroner arter hastalığı, miyokard enfarktüsü, hipertansiyon, tekrarlayan erken gebelik sonlanması ve intrakraniyal anevrizma gibi hastalıklarla ilişkisi incelenmiştir. Özellikle eNOS'un 7. eksonunda yerleşmiş yaygın bir varyant olan ve kodon 298 (Glu298Asp) de glutamatın aspartat ile yer değiştirmesi ile sonuçlanan G894T değişik toplumlarda koroner arter hastalığı için risk faktörü olarak tanımlanmıştır (91) . Çalışmamızda araştırdığımız NOS G984T polimorfizminin diabetik retinopati ile muhtemel ilişkisini araştıran az sayıda çalışmaya rastladığımız için diabetik retinopatide G984T gen polimorfizminin etkisini araştıran sınırlı sayıda çalışmalara katkı sağladığımızı düşünüyoruz. NOS gen G984T

polimorfizmi koroner arter hastalığında mevcudiyeti araştırılmış ancak çelişkili sonuçlar bildirilmiştir.

Glukoz toleransı bozuk olan kişiler tip II diabetes mellitus gelişimi ve komplikasyonlarının gelişmesi açısından yüksek riske sahiptirler. Bununla birlikte çevresel ve genetik faktörler hipergliseminin ilerlemesini ve gerilemesini etkileyebilir. eNOS gen polimorfizmlerinin glisemik ilerleme üzerinde de belirleyici etkisi olabilir.

Retinopati geliştirilmiş rat retinalarında artmış nitrik oksit sentaz aktivitesi gözlenmiştir (92). Diabetik hastalarda aköz humörde yüksek nitrik oksit seviyeleri bildirilmiştir (93). Diabetik retinopatinin önlenmesinde ve gecikmesinde önemli rolü olan perisitler anjiogenezisin potent inhibitörü olan çözünen proteinler salarlar ve iNOS'u down regule ederek hareket ederler (94). Retinopati gelişen tip I diabet hastaları endotelial disfonksiyonun göstergesi olarak artmış nitrik oksit sentaz aktivitesine sahiptirler (95). Nitrik oksit sentazın inhibisyonu gözü iskemik değişikliklerden korur. Bu da potansiyel terapötik yaklaşımları akla getirir. Aminoguanidin tedavisi deneysel ratlarda yapılan çalışmalarda diabetik retinopati gelişmesini inhibe etmiştir. Bulgular bu ilacın aşırı nitrik oksit üretiminden sorumlu sitokinlerce indüklenen nitrik oksit sentaz izoformunu selektif olarak bloke ettiğini göstermektedir (96).

iNOS gen polimorfizminin diabetik retinopati ile ilişkisini araştıran bir çalışmada iNOS geninin 210bp alelinin diabetik retinopati gelişimi için risk aleli olduğu , 200 ve 220bp alellerinin ise retinopati ve retinopatinin komplikasyonlarının gelişmesi açısından (proliferatif diabetik retinopati, diabetik makulopati) koruyucu olduğu bildirilmiştir (97).

G894T eNOS gen varyantının eNOS proteini üzerine fonksiyonel etkileri olduğu bildirilmiştir. Bu polimorfizm NOS enziminin subseleler trafiğini kontrol eden şaperon proteinleriyle ve enzimin parçalanma sürecinde yer alan proteinlerle protein- protein etkileşimlerini içerir (98). Diabetik retinopati patogenezinin anormal retinal NO kullanımı, bozulmuş olan NO aracılığı ile vazodilatasyon, oksidatif ve nitratif stres, nitrik oksit sentaz izoformlarının bozuk düzenlenmesi ve eNOS bağlanamaması gibi NO yolundaki retinal bozuklukların heterojen ve kompleks bir araya gelmesiyle ilişkili olduğu konusunda klinik

ve deneysel bulgular giderek artmaktadır. Bu nedenle diğer NOS genleri gibi insan eNOS geni de diabetik retinopatiden sorumlu aday bir gen olarak görülmektedir (22, 99-104).

Serbest radikallere ve NO üretiminde artışa bağlı olarak oksidatif stresin yükselmesinin mikrovasküler komplikasyonların patogenezinde önemli rol oynadığı iddia edilmiştir (105). Diabetik hastalarda endotelial fonksiyon üzerine yapılan vasküler çalışmalarda tartışmalı sonuçlar bildirilmiştir (106). Yüksek glukoz konsantrasyonlarında NO üretiminin arttığı ya da azaldığı bildirilmiştir. Artmış veya sıklıkla azalmış NO mevcudiyeti klinik ve deneysel durumlarda diabetik komplikasyonlarla ilintili bulunup NO'nun dual fonksiyonu olabileceğini düşündürmektedir (107).

Kronik hiperglisemi uzun süreli birçok hastada şiddetli olmayan diabetik retinopatiye yol açsa da hastaların çoğunda ciddi diabetik retinopati oluşturmak için yeterli değildir. Bu durum genetik faktörlerin potansiyel ilave rolünü düşündürmektedir (108).

Bu hipotez Diabetes Control and Trial (DCCT) tarafından çalışılmış ve ciddi diabetik retinopatili hastalarda güçlü ailesel retinopati geçişi olduğu, ancak şiddetli retinopatisi olmayanlarda böyle bir geçişin olmadığı gösterilmiştir (76).

NO'nun retinaya aşırı salınımı direkt ya da indirekt olarak oksidatif hasarı, iskemiye ve neoanjiyogenezisi indükler; bu da NO'nun diabetik retinopatinin gelişiminde ve şiddetinde önemli bir patojenik rolü olduğunu düşündürür. Bunu düşündüren bulgulardan bazıları şunlardır; 1- NO'in aşırı üretimi retinal endotelial ve glomerül hücrelerinde oksidatif strese yol açabilir. 2- Diabetik retinopatinin gelişimine öncülük eden perisitlerin kaybı ve retinal yataktaki artmış kan akımı kısmen nitrik oksidin aşırı üretimine bağlı olabilir (109).

Diabetik hastalarda şiddetli diabetik retinopati riski oksidatif stres markerlarının varlığıyla ilişkili bulunmuştur (110). Başka bir bulgu ise proliferatif diabetik retinopati gelişiminde güçlü bir rol oynayan vasküler endotelial growth faktörün (VEGF) anjiyojenik özelliklerine nitrik oksidin katkıda bulunmasıdır (111). İntravenöz VEGF infüzyonu endotelial hücre bariyerinin fonksiyonel bütünlüğünü akut olarak bozabilir ve NOS aktivasyonunu içeren bir mekanizma aracılığıyla oküler dokulardaki arterioller direnci

azaltır (112). VEGF'in yol açtığı anjiyogenezis ve vasküler permeabilite artışı eNOS'dan yoksun bırakılan farelerde engellenmiştir. Yine benzer bir diabetik retinopati modeli olarak eNOS'dan yoksun fare ve bir NOS inhibitörü olan N-nitro-L- arginin (L- NNA) ile tedavi edilmiş fare modelinde vazooobliterasyonda ve vitreus neovaskülarizasyonunda anlamlı bir azalma gösterilmiştir (113). Daha yeni bir çalışmada iNOS salınımının inhibisyonunun avasküler retinada lokal olarak anjiyogenezisi inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu fenomene VEGF reseptörünün down regulasyonunun en azından kısmen aracılık ettiği düşünülmüştür. Bu konuda önemli olan diğer nokta ise iNOS eksprese eden hayvanlarda patolojik intravitreal neovaskülarizasyonun kayda değer bir şekilde daha güçlü olduğudur (114). Olgu-kontrol çalışmalarında diabetik retinopati veya diabetik nefropati için düşük risk ile iNOS'da CCTTT- 14a aleli tekrarı arasında anlamlı ilişki gösterilmiştir (115,116).

Bazı bulgular retinada bozulmuş olan eNOS ekspresyonunun kan-retina bariyerinin bozulmasında önemli rol oynadığını, makuler ödem gelişimine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. İmmün cevap ve enflamasyon gibi patolojik süreçlerde iNOS tarafından üretilen yüksek NO düzeyleri vücut için zararlı olsa da, düzeyi eNOS tarafından devam ettirilen fizyolojik konsantrasyonlardaki NO'nun vasküler endotel için koruyucu özelliği olabilir (18). Dolayısıyla eNOSdaki bozulma hiperglisemi veya hipertansiyonun neden olduğu endotelyal hücre hasarını daha da hızlandırarak endotel hücrelerinin oluşturduğu iç kan retina bariyerinin bozulmasına yol açabilir. Dahası, bozulmuş eNOS aktivitesi vasküler tonüsün regulasyonunu uyararak hipoksiyle sonuçlanabilir ve VEGF tarafından indüklenmiş vasküler permeabilite artışına neden olabilir. Bozulmuş bazal NO üretimi endotelyuma lökosit adezyonuna izin vererek kan-retina bariyerinin bozulmasına ve kapiller nonperfüzyona yol açabilir (117-118). Alternatif olarak bozulmuş eNOS aktivitesi doğrudan mikrovasküler permeabiliteyi arttırabilir (119-120). İlginç olarak eNOS, kan-retina bariyerinin sürdürülmesinde önemli olduğu bilinen Müller hücrelerinde lokalizedir (121). Awata ve ark. eNOS gen polimorfizminin (promotor bölgedeki T786C ve intron 4'deki 27bp tekrarı) tip II DMli Japon hastalarda makula ödemi ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (122). Retinadaki defektif eNOS ekspresyonunun makula

ödemi gelişimine katkıda bulunuyor olabilir. Bizim çalışmamızda G894T polimorfizminde GG genotipinin makuler ödemle ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Ancak Awata ve ark. diğer 2 polimorfizminin makuler ödemle ilişkisini bildirmiş olmalarına rağmen G894T polimorfizmiyle diabetik makula ödemi arasında ilişki bulamamıştır. Awata ve ark. eNOS ile ilgili çalışmış oldukları her 3 polimorfizmin diabetik retinopati ile ilişkili olmadıklarını bildirmişlerdir (122).

Taverna ve ark. daha yakın zamanda yaptıkları diğer bir çalışmada eNOS geninin diğer 2 polimorfizminin (T786C ve C774T) ciddi diabetik retinopati üzerine etkisi olmadığını bulmuşlardır (123). Ancak yazarlar, C786C taşıyıcılarının T786T ve T786C taşıyıcılarından sırasıyla 5 yıl ve 3,5 yıl daha önce panretinal fotokoagulasyon ile tedavi edildiklerini gözlemişlerdir. Dahası, bu ilişki HbA1C nin %8'in üstünde olduğu hastalarda daha belirgindir. Öte yandan T774T taşıyıcıları, C774C ve C774T taşıyıcılarından 6 yıl sonra panretinal fotokoagulasyon tedavisine ihtiyaç duymuşlardır (122). Tüm bu bilgiler eNOS genindeki polimorfizm farklılıklarının hastalarda diabetik retinopatinin şiddetini etkileyebileceğini göstermektedir.

Avustralyada yapılan bir çalışmada 574 tip II DM'li hastada G894T mutasyonunun diabetin vasküler komplikasyonlarıyla ilişkisi araştırılmış ve herhangi bir ilişki bulunamamıştır. G894T mutasyonu makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlarla ilişkili bulunmadığı gibi aterojenik risk faktörleriyle de ilişkili bulunmamıştır (124).

Tso ve ark., NOS un her 3 polimorfizminin glukoz toleransı bozuk olan kişilerde uzun süreli glisemik sonuç ile ilişkisini araştırmışlardır (125). Glukoz toleransı bozuk olan 256 Çinli olgunun eNOS genotipleri belirlendikten sonra 5 yıl boyunca glisemik düzeyleri takip edilmiş ve 5. yılda olguların %40.2'sinde normal glukoz toleransı saptanırken %39'unda bozulmuş glukoz toleransı / açlık kan glukozu devam etmiş %19.9unda ise DM gelişmiştir. 5 yılda ekson 7 G894T polimorfizminin glisemik seyir üzerinde anlamlı gen etkisi gösterilmiştir. T894 taşıyıcıları GG olgularına kıyasla persistan hiperglisemiye sahiptirler. T aleli mevcudiyeti persistan hiperglisemi için anlamlı risk faktörü olarak kalmıştır. Diğer 2 gen polimorfizmi ise 5 yıllık glisemik durum üzerinde anlamlı bir

etkilerinin bulunmadığı bildirilmiştir. Bu çalışmada incelenen Çinli populasyonda eNOS G894T polimorfizminin persistan hiperglisemi açısından belirleyici olduğu açıklanmaktadır.

Son 10 yılda insülin salgısı ve insülin direnci üzerinde NO'nun rolünün anlaşılması için önemli çabalar gösterilmiştir. Özellikle fizyolojik insülin salgısının modulatörü olarak NO'nun rolü yaygın şekilde değerlendirilmiştir (126). Ayrıca spesifik olarak iskelet kası mitokondrilerinde lokalize eNOS aktivasyonunun kas kan akımını arttırdığı insülinin major substratı olan glukozun kas hücrelerine girişini arttırdığı bulunmuştur. (127-128).

Monti ve ark., G894T gen polimorfizminin tip II DM ile önemli ilişki gösterdiğini bildirmişlerdir (90). Bu çalışmada artmış insülin sekresyonu ve belirgin derecede insülin rezistansı eNOS geninin polimorfik varyantlarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Yine bu çalışmada eNOS gen G894T varyantı için homozigot olan sağlıklı kontrol bireylerinde NO seviyesinin yüksek olduğu bulunmuştur. Bu bulgu azalmış NO aktivitesi, hiperinsülinemi, insülin direnci ve artmış NO düzeyi gibi daha önceden bildirilmiş bir fenotip özelliği ile genotip varyantı arasında bir ilişki olduğunu doğrulamaktadır. (129,130). Dolayısıyla, Monti ve ark. ilk kez hiperinsülinemi, insülin direnci ve tip II DM'li hastalar için yeni bir genetik duyarlılık faktörünü ortaya koyacak şekilde G894T polimorfizmi ile tip II DM arasında anlamlı bir ilişki tanımlamışlardır. Bununla birlikte makroanjiyopati prevalansının yüksek olduğu tip II DM'li hasta populasyonunda G894T polimorfizminin varlığı değerlendirildiğinde diabetik hastalarla kontrol bireyleri arasında alel frekansı açısından fark bulunamamıştır (131).

Fransada yapılan bir çalışmada Taverna ve ark., eNOS 4 polimorfizmi ve şiddetli diabetik retinopati riski arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır (22). Tip I DM hastalarında eNOS 4 a/a homozigot delesyonu ve onun 4a aleli şiddetli olmayan diabetik retinopati ile ilişkili (diabetik retinopatisi olmayan veya zemin retinopatisi olan) bulunurken eNOS4b/b ve onun 4b aleli şiddetli diabetik retinopati (preproliferatif DR ve proliferatif DR) ile ilişkili bulunmuştur. eNOS 4a/a genotipi (homozigot delesyon) olanlarda plazma NO metabolit düzeyleri eNOS 4b/b veya eNOS 4a/b (heterozigot) olan olgulardaki kan düzeyinden anlamlı olarak daha düşük olduğundan, yazarlar homozigot eNOS a/a saptanan 7

kontrolün şiddetli DR ile etkilenmemesinin düşük NO düzeyine bağlı olabileceğini iddia etmişlerdir. Bu hipotezlerin tersi varsayıldığında eNOS 4 b/b saptanan hastalar daha sıklıkla şiddetli DRden etkilenmişlerdir. Kromozom 7q35te eNOS lokusuna yakın bir gen, eNOS geninin kendisinden ziyade, şiddetli DR için düşük riske katkıda bulunacağı göz ardı edilemez. İlginç olarak diabetik retinopati için koruma ve duyarlılık alellerine sahip aldoz reduktaz geni eNOS lokusuna yakın yerleşmiştir (132).

Diabetin süresi, HbA1c düzeyleri, HT ve albuminüri çalışma ve kontrol grupları arasında anlamlı olarak farklı iken regresyon analizinde eNOS 4a/a genotipinin diabetik retinopati üzerindeki riskinin bu değişkenler tarafından etkilenmediği bulunmuştur. Çalışmada diabeti olmayan kontrol grubu oluşturmamış olmalarına rağmen eNOS 4 polimorfizminin diabetik populasyon arasındaki dağılımı diğer çalışmalardaki populasyonlarda gözlenenlere benzerlik göstermiştir (133-135). Çalışmamızda HbA1c düzeyinin 8'in üstünde olduğu hastalarda G894T gen polimorfizmi ile bir ilişki olduğu saptandı. Yani G894T gen polimorfizmi her ne kadar bizim çalışmamızda retinopati şiddeti ile ilişkili bulunmadı ise de hiperglisemi düzeyi ve/veya regüle edilemeyen hiperglisemi ile G894T gen polimorfizmi arasında nedensel bir ilişki olabilir.

Anglosakson populasyonunda yapılan bir çalışmada uzun süreli tip I diabeti bulunan hastalarda intron 13 bölgesinde yerleşik başka bir eNOS polimorfizmi ile şiddetli DR arasında bir ilişki bulunamamıştır (136).

Ayrıca endotelyal nitrik oksit sentaz gen polimorfizmi ile ilgili Türk populasyonunda yapılan bir çalışmada eNOS geni esansiyel hipertansiyonla ilişkili, iskemik kronik kalp yetersizliği ile ilişkisiz, dilate kronik kalp yetersizliği ile olası bir ilişkisi olabileceği bildirilmiştir (137).

Diabetik mikrovasküler komplikasyonlar ile eNOS genleri arasındaki muhtemel ilişkiler üzerinde de çalışılmış, ancak bu ilişkiler tutarsız bulunmuştur. Taverna ve ark. 'b' alellerinin ve bb genotiplerinin şiddetli diabetik retinopati ile ilişkili olduklarını belirtmişlerdir (22). Benzer şekilde Frost ve ark. da , 27 bp tekrarının bb genotipinin DR ile

ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir (23). Ancak Neughabauer ve ark. ise DR ile 27 bp tekrarı arasında hiçbir ilişki bulamamıştır (133).

Tavakkoly-Bazzaz ve ark. 'a' alleli ile dengesiz bir bağlantı içerisinde olan – 786C allelinin DR ile önemli derecede ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (138).

Makuler ödemin gelişmesinde en önemli rol oynayan patofizyolojik basamak kan retina bariyerinin bozulmasıdır (15,16). Hem retinal kapiller endotel hücreleri tarafından oluşturulan iç bariyer hem de retinal pigment epitel hücrelerinin sıkı bağlantılarıyla oluşan dış bariyer makuler ödemin gelişimi sırasında etkilenebilir. NO, vasküler tonüs ve vasküler düz kas hücrelerinin antiproliferatif düzenlenmesinde anahtar role sahip çok fonksiyonlu bir moleküldür (17,18). iNOS tarafından üretilen yüksek miktarlardaki NO'nun toksik ve hasar yapıcı olduğu iddia edilse de yapısal olarak düşük düzeyde NO sağlayan eNOS endotel fonksiyonunun korunmasında gereklidir (18). Dolayısıyla diabetin mikrovasküler komplikasyonlarının ve kardiyovasküler hastalığa yatkınlığın belirlenmesinde eNOS ilgi çekici görünmektedir. Tip II DM' lu hasta grubunda eNOS gen polimorfizmi (ki bunlar T-786C, promotor bölgede ve intron 4 deki 27bp tekrarı) makuler ödem oluşumu ile doğrudan ilişkili bulunmuştur. Daha önceki çalışma sonuçları da göz önüne alındığında polimorfizmle ilgili olarak retinadaki defektif eNOS ekspresyonu, makuler ödem gelişimine katkıda bulunabilir (24).

Birçok çalışma göstermektedir ki retina içerisindeki eNOS ekspresyonunun bozulması ile kan retina bariyerinin parçalanması makuler ödem gelişimine katkıda bulunabilir. Bozulmuş eNOS aktivitesi vasküler tonüs regülasyonunu bozabilir ve ayrıca direk olarak mikrovasküler permeabiliteyi arttırabilir. Makula ödemi diabetik hastalarda görme azalmasının önemli bir sebebidir ve diabetik retinopatinin herhangi bir evresinde gelişebilir. Bu yüzden diabetik makula ödeminin ilerlemesine katkıda bulunan risk faktörlerinin ortaya konulması önemlidir. Bu açıdan makula ödemi gelişiminde gen polimorfizminin etkili olup olmadığının gösterilmesi değerli olabilir. Çalışmamızda makula ödemi varlığı ETDRS tarafından belirlenen uluslararası kriterler kullanılarak tanımlandı ve nonproliferatif diabetik retinopatili 41 hastanın 19'unda (%46) ve 30 proliferatif retinopatili

hastanın 10'unda (%33) mevcuttu. Hem nonproliferatif diabetik retinopatili hem de proliferatif diabetik retinopatili hastalarımızda G894T gen polimorfizmi ile makula ödemi arasında anlamlı olarak bir ilişki olduğu tespit edilmekle beraber kesin olarak makula ödeminde gen polimorfizminin sebep faktör olduğunu söyleyebilmek için daha fazla olguda sonuçların desteklenmesine ihtiyaç vardır.

Elde edilen sonuçlara göre değerlendirilmesi gereken önemli bir husus yapmış olduğumuz çalışmada ve benzeri diğer çalışmalarda, istatistiksel açıdan önemsiz olarak değerlendirilen bulguların, klinik açısından da aynı değere sahip olup olmadıklarının belirlenmesidir. Polimorfizmler tek başlarına, fonksiyonel olarak risk artışına neden olabilirler; ya da, birbirleri ile ilişkili fonksiyonel değişikliklerle beraber, beraberlerindeki genler için (linkage disequilibrium'da) bir marker olabilirler veya olası bir gen-çevre ilişkisinin, risk faktörü üzerinde etkisini yansıtır olabilirler. Bu rolleri belirlemek için daha ileri çalışmalara gerek vardır.

6. SONUÇ

Dünyada körlüğün önlenabilir en önemli nedenlerinden biri olan diabetik retinopatinin patogenezinde nitrik oksit önemli bir biokimyasal faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Nitrik oksitten sorumlu kromozumun promotor bölgesindeki T-786C, 4. intron bölgesinde 27-bp tekrarı ve 7. eksondaki Glu298Asp endotelial nitrik oksit sentaz genin üç polimorfizmini oluşturmaktadır. Bu polimorfizmler koroner arter hastalığı, hipertansiyon, beyin infarktı ile ilişkilendirilmiş olsa da bulgular kimi zaman çelişkilidir. Daha önceki çalışmaların sonuçları göz önüne alındığında polimorfizm ile ilgili retinadaki defektif eNOS ekspresyonu retinopatinin ilerlemesine ve makula ödemi gelişimine katkıda bulunabilir. Nitrik oksit vasküler tonüs ve vasküler düz kas hücrelerinin antiproliferatif düzenlenmesinde anahtar role sahip çok fonksiyonlu bir moleküldür. Nitrik oksidin endotelial formunun üretiminden sorumlu eNOS'un retinopati şiddeti ve makula ödemi ile ilişkisini ortaya koymak amacıyla yapılan çalışmamızda diabetik retinopatili hastalarda endotelial nitrik oksit sentaz gen loküsünde G894T exon 7 gen polimorfizmi araştırıldı. G894T eNOS gen polimorfizminin diabetik retinopati şiddeti üzerine herhangi bir etkisi tespit edilemezken diabetik makula ödemini gelişiminde ve kontrol edilemeyen kan şekeri düzeyi üzerinde bir etkisinin olabileceği sonucuna varıldı. Çalışmamızda daha önceden hipertansiyon tanısı almış hastalar dışlandıği için kardiyovasküler hastalıklarda risk faktörü olabileceği ileri sürülmüş G894T gen polimorfizminin diabetik retinopati üzerindeki etkisi bağımsız olarak test edilmeye çalışıldı ve bağıntı saptanmadı. Ancak sonuçlarımızın çok sayıda hastayı içeren ileri çalışmalarla desteklenmesine ihtiyaç vardır.

7. ÖZET

Amaç: Diabetik retinopatinin gelişiminde genetik bir risk faktörü olarak G894T gen polimorfizminin retinopati şiddeti ve makula ödemi varlığı ile ilişkisinin araştırılmasını amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Selçuk Üniversitesi Meram Tıp fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı polikliniğine başvuran tip II diabetes mellituslu 107 hasta çalışmaya alındı. Koroner arter hastalığı veya sistemik hipertansiyonu olan hastalar çalışma kapsamına alınmadı. Bu hastalar retinopatisi olmayan (n=36), nonproliferatif diabetik retinopati (n=41) ve proliferatif diabetik retinopati(n=30) olmak üzere 3 ayrı gruba bölündü. Diabet ve başka sistemik bir hastalığı olmayan 45 hasta kontrol grubu olarak oluşturuldu. Tüm hastaların kanları tüplerde toplandıktan ve biyokimyasal analiz için çalışıldıktan sonra her hastadan bir tüp örnek saklandı ve tüm hastalarda topluca polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi G894T polimorfizmi araştırıldı.

Bulgular: Hastaların yaş ortalaması 55.8 ± 9.4 yıl iken kontrol grubunda 55.0 ± 9.7 yıl idi. Diabetik retinopatisi olmayan hastaların %61'inde GG, %39'nda GT genotipi; nonproliferatif diabetik retinopatilerin %37'sinde GG, %46'sında GT ve %17'sinde TT; proliferatif diabetik retinopatilerin %58'inde GG, %33'ünde GT ve %9'unda TT genotipi saptandı. Diabetik retinopati şiddeti ile G894T gen polimorfizminin herhangi bir tipi ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı. Makula ödemi olan retinopatili hastalarda GG genotipi %62.1, GT %31 ve TT %6.9 oranında saptanırken makula ödemi olmayan retinopatili hastalarda GG %28.6, GT %54.8 ve TT %16.6 oranında saptandı. Diabetik retinopatili hastalarda makula ödemi ile GG genotipi arasında anlamlı bir ilişki saptandı ($p=0.017$, χ^2). HbA1c'nin 8'in üstünde olduğu uzun süreli kan şekerinin regüle edilemediği hastalarda G894T gen polimorfizminin GG genotipi ile ilişkili olduğu gözlemlendi.

Sonuç: G894T gen polimorfizmi diabetik retinopati şiddeti ile ilişkili bulunmazken, makula ödeminde ve regüle edilemeyen hiperglisemi üzerinde etkisinin olabileceği düşünüldü.

8. SUMMARY

Purpose: The association of G894T gen polymorphism with the severity of retinopathy and macular edema was investigated as a genetic risk factor in the development of diabetic retinopathy.

Material and Methods: One hundred seven patients with type 2 diabetes mellitus who applied for Ophthalmological examination in Ophthalmology department at Selcuk University School of Medicine were included in the study. Patients with coronary artery disease or systemic hypertension were not included in the study. The patients were divided into three groups according to their severity of retinopathy as non-retinopathy group, nonproliferative retinopathy group and proliferative group. Forty five patients without Diabetes mellitus or any other systemic disease served as a control group. Blood samples were collected from all patients and analyzed for biochemical parameters. One sample from each patient and control were stored for genetic analysis, then the G894T gen polymorphism of eNOS was analyzed by polymerase chain reaction.

Results: Mean age was 55.8 ± 9.4 years in the study group and 51.8 ± 9.7 years in the control group. GG and GT genotype was found as 61% and 39% respectively in nonretinopathy group. GG, GT and TT genotype was found as 37%, 46% and 17% respectively in nonproliferative diabetic retinopathy. GG, GT and TT genotype was found as 58%, 33% and 9% respectively in proliferative diabetic retinopathy. The severity of retinopathy was not associated with any type of G894T eNOS gene polymorphism. GG, GT and TT genotypes was found as 62.1%, 31% and 6.9% respectively in patients with retinopathy who have not macular edema. GG, GT and TT genotypes was found as 28.6%, 54.8% and 16.6 % respectively in patients with retinopathy who have macular edema. Macular edema was associated with GG genotype ($p=0.017$, χ^2). GG genotype of G894T gene polymorphism was also associated with hyperglycemia in patients in which long-term blood sugar could not regulated with $HbA1c > 8$.

Conclusion: Although G894T gene polymorphism was not associated with the severity of diabetic retinopathy although it may have effects on diabetic macular edema and nonregulated hyperglycemia.

9. KAYNAKLAR

1. L'Esperance FA Jr. Diabetic retinopathy. *Med Clin North Am* 1978 ;62(4):767-785.
2. Patz A, Smith RE. The ETDRS and Diabetes 2000. *Ophthalmology* 1991;98: 739-740.
3. Zachary T, Bloomgarden. American Diabetes Association Annual Meeting, (1998).Nephropathy and retinopathy. *Diabetes Care* 1999;22:640-644.
4. Özkan Ş, Akar S. Diabetik retinopati, 1. baskı. Dilek ofset, İstanbul, 2000
5. Smiddy WE, Flynn HW. Vitrectomy in the management of diabetic retinopathy. *Surv Ophtalmol* 1999;43:491-507.
6. Cerillo A, Bortolotti N, Motz E, Crescetini A, Lizzio S.,Russo A, Tonutti L, Taboga C. Meal-generated oxidative stress in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 1998;21:1529-1533.
7. Becquet F, Courtois Y, Goyreau O. Nitric oxide in the eye: multifaceted roles and diverse outcomes. *Surv Ophtalmol* 1997;42:71-82.
8. Shimizu K, Wu GS, Sultana C, Karla VK, Rao NA. Stimulation of macrophages by retinal proteins: production of reactive nitrogen and oxygen metabolites. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:3215-3223.
9. Böger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res* 2003;59:824-833.
10. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1987;92:639–646.
11. Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tangphao O, Tsao PS, Chan JR et al. Asymmetric dimethylarginine: a novel risk factor for endothelial dysfunction. Its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998;98:1842–1847.

12. Nadaud S, Bonnardeaux A, Lathrop M, Soubrier F. Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;198:1027-1033.
13. Waldman SA, Murad F. Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase- cyclic GMP system. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988;12(Suppl 5) :15-18.
14. Ciulla TA, Amador AG, Zinman B. Diabetic retinopathy and macular edema: pathophysiology, screening, and novel therapies. *Diabetes Care* 2003;26:2653-2664.
15. Antcliff RJ, Marshall J. The pathogenesis of edema in diabetic maculopathy. *Semin Ophthalmol* 1999;14:223-232.
16. Pelzek C, Lim JI. Diabetic macular edema: review and update. *Ophthalmol Clin North Am* 2002;15:555-563.
17. Gross SS, Wolin MS: Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* 1995;57:737-769.
18. Albrecht EW, Stegeman Ca, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol* 2003;199:8-17.
19. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 1998;32:3-8.
20. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, et al. T-786-C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 1999;99 :2864-2870.
21. Wang XL, Wang J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol Genet Metab* 2000;70:241-251.
22. Taverna MJ, Sola A, Guyot-Argenton C, Pacher N, Bruzzo F, Chevalier A, Slama G, Reach G, Selam JL. eNOS4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase predicts risk for severe diabetic retinopathy. *Diabet Med* 2002;19:240-245.

23. Frost D, Chitu J, Meyer M, Beischer W, Pfohl M. Endothelial nitric oxide synthase (ecNOS) 4 a/b gene polymorphism and carotid artery intima-media thickness in type 1 diabetic patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2003 ;111:12-15.
24. Takuya A, Tamotsu N, Hiroyuki I, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is associated with diabetic macular edema in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27:2184-2190.
25. Sigelman J. Surgical anatomy of the retina. Retinal diseases pathogenesis, laser therapy and surgery. Little Brown and company, Boston / Toronto, 1984:3-65.
26. Snell RS, Lemp MA. Clinical anatomy of the eye. The Eye ball 2nd ed. 1998;132-213.
27. Triphati RC, Wond M. The eye In: Basic and clinical science course. American Academy of Ophthalmology Section 2. 1999; 47-92.
28. Marmor MF. The retinal pigment epithelium Jn : Yanoff M, Duker JS editors. *Ophthalmology Mosby*.1999;8: 2.1-2.4
29. Schubert HD. . Structure and function of neural retina Jn : Yanoff M, Duker JS editors. *Ophthalmology Mosby*.1999;8: 1.1-1.4
30. Snell RS, Lemp MA. Clinical anatomy of the eye .The orbital blood vessels. 2nd ed. 1998; 277-289
31. Weitter JJ, Ernest JT. Anatomy of the choroidal vasculature. *Am J Ophthalmol* 1974;78:583-590.
32. Duker J, Weitter JJ. Duane's foundations of clinical ophthalmology Jn: Tasman W, Jaeger EA editors. Ocular circulation. JB Lippincott , New York. 1991; 1-34.
33. Green WR. Retinal ischemia: Vascular and circulatory conditions and diseases Jn: Spencer WH editors. *Ophthalmic Pathology*. 3th ed. W.B. Saunders Company Philadelphia. 1985; 655-710.
34. Büyükdevrim S.. Diabetes Mellitus. İç Hastalıkları. 1.Baskı, Bayda AŞ, İstanbul,1992: 190-191.

35. Report of expert committee on diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2001;24:5-20.
36. Özçetin H. Pratik göz hastalıkları. 2. baskı, F. Özsan Matbaacılık Ltd. Şti. Bursa; 2000: 111-112.
37. Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. XIV Ten-year incidence and progression of diabetic retinopathy. Arch Ophthalmol 1994;112:1217-1228.
38. Bresnick GH. Diabetic macular edema, a review, Ophthalmology 1986;93:989-997.
39. Klein R, Klein B, Moss S. Epidemiology of proliferative diabetic retinopathy. Diabetes Care 1992;15:1875-1891.
40. Günalp I. Diabetik retinopatide son gelişmeler. T Klin Oftalmoloji 1993;2:1-2.
41. Bayraktar Z. Diabetik retinopatinin sınıflandırılması, erken tanı ve takibi. T Oft Gaz 1990;20:136-139.
42. ETDRS Report Number 10. Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs. An extension of the modified Airlie House classification. Ophthalmology 1991;98:786-806.
43. Aiello L, Cavallerano D, Aiello A, Bursell S. Diabetic retinopathy. Guyer D, Yanuzzi L, Shields J. Retina-Vitreous- Macula W.B. Saunders Co.,1999:316-329.
44. Cogan DG, Toussaint D, and Kuwabara T. Retinal vascular patterns, Diabetic Retinopathy. Arch Ophthalmol 1961;66:366-378.
45. Friendwald JS. Diabetic retinopathy. Am J Ophthalmol 1950;33:1199.
46. Engerman RL. Pathogenesis of diabetic retinopathy. Diabetes 1989;38:1203-1206.
47. Muraoka K, Shimizu K. Intraretinal neovascularization in diabetic retinopathy, Ophthalmology 1989;91:1440-1446.
48. Patz A. Clinical and experimental studies on retinal neovascularization. Am J Ophthalmol 1982;94:715-743.
49. Davis MA. Proliferative diabetic retinopathy Jn: Ryan S editors. Retina vol.2.St.Louis: CV Mosby CO 1989; 367-402.

50. Conway MD and Olk D. Diabetic maculopathies. *Ophthalmol Clin North Am* 1993;213-230.
51. Frank N R. On the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 1991;98: 586-593.
52. Grant M, Russel B, Fitzgerald C. et al. Insulin-like growth factors in vitreous: studies in control and diabetic subjects with neovascularization. *Diabetes* 1986; 35:416-420.
53. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspect of active oxygen/free radicals. *Japan J Physiol* 1996;46:15-32.
54. Maritim A C, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress and antioxidants: A review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003;17:24-38.
55. Dondana P, Thusu K, Cook S. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* 1996;347:444-445.
56. Schmetterer L, Wolzt M. Ocular blood flow and associated functional deviations in diabetic retinopathy. Review. *Diabetologia* 1999;42:387-405.
57. Jochen S, Klaus TP, Helmut S, Andreas P. High levels of anjiostatin in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy after previous laser coagulation. *Diabetologia* 1998;2:A20(0084).
58. Rafael S, Rosa B, Ana C, Cristina H, Rosa M S, Jordi M. Lack of relationship between increased IGF-1 and VEGF intravitreous concentrations in proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia* 1998;12:A156 (0678).
59. Aly A, Gamal AB, Soheir S, Ahmed AM. Serum growth hormone (GH) insülin like growth factor one (IGF-1) and insülin growth factor binding protein three (IBGFBP3) in diabetic retinopathy. *Diabetologia* 1998;12:A386 (1703).
60. Kröncke KD, Feshel K., Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol Chem* 1995;376 (Suppl):327-343.

61. Ahmad I, Leinders-Zufall T, Kocsis JD. Retinal ganglion cells express a cGMP-gate cation conductance activatable by nitric oxide donors. *Neuron* 1994;12:155-165.
62. Nathan CF, Xie Q. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell* 1994;78:915-918.
63. Stamler JS. Redox signaling: Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 1994;78:931-936.
64. Chakravarthy U, Stitt AW, McNally J, Bailie JR, Hoey EM, Duprex P. Nitric oxide synthase activity and expression in retinal capillary endothelial cells and pericytes. *Curr Eye Res* 1995;14:285-294.
65. Yamamoto R, Bredt DS, Snyder SH, Stone R.A. The Localization of nitric oxide in the eye and related cranial ganglia. *Neurosci* 1993;54:189-200.
66. Parks DJ., Cheung MK., Chan CC., Roberge FG. The role of nitric oxide in uveitis. *Arch Ophthalmol* 1994;112:544-546
67. Tilton RG, Chang K, Corbett JA., Misko TP, Currie MG, Bora NS, Kaplan HJ, Williamson JR. Endotoxin-induced uveitis in the rat is attenuated by inhibition of nitric oxide production. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:3278-3288.
68. Becquet F, Courtois Y, Goureau O. Nitric oxide decreases in vitro phagocytosis of photoreceptor outer segments by bovine retinal pigmented epithelial cells. *J Cell Physiol* 1994;159:259-262.
69. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.
70. Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res* 1983;52:352-357.
71. Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992;267:14519-14522.

72. Shinde UA, Mehta AA, Goyal RK. Nitric oxide: A molecule of the millennium. *Indian J Exp Biol* 2000;38:201-210.
73. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;357:593-615.
74. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 2001;280:193-206.
75. Warpeha KM, Xu W, Liu L, et al. Genotyping and functional analysis of a polymorphic (CCTTT) (n) repeat of NOS2A in diabetic retinopathy. *FASEB J* 1999; 13:1825-1832.
76. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. Clustering of long-term complications in families with diabetes in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes* 1997;46:1829-1839.
77. Goldstein IM, Ostwald P, Roth S. Nitric oxide: a review of its role in retinal function and disease. *Vis Res* 1996;36:2979-2994.
78. Becquet F, Courtois Y, Goureau O. Nitric oxide in the eye: multifaceted roles and diverse outcomes. *Surv Ophthalmol* 1997;42:71-82.
79. Vallance P, Collier J. Biology and clinical relevance of nitric oxide. *Br Med J* 1994; 309:453-457.
80. Ziche M. Role of nitric oxide in the angiogenesis of avascular tissue. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7:403-405.
81. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329:2002-2012.
82. Petros A, Bennet D, Vallance P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet* 1991;338:1557-1558.
83. Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, et al. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent: a novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest* 2004;94:1172-1179.

84. Monti LD, Valsecchi G, Costa S, et al. Effects of endothelin-I and nitric oxide on glucokinase activity in isolated rat hepatocytes. *Metabolism* 2000;49:73 -78.
85. Shankar RR, Wu Y, Shen H, et al. Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance. *Diabetes* 2000;49:1-4.
86. Piatti PM, Monti LD, Zavaroni I, et al. Alterations in nitric oxide/cyclic-GMP pathway in nondiabetic sibilings of patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2416-2420.
87. Wang XL, Mahaney MC, Sim AS, et al. Genetic contribution of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3147-3153.
88. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, et al. Evidence of association of the ecNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;245:190-193.
89. Ohtoshi K, Yamasaki Y, Gorogawa S, et al. Association of -786C.mutation of endothelial nitric oxide synthase gene with insülin resistance. *Diabetologia* 2002; 45:1594-1601.
90. Monti LD, Barlassina C, Citterio L, et al. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 2003;52:1270-1275.
91. Sticchi E, Fatini C, Gensini F, Battaqlini B, Liotta AA, Abbate R. High speed detection of the G894T polymorphism in exon 7 of the eNOS gene by real-time fluorescence PCR with the Light-Cycler. *Biochem Genet* 2004;42:121-127
92. Do Carmo A, Lopes C, Santos M, Proenca R, Cunha- Vaz J, Carvalho AP. Nitric oxide synthase activity and L-arginine metabolism in the retinas from streptozotocin-induced diabetic rats. *Gen Pharmacol* 1998;30:319-324.
93. Hattenbach LO, Allers A, Klais C, Koch F, Hecker ML. Arginine-nitric oxide pathway related metabolites in the aqueous humor of diabetic patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:213-217.

94. Martin AR, Bailie JR, Robson T, et al. Retinal pericytes control expression of nitric oxide synthase and endothelin 1 in microvascular endothelial cells. *Microvasc Res* 2000;59:131-139.
95. Schmetterer L, Findl O, Fasching P, et al. Nitric oxide and ocular blood flow in patients with IDDM. *Diabetes* 1997;46:653-659.
96. Du Y., Sarthy VP, Kern TS. Interaction between NO and COX pathways in retinal cells exposed to elevated glucose and retina of diabetic rats. *Am. J. Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;287(4) :735-741
97. Kumaramanickavel G, Sripriya S, Vellanki RN, Upadyay NK, Badrinath SS, Rajendran V, Sukumar B, Ramprasad VL, Sharma T. Inducible nitric oxide synthase gene and diabetic retinopathy in Asian Indian patients. *Clinical Genetics* 2002;61:344-348.
98. Tesauro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:2832-2835.
99. Tsai DC, Chiou SH, Lee FL, Chou CK, Chen SJ, Peng CH, Kuo YH, Chen CF, Ho LL, Hsu WM. Possible involvement of nitric oxide in the progression of diabetic retinopathy, *Ophthalmologica* 2003;217:342-346.
100. Schaefer S, Kajimura M, Tsuyama S, Uchida K, Sato E, Inoue M, Suematsu M, Watanabe K. Aberrant utilization of nitric oxide and regulation of soluble guanylate cyclase in rat diabetic retinopathy. *Antioxid Redox Signal* 2003;5:457-465.
101. Jawa A, Kcomt J, Fonseca VA. Diabetic nephropathy and retinopathy. *Med Clin North Am* 2004;88:1001-1036.
102. Kowluru RA. Effect of reinstatement of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrate stress in diabetic rats. *Diabetes* 2003;52:818-823.

103. Abu El-Asrar AM, Desmet S, Meersschaert A, Dralands L, Missotten L, Geboes K. Expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in the retinas of human subjects with diabetes mellitus. *Am J Ophthalmol* 2001;132:551-556.
104. El-Remessy AB, Abou-Mohamed G, Caldwell RW, Caldwell RB. High glucose-induced tyrosine nitration in endothelial cells: role of eNOS uncoupling and aldose reductase activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3135-3143.
105. West IC. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med* 2000;17:171-180.
106. Li H, Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 2000;190:244-254.
107. Chan NN, Vallance P, Colhoun HM. Nitric oxide and vascular responses in type 1 diabetes. *Diabetologia* 2000;43:137-147
108. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, De Mets 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* 1984;102:520-526.
109. Shibuki H, Katai N, Yodoi J, Uchida K, Yoshimura N. Lipid peroxidation and peroxynitrite in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:3607-3614.
110. Hartnett ME, Stratton RD, Browne RW, Rosner BA, Lanham RJ, Armstrong D. Serum markers of oxidative stress and severity of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2000;23:234-240.
111. Aiello LP, Wong JS. Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications. *Kidney Int* 2000; 58:113-119.
112. Tilton RG, Chang KC, LeJeune WS, Stephan CC, Brock TA, Williamson JR. Role for nitric oxide in the hyperpermeability and hemodynamic changes induced by intravenous VEGF. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:689-696.

113. Brooks SE, Gu X, Samuel S, Marcus DM, Bartoli M, Huang PL et al. Reduced severity of oxygen-induced retinopathy in eNOS-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:222-228.
114. Sennlaub F, Courtois Y, Goureau O. Inducible nitric oxide synthase mediates the change from retinal to vitreal neovascularization in ischemic retinopathy. *J Clin Invest* 2001;6:717-725.
115. Warpeha KM, Xu W, Liu L, Charles IG, Patterson CC, Ah-Fat F et al. Genotyping and functional analysis of a polymorphism (CCTTT)(n) repeat of NOS2A in diabetic retinopathy. *FASEB J* 1999;13:1825-1832.
116. Johannesen J, Tarnow L, Parving HH, Nerup J, Pociot F. CCTTT-repeat polymorphism in the human NOS2-promoter confers low risk of diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 2000;23:560-562.
117. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4651-4655.
118. Miyamoto K, Ogura Y: Pathogenetic potential of leukocytes in diabetic retinopathy. *Semin Ophthalmol* 1999;14:233-239.
119. Kubes P, Granger DN. Nitric oxide modulates microvascular permeability. *Am J Physiol* 1992;262:611- 615.
120. He P, Zeng M, Curry FE. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on basal microvessel permeability and endothelial cell (Ca²⁺)_i. *Am J Physiol* 1997;273:747-755.
121. Haverkamp S, Kolb H. Cuenca N. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is localized to Muller cells in all vertebrate retinas. *Vision Res* 1999;39:2299-2303.
122. Awata T, Neda T, Iizuka H, Kurihara S, Ohkubo T, Takata N, Osaki M, Watanabe M, Nakashima Y, Sawa T, Inukai K, Inoue I, Shibuya M, Mori K, Yoneya S, Katayama S. Endothelial nitric oxide synthase gene is associated with diabetic macular edema in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004;27:2184-2190.

123. Taverna MJ, Elgrably F, Selmi H, Selam JL. The T-786C and C774T endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms independently affect the onset pattern of severe diabetic retinopathy. *Nitric Oxide* 2005;13:88-92.
124. Cai H, Wang X, Colagiuri S, Wilcken DEL. A common Glu298Asp (894G-T) mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and vascular complications in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1998;21:2195.
125. Tso AW, Tan KC, Wat NM, Janus ED, Lam TH, S L Lam K. Endothelial nitric oxide synthase G894T (Glu298Asp) polymorphism was predictive of glycemic status in a 5-year prospective study of Chinese subjects with impaired glucose tolerance. *Metabolism* 2006;55:1155-1158.
126. Spinass GA. The dual role of nitric oxide in islet β -cells. *N Physiol Sci* 1999;14:49-54.
127. Kobzik L, Stringer B, Balligand JL, Reid MB, Stamler JS. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;211:375-381.
128. Baron AD, Zhu JS, Irsula O, Brechtel G, Keech C. Insulin resistance after hypertension induced by the nitric oxide synthesis inhibitor L-NMMA in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1995;269:709-715.
129. Piatti PM, Monti LD, Zavaroni I, Valsecchi G, Van Phan C, Costa S, Conti M Sandoli EP, Solerte B, Pozza G, Pontiroli AE, Reaven G: Alteration in Nitric oxide/cycling-GMP pathway in nondiabetic siblings of patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2416-2420.
130. Zavaroni I, Piatti PM, Monti LD, Gasparini P, Barilli LA, Massironi P, Ardigo D, Valsecchi G, Delsignore R, Raven GM. Plasma nitric oxide concentrations are elevated in insulin resistant healthy subjects. *Metabolism* 2000;49:959-961.
131. Ukkola O, Erkkila PH, Savolainen MJ, Kesaniemi YA. Lack of association between polymorphism of catalase, copper-zinc superoxide dismutase (SOD), extracellular SOD and endothelial nitric oxide synthase genes and

- macroangiopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Int Med* 2001 ;249: 451-459.
132. Patel A, Hibberd ML, Millward BA, Demaine AG. Chromosome 7q35 and susceptibility to diabetic microvascular complications. *J Diabetes Complications* 1996;10:62-67.
133. Neugebauer S, Baba T, Watanabe T. Association of the nitric oxide synthase gene polymorphism with an increased risk for progression to diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Diabetes* 2000;49:500-503.
134. Zanchi A, Moczulski DK, Hanna LS, Wantman M, Warram JH, Krolewski AS. Risk of advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes is associated with endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Kidney Int* 2000;57:405-413.
135. Weekers L, Hadjadj S, Belloum R, Gallois Y, Bouhanick B, Marre M. Lack of contribution of two endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene polymorphisms to diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetologia* 1999;42:266.
136. Warpeha KM, Ah-Fat F, Harding S, Patterson CC, Xu W, Hart PM et al. Dinucleotide repeat polymorphisms in EDN1 and NOS3 are not associated with severe diabetic retinopathy in type 1 or type 2 diabetes. *Eye* 1999;13:174-178.
137. Demirel, Çine N, Tükek T, Sözen AB, Erk O, Ünaltuna NE, Erdinc S. Endothelial constitutive nitric oxide synthase gene polymorphism in the Turkish population. *Turk Kardiyol Dern Arş* 2001;29:637-641.
138. Tavakkoly-Bazzaz J, Boulton AJM, Pravica V, Hutchinson IV. eNOS gene polymorphism in type 1 diabetes and its microangiopathic complications. *Diabetes Metab* 2003;29(Suppl2):S42